



HAL
open science

Identification des fonctions oncosuppressives de TIF1 γ (Transcriptional Intermediary Factor 1 γ)

Roxane Pommier

► **To cite this version:**

Roxane Pommier. Identification des fonctions oncosuppressives de TIF1 γ (Transcriptional Intermediary Factor 1 γ). Biologie cellulaire. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10356 . tel-01142896

HAL Id: tel-01142896

<https://theses.hal.science/tel-01142896>

Submitted on 16 Apr 2015

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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Présentée devant

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE « Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire »

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

Identification des fonctions oncosuppressives de TIF1 γ *(Transcriptional Intermediary Factor 1 γ)*

soutenue publiquement le 17 décembre 2014 par

Roxane POMMIER

Directeurs de thèse : Dr Laurent BARTHOLIN

Dr Stéphanie SENTIS

Laboratoire d'accueil : INSERM 1052 / CNRS UMR 5286

Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

JURY

Dr Alain MAUVIEL (Rapporteur)

Dr Nelson DUSETTI (Rapporteur)

Dr Marlène DUFRESNE (Examinatrice)

Dr Pascal BERNARD (Examineur)

Dr Caroline MOYRET-LALLE (Examinatrice)

Dr Laurent BARTHOLIN (Examineur)

Dr Stéphanie SENTIS (Membre invité)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

*Les travaux de recherche auxquels j'ai participé durant ma thèse ont été réalisés au Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon (CRCL) (INSERM U1052 - CNRS UMR5286). Je tiens ainsi à remercier, en premier lieu, le **Pr Alain PUISIEUX**, directeur de ce centre de recherche, pour m'avoir accueillie, tout d'abord au sein de l'unité INSERM U590 lors de mes stages de Master, puis au sein du CRCL, depuis sa création en 2011, où j'ai pu effectuer ma thèse dans les meilleures conditions.*

*Je remercie les rapporteurs de ma thèse, le **Dr Alain MAUVIEL** et le **Dr Nelson DUSETTI**, pour leurs commentaires et leurs conseils sur la rédaction de ce manuscrit. Je remercie également les autres membres du jury, le **Dr Marlène DUFRESNE**, le **Dr Pascal BERNARD** et le **Dr Caroline MOYRET-LALLE**, d'avoir accepté d'examiner mes travaux de thèse.*

*Je tiens également à remercier le **Dr Sophie VASSEUR** et le **Dr Stéphane ANSIEAU**, membres de mon comité de suivi de thèse, pour leur aide et leurs conseils sur les différents projets auxquels j'ai participé durant ma thèse.*

*Je remercie ensuite tout particulièrement mon directeur de thèse, le **Dr Laurent BARTHOLIN**. Il y a tant de choses pour lesquelles je voudrais te remercier « Chef » ! ... Premièrement, merci de m'avoir permis d'effectuer mes stages de Master ainsi que ma thèse au sein de ton équipe, dans un environnement de travail optimal, tant au niveau scientifique qu'au niveau humain. Merci de ton engagement et de ton dévouement sans faille quant à l'épanouissement de l'équipe et de ses membres. Merci pour ta grande disponibilité : je ne compte plus le nombre de fois où je suis venue taper à ta porte pour venir quérir tes précieux conseils. Merci pour le temps que tu m'as consacré au cours de ces quatre années, que ce soit pour des discussions conceptuelles, pour l'élaboration des manips mais également dans la réalisation de rapports, d'articles, de présentations ou dans la rédaction de ce manuscrit. Merci pour ton apprentissage sur la façon de penser et de mener un projet et pour ta vision de la Science à la fois très fondamentale mais également très concrète, illustrée par ton fameux « Quelle est la question ? ». Je pense, et j'espère, être à présent fortement influencée par cette méthode de réflexion. Merci également pour tes immenses qualités humaines : tu as toujours su trouver les mots pour me rassurer, me pousser à me dépasser en toutes circonstances, et compris ce dont j'avais besoin avant que je ne m'en rende compte moi-même... Merci beaucoup pour ton soutien, que ce soit au cours de ma thèse ou dans ma recherche de post-doctorat. Pour finir, David t'avait très habilement surnommé « Chef » et j'ai pris plaisir à perpétuer cette désignation, ce surnom te convenant, en mon sens, parfaitement : tu possèdes naturellement toutes les qualités qui font de toi un véritable meneur d'hommes (et de femmes ;-)) ainsi qu'un scientifique d'une qualité rare. Je n'ai donc aucun doute sur le devenir de cette équipe qui peut se vanter d'avoir un très grand « Chef » (au sens propre comme au figuré ;-)).*

*Je souhaite également remercier très sincèrement ma co-directrice de thèse, le **Dr Stéphanie SENTIS**. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi durant ces dernières années. Je suis ravie que tu nous aies rejoints et que tu aies apporté la touche féminine indispensable au bureau « des chefs » ;-). Merci pour ta disponibilité et pour ton investissement dans l'élaboration et la réalisation des différents projets de l'équipe. Je te remercie également pour tes précieux conseils dans la conception et la mise en œuvre de nombreuses manip ainsi que pour ton aide dans la rédaction de ce manuscrit, des articles et des différentes demandes de financements. Un grand merci pour ton écoute et tes conseils, aussi bien au niveau scientifique que personnel. Je te remercie également pour ta bonne humeur quotidienne et communicative ainsi que pour ta grande diplomatie qui rendent le travail à tes côtés très agréable. Enfin, je tiens à te remercier de m'avoir encadrée et soutenue en étant toujours présente lorsque j'en avais besoin.*

*Je tiens ensuite à remercier, non sans une certaine émotion, **Sylvie MARTEL**, technicienne émérite de l'équipe BARTHOLIN. Sylvie, tes qualités professionnelles et humaines font de toi une personne véritablement exceptionnelle. Travailler au quotidien à tes côtés est une chance et un vrai plaisir. Merci pour tout ce que tu m'as appris, tu partais pourtant de loin avec une thésarde dotée de deux mains gauches ;-). Merci, Sylvie pour ta rigueur et ton professionnalisme, pour ton extrême gentillesse, ton courage et surtout pour ton sourire. Tu es douée d'une grande patience et d'une pédagogie hors norme faisant de toi LA référence pour tous les thésards étant passés entre tes mains. J'espère sincèrement que le futur t'apportera beaucoup bonheur, que ce soit au niveau professionnel ou personnel.*

*Je remercie également le **Dr David VINCENT**, ancien thésard de l'équipe, désormais post-doc de l'autre côté de la Manche. Thésard en chef de l'équipe BARTHOLIN, tu as ouvert la voie d'une façon plus que remarquable à nous, les petits nouveaux, qui essayons de suivre tes traces ;-). Merci beaucoup Dav' pour tes conseils de survie dans la jungle de la thèse, merci pour ton humour et ta personnalité qui m'ont donné envie d'intégrer cette équipe un peu barrée ;-). Ton calme et ton flegme en toutes circonstances contrastent parfaitement avec ton caractère joyeux et tes blagues hilarantes. Tu as sans nul doute très fortement imprégné l'équipe et participé à instaurer ce fabuleux esprit d'équipe qui perdure aujourd'hui. Je te souhaite toute la réussite possible dans les divers projets que tu entreprends et ce, à tous les niveaux.*

*Je remercie le **Dr Vanessa ARFI**, ancienne post-doc de l'équipe, avec laquelle j'ai fait mes classes dans l'équipe BARTHOLIN lors de mon stage de Master 1. Merci de m'avoir encadrée et soutenue durant cette première expérience en laboratoire. J'espère que tu t'épanouies dans tes nouveaux projets et te souhaite bonne chance pour la suite.*

*Je tiens également à remercier **Bastien KANIEWSKI**, ancien ingénieur de l'équipe au combien regretté !... Nous avons, heureusement, la chance de te voir tous les jours grâce à la proximité de nos*

bureaux (y a un truc qui frotte au premier étage !!.. ;-)). Merci à toi Bastien, pour ta rigueur, ta précision et ton organisation légendaire. Le formidable duo que tu formes avec Sylvie est capable de venir à bout des étudiants les plus récalcitrants. Merci pour ton goût du travail bien fait et pour la méthodologie exemplaire que vous m'avez tous deux inculquée. Outre tes qualités professionnelles indiscutables, tu es pour moi avant tout, une personne au grand cœur, toujours présent lorsque l'on a besoin de toi, c'est-à-dire très souvent ! Merci Bastien pour ta disponibilité et ton écoute. Merci également pour toutes ces soirées autour d'un verre (ou de deux ... ;-)) et merci de nous avoir toujours reçu « comme à la maison ». J'espère que le futur te réservera énormément de réussite, de joie et fous rires, autant que tu as pu m'en apporter durant ces années !

J'adresse également des remerciements particuliers au **Dr Johann GOUT**, post-doc emblématique de l'équipe. Jo, ..., par où commencer ..., il y en a tellement ! Je me souviens très bien de nos débuts dans l'équipe, étant arrivés quasiment au même moment, et me rappelle de toi comme un jeune homme discret et réservé, à la chemise bien repassée ;-). Comme tu as pu facilement tous nous berner ! ;-)) Rapidement c'est installé entre nous une réelle complicité et j'ai découvert en toi une personne excessivement drôle, à l'humour acéré, juste et toujours pertinent. Tu es un véritable puit de science et nos discussions enflammées sur de nombreux sujets nous ont permis de refaire le monde tant de fois ! Nos points communs comme nos différences nous ont rapprochés et nous avons sans nul doute un peu déteint l'un sur l'autre (qui aurait pu penser que j'allais devenir fan de Kaamelott ou que tu aurais pris 2 sucrées dans ton café ;-)). Merci Jo, pour tout ce que tu m'as apporté, merci pour tes conseils scientifiques en tout genre, merci pour nos délires communs très souvent obscurs pour d'autres, merci pour ton esprit vif, merci pour tes blagues, merci pour les heures passées à m'épauler en manips ou en rédaction, et surtout merci pour ton soutien quotidien ! Je te souhaite véritablement le meilleur pour l'avenir, Jo, et encore MERCI d'avoir toujours été là !

Je remercie le **Dr Geneviève FOUREL**, pour l'aide qu'elle m'a apportée dans l'étude de l'inductibilité du promoteur p8 par le TGFβ ainsi que pour ces précieux conseils et commentaires dans la rédaction d'articles. J'espère que le futur t'apportera l'apaisement et l'accomplissement.

Je remercie également le **Dr Ulrich VALCOURT**, pour son aide dans les divers projets auxquels j'ai été associée pendant ma thèse, que ce soit dans la conception des manips, mais également pour ses conseils dans la rédaction des articles et des demandes de financements. Je te remercie sincèrement de m'avoir permis d'être associée à ton chapitre d'ouvrage concernant la culture cellulaire d'acini primaires. Je tiens aussi à te remercier de m'avoir acceptée en tant que monitrice dans l'UE de biologie cellulaire IBCI. Merci beaucoup pour ton aide et ton soutien dans la préparation des TD, TP ainsi que pour les corrections d'exams. Je remercie également le **Dr Dominique BAAS** pour m'avoir permis d'effectuer mon monitorat dans l'UE CAO et pour m'avoir soutenue durant ces années. Merci également à tous mes **collègues moniteurs ou maîtres de conférences** avec qui nous avons passées de

nombreuses heures en TP/TD ou en correction de copies. Je suis ravie de cette expérience d'enseignement qui m'a énormément appris.

Je tiens également à remercier ma « jumelle de thèse » **Lindsay ALCARAZ**. Nous avons débuté notre thèse exactement en même temps dans l'équipe et ce fût un vrai plaisir de partager avec toi nos galères, nos coup de gueules, nos réussites et nos joies de thésardes ! Merci Lindsay pour ton aide tout au long de ma thèse, merci aussi pour ta personnalité unique et ton caractère agréable qui ont tant apporté à l'équipe. Au premier abord discrète, tu t'es vite révélée indispensable : tes anecdotes hors-norme, n'arrivant qu'à toi ☺, tes interventions pertinentes et ton humour se sont parfaitement intégrées à l'esprit déjanté de l'équipe ! De plus, tes qualités scientifiques et techniques indiscutables (comment faire 10 Western-blots concernant 3 projets différents, sans stress, en une seule journée !!) font de toi une vraie marathonnienne de la manip (si des J.O. sont organisés je t'inscris tout de suite !). Nous sommes identiques sur de nombreux points, ce qui nous a vite liées, et je suis sincèrement triste de ne pas avoir fait ta connaissance avant, sur les bancs de l'Université, que nous avons pourtant partagés. Je te souhaite énormément de bonheur pour l'avenir, qui sera, je n'en doute pas, rempli de succès !

Je remercie aussi **Nicolas CHUVIN**, « petit » nouveau thésard de l'équipe ;-). Merci beaucoup pour tes conseils et tes commentaires avisés sur les projets, pour ton espièglerie et tes blagues douteuses ;-), pour ton fort tempérament et ton obstination ! Nos prises de tête font souvent beaucoup de bruit mais bien heureusement ne durent jamais longtemps : deux têtes de bois dans le même bureau, il fallait s'y attendre ;-). Merci, Nico, pour nos discussions sans fin autour de nombreux sujets, pour ta joie de vivre et ta compagnie agréable ! Tu animes les débats comme personne et exerce ton humour décalé pour la joie de tous les membres du bureau ! Tu possèdes toutes les qualités qui prédisent une thèse de grande qualité et un futur rempli de succès : ton fort esprit critique, ton acharnement et tes grandes capacités d'analyse qui te permettront, sans nul doute, de faire de grandes choses ! Je te souhaite bonne chance pour l'avenir Nico et beaucoup de réussite !

Je tiens aussi à remercier **Jonathan RODRIGUEZ** et **Stéphanie MONOD**, deux étudiants en Master 1 que j'ai eu la chance d'encadrer et qui m'ont beaucoup aidé dans l'avancée des différents projets auxquels ils ont participé. Bon courage à vous pour la suite !

Je remercie également toutes les personnes du CRCL, du CLB ou de Laennec qui m'ont apporté leur aide précieuse : Doriane RIPOCHE et Philippe BERTOLINO de l'équipe de Chang ZHANG et Jean-Yves SCOAZEC, Clothilde WIEL de l'équipe de David BERNARD, Anne-Pierre MOREL, Agnès TISSIER et Emmanuelle RUIZ de l'équipe d'Alain PUISIEUX et Stéphane ANSIEAU, Mélodie GRANDIN et Guillaume DEVALLEY du groupe de Robert DANTE, Olivier MEURETTE, Gabriel ICHIM et Servane TAUSZIG-DELAMASURE de l'équipe de Patrick MEHLEN, les différents membres d'ANICAN et du LMT, Sophie LEON-GODDARD, Amélie COLOMBE et Isabelle TREILLEUX du service d'anatomo-pathologie, Nicolas

GADOT de la plateforme ANIPATH et tous ceux que j'aurais malencontreusement omis : un grand MERCI pour votre aide !

*Je tiens également à remercier chaleureusement mes Keupines du Mercredi ;-): **Doriane RIPOCHE, Clothilde WIEL, Mélanie BODNAR et Lindsay ALCARAZ** (« - miam miam ? – ouiiii !! - 11h30 ? - ouiiii !! » ;-)). Nous avons initié le projet « Ph.D.-student days » avec Doriane (<3) et avons été soutenues par la Ligue des Demoiselles Extraordinaires composée de Clothilde, Mélanie et Lindsay. Nous avons ainsi créé une immense collab trans-départementale au sein du CRCL ;-). Merci les filles pour ces super moments à vos côtés, à se raconter nos joies et nos malheurs de thésardes en herbe, sans oublier les ragots (« J'ai un scoop !! ») et les trucs de filles (chaussures, sacs, vernis, ...). J'espère sincèrement que ce rituel subsistera aux projets de chacune et vous souhaite plein de bonheur et de réussite professionnelle et personnelle.*

*Je remercie de tout cœur **ma famille et mes amis** pour m'avoir soutenue dans mes choix d'orientation, pour avoir toujours cru en moi ainsi que pour m'avoir remonter le moral et pousser à m'accrocher dans les moments où je doutais (NB : je garde en tête un projet sur la myostatine qui, je l'espère, arrivera à combler les attentes de certains membres de ma famille ;-)). Je tiens à remercier tout particulièrement **mes parents** pour leur immense patience et leur écoute de tout instant. Merci pour vos conseils avisés et votre soutien inébranlable. Je vous suis extrêmement reconnaissante de tout ce que vous m'avez apporté, sans votre aide je ne serai sans aucun doute pas là aujourd'hui. Je n'oublie bien entendu pas ma **Nana** chérie et mon **Titi** d'amour, mon frère et ma sœur, à qui je souhaite énormément de bonheur et de trouver leur voie comme j'ai eu la chance de trouver la mienne.*

*Enfin, je souhaite te remercier toi, **Johan**, de m'avoir accompagnée pendant ces nombreuses années. Depuis mon entrée en 1^{ère} S tu es à mes côtés, me soutenant étapes après étapes sans jamais ni me juger ni m'empêcher de m'épanouir dans un milieu où les heures ne sont pas comptées. Merci, Cœur, de ta grande ouverture d'esprit et de ta tolérance. Ton détachement et ta capacité à relativiser en toutes circonstances tempèrent parfaitement ma très légère prédisposition au stress et à l'angoisse ;-). Tu as été durant ces années de thèse une véritable bouffée d'oxygène me faisant oublier les galères du labo une fois passé le seuil de l'appartement. J'espère que ce chemin que nous avons emprunté ensemble il y a maintenant 10 ans, nous permettra de surmonter les épreuves qui nous attendent et nous mènera toujours plus loin...*

LISTE DES PUBLICATIONS

Publications relatives à ce travail

Vincent, D.F., Gout, J., Chuvin, N., Arfi, V., Pommier, R.M., Bertolino, P., Jonckheere, N., Ripoche, D., Kaniewski, B., Martel, S., et al. (2012). **Tify Suppresses Murine Pancreatic Tumoral Transformation by an Smad4-Independent Pathway.** *Am. J. Pathol.* 180, 2214–2221.

Pommier, R.M., Gout, J., Vincent, D.F., Arfi, V., Alcaraz, L.B., Chuvin, N., Martel, S., Kaniewski, B., Devailly, G., Fourel, G., et al. (2014). **TIF1 γ -Deficiency Promotes Mitotic Chromosomal Instability and Tumor Progression.** *Soumis.*

Autres publications

Pommier, R.M., Gout, J., Vincent, D.F., Cano, C.E., Kaniewski, B., Martel, S., Rodriguez, J., Fourel, G., Valcourt, U., Marie, J.C., et al. (2012). **The human NUPR1/P8 gene is transcriptionally activated by transforming growth factor β via the SMAD signalling pathway.** *Biochem. J.* 445, 285–293.

Gout, J., Pommier, R.M., Vincent, D.F., Ripoche, D., Goddard-Léon, S., Colombe, A., Treilleux, I., Valcourt, U., Tomasini, R., Dufresne, M., et al. (2013). **The conditional expression of KRAS G12D in mouse pancreas induces disorganization of endocrine islets prior the onset of ductal pre-cancerous lesions.** *Pancreatology* 13, 191–195.

Gout, J., Pommier, R.M., Vincent, D.F., Kaniewski, B., Martel, S., Valcourt, U., and Bartholin, L. (2013). **Isolation and culture of mouse primary pancreatic acinar cells.** *J. Vis. Exp.* 1–8.

Valcourt, U., Pommier, R.M., Vincent, D.F., and BARTHOLIN, L. (2014). **Culture primaire de cellules pancréatiques exocrines de souris: un outil indispensable pour la compréhension de l'étiologie de la pancréatite et de la carcinogenèse pancréatique.** In *Culture de Cellules Animales*,

Ripoche, D., Gout, J., Pommier, R.M., Jaafar, R., Zhang, C.X., Bartholin, L., and Bertolino, P. (2012). **Generation of a conditional mouse model to target Acvr1b disruption in adult tissues.** *Genesis* 8, 1–8.

Alcaraz, L.B., Exposito, J.-Y., Chuvin, N., Pommier, R.M., Cluzel, C., Martel, S., SENTIS, S., BARTHOLIN, L., Lethias, C., VALCOURT, U., et al. (2014). **Tenascin-X promotes epithelial-to-mesenchymal transition by activating latent TGF β .** *J. Cell Biol.* 205, 409–428.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ABREVIATIONS.....	17
TABLE DES FIGURES.....	23
AVANT-PROPOS.....	27
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	29
PARTIE I : LE POINT DE CONTROLE DU FUSEAU MITOTIQUE	31
A. PRESENTATION DU CYCLE CELLULAIRE	33
1. Implication des complexes Cycline/CDK	34
2. Bases moléculaires des différentes phases	38
i. Phases G0/G1 et le point de restriction	38
ii. Phase S	39
iii. Phase G2.....	40
iv. Phase M.....	42
B. CONTROLE DE LA DIVISION MITOTIQUE	44
1. Déroulement de la mitose	45
2. Le point de contrôle du fuseau mitotique et la transition métaphase-anaphase ..	47
i. Mise en place du fuseau mitotique et capture des chromosomes.....	48
ii. Activation de la voie de signalisation du SAC, inhibition du complexe APC/C-cdc20 et blocage du cycle cellulaire en métaphase.....	51
iii. Inhibition du SAC et progression du cycle cellulaire en anaphase <i>via</i> l'activité d'APC/C-cdc20	55
3. Le point de contrôle post-mitotique	57
C. LE POINT DE CONTROLE DU FUSEAU MITOTIQUE EN CARCINOGENESE.....	60
1. Inhibition du SAC.....	61
i. Inhibition par mutations sporadiques ou germinales.....	61
ii. Inhibition par des oncoprotéines virales.....	62
2. Surexpression des acteurs du SAC	63

3. Stratégies thérapeutiques	66
i. Tumeurs ayant un SAC fonctionnel	66
ii. Tumeurs au SAC non fonctionnel.....	68
PARTIE II : LA PROTEINE TIF1γ	71
A. STRUCTURE DES PROTEINES DE LA FAMILLE TIF1	73
B. FONCTIONS DE TIF1γ	75
1. Fonction de TIF1 γ dépendante de la voie du TGF β : contrôle de la différenciation cellulaire.....	75
i. Description générale de la voie du TGF β	75
ii. Différenciation des tissus embryonnaires : rôle controversé de TIF1 γ	77
iii. Différenciation hématopoïétique	81
iv. Autres types de différenciation cellulaire.....	85
v. Modèle intégratif du rôle de TIF1 γ dans la voie du TGF β	86
2. Fonctions de TIF1 γ indépendantes de la voie du TGF β	88
i. Réparation de l'ADN et infection virale	88
ii. Contrôle de la prolifération.....	89
C. IMPLICATION DE TIF1γ DANS LE DEVELOPPEMENT TUMORAL	91
OBJECTIF GENERAL DES TRAVAUX DE THESE	95
RESULTATS - DISCUSSION	97
I. RÔLE SUPPRESSEUR DE TUMEUR DE TIF1γ DANS LA TUMORIGENÈSE PANCRÉATIQUE ET IMPLICATION DE LA VOIE DU TGFβ	99
A. INTRODUCTION	101
B. RESULTATS PUBLIES	102
C. RESULTATS COMPLEMENTAIRES NON PUBLIES	103
D. DISCUSSION	108
E. PUBLICATION ORIGINALE	111
II. IDENTIFICATION DE NOUVELLES FONCTIONS CELLULAIRES RÉGULÉES PAR TIF1γ (ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE À GRANDE ÉCHELLE)	121
A. GENERATION DES MEFs PRIMAIRES TIF1γ^{Lox/Lox}	123

B.	FONCTIONS CELLULAIRES ALTEREES EN ABSENCE DE TIF1 γ	125
C.	TIF1 γ ET MITOSE.....	127
III.	IMPLICATION DU POINT DE CONTRÔLE DU FUSEAU MITOTIQUE DANS LES FONCTIONS ONCOSUPPRESSIVES DE TIF1 γ	135
A.	INTRODUCTION.....	137
B.	RESULTATS PUBLIES (SOUMIS)	138
C.	RESULTATS COMPLEMENTAIRES NON PUBLIES.....	140
D.	DISCUSSION	147
E.	PUBLICATION ORIGINALE.....	151
IV.	MATERIEL ET METHODES COMPLEMENTAIRES	195
	Culture cellulaire, transfections et transductions	197
	RT-qPCR (<i>Reverse-Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction</i>).....	198
	Marquages immunofluorescents.....	199
	Test de migration en chambre de Boyden	200
	Croissance cellulaire en agar mou	200
	Puce à ADN.....	200
	Test de l'activité β -galactosidase.....	202
	Marquage par le bleu de toluidine.....	202
	Cytométrie en flux.....	202
	Western blotting	202
	PERSPECTIVES	203
A.	CAUSES ET CONSEQUENCES DE LA PERTE DE TIF1 γ EN CARCINOGENESE, VIA SON IMPLICATION DANS LA PROGRESSION MITOTIQUE	205
B.	ROLE DE TIF1 γ DANS LA DISSEMINATION METASTATIQUE ET L'ANGIOGENESE	208
C.	DETERMINATION DES CIBLES TRANSCRIPTIONNELLES DIRECTES.....	210
D.	IMPLICATION DE L'ACTIVITE E3-UBIQUITINE LIGASE	211
	AUTRES PUBLICATIONS	217
I.	Analyse de l'inductibilité du promoteur <i>hNUPR1</i> par le TGF β	219
ii.	Analyse du compartiment endocrine dans le modèle murin [<i>Pdx1-Cre ; Kras^{G12D}</i>]	233
iii.	Isolation et culture d'acini pancréatiques murins primaires	241

- iv. Génération d'un modèle murin délété de façon conditionnelle pour ALK4..... 273
- v. Activation du TGF β latent par le domaine « *fibrinogen-like* » de la Ténascine X.... 283

ANNEXES BIBLIOGRAPHIQUES 311

PARTIE I : LES POINTS DE CONTROLE DU CYCLE CELLULAIRE ET LA PROGRESSION MITOTIQUE.....313

A. POINTS DE CONTROLE DU CYCLE CELLULAIRE..... 315

- 1. Le point de contrôle des dommages à l'ADN 315
- 2. Le point de contrôle de la réplication 316
- 3. Le point de contrôle de décaténation de l'ADN 317
- 4. Le point de contrôle de l'antéphase 318

B. DIFFERENTES PHASES DE LA MITOSE 319

- 1. Prophase et pro-métaphase 319
- 2. Anaphase 324
- 3. Télophase et cytodierèse..... 325

PARTIE II : LES PROTEINES DE LA FAMILLE TIF1.....327

A. TIF1 α 329

- 1. Fonctions moléculaires et cellulaires 329
- 2. Implication dans le développement tumoral 331

B. TIF1 β 334

- 1. Fonctions moléculaires et cellulaires 334
- 2. Implication dans le développement tumoral 338

C. TIF1 δ 340

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 341

TABLE DES ABREVIATIONS

ADKP : ADénocarcinome Pancréatique
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADP : Adénosine DiPhosphate
ALC1 : Amplified in Liver Cancer 1
ANGPTL4 : ANGIOpoieTin-Like 4
APAF-1 : Apoptotic Protease Activating Factor 1
APC/C : Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome
ARF : Alternate Reading Frame
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : ARN messenger
ARNsi : ARN small interfering
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP : Adénosine TriPhosphate
ATR : ATM and Rad3-related
BAX : BCL-2-Associated X protein
BCL-2 : B-cell Chronic lymphocytic leukemia/Lymphoma-2
β-ME : β-MercaptoEthanol
BMP : Bone Morphogenetic Proteins
B-RAF : v-RAF murine sarcoma viral oncogene homolog B
BUB1/3 : Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1/3
BUBR1 : BUB1-Related protein 1
CAK : CDK-Activating Kinase
CAM : chicken ChorioAllantoic Membrane
CBP : Calmodulin Binding Peptide
CD : Cluster of Differentiation
CDC20/25/28 : Cell Division Cycle 20/25/28
CDH1 : CDC20 Homologue 1
CDK : Cyclin-Dependent Kinase
CENP-A/E/C/P : CENtromeRe Protein-A/E/C/P
CEP57 : CEntrosomal Protein 57 kDa
CHFR : CHeckpoint with Forkhead and RING finger domains
ChIP : Chromatin ImmunoPrecipitation
CHK1/2 : CHeckpoint Kinase 1/2
CIP/KIP : CDK-Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein
CKI : CDK Inhibitor protein
CMML : Chronic MyeloMonocytic Leukemia
C-NAP1 : Centrosomal Nek2-Associated Protein 1
CPC : Chromosome Passenger Complex
CRC : ColoRectal Cancer

Cul1 : Cullin 1
Cy3/5 : Cyanine 3/5
CYK-4 : CYtoKeratin-4 (Rac GTPase-activating protein 1)
DAPI : 4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole
DASH : DUO1 (Death Upon Overproduction protein 1) And MPS1-interacting protein 1 (Dam1)
DDCP : DNA Damage CheckPoint
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA : DeoxyriboNucleic Acid
DRB : 5,6-Dichloro-1-β-D-RibofuranosylBenzimidazole
DSIF : DRB Sensitivity Inducing Factor
E1A : adenovirus Early region 1A
EBNA2 : Epstein-Barr virus Nuclear Antigen 2
EG5 : kinesin-related motor protein EG5 (KIF11)
eGFP : enhanced Green Fluorescent Protein
EGTA : Ethylene Glycol Tetraacetic Acid
EMT : Epithelial-to-Mesenchymal Transition
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
ERV : Endogenous RetroVirus
ESPL1 : Extra Spindle Poles-Like 1
FACT : FACilitates Chromatin Transcription
FAM : FAt facets in Mouse
FDA : Food and Drug Administration
FES : FEline Sarcoma oncogene
FGFR1 : Fibroblast Growth Factor Receptor 1
FOXM1 : FOlkhead boX protein M1
G0/1/2 : Gap 0/1/2
GAPDH : GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase
GATA1 : GATA-binding factor 1 (globin transcription factor 1)
GSC : Goosecoid
GTP : Guanosine TriPhosphate
GTPase : Guanosine TriPhosphatase
HDAC : Histone DeACetylase
HEC1 : Highly Expressed in Cancer 1
HeLa : Henrietta Lacks cell line
Hep3B/G2 : human Hepatocellular carcinoma 3B/G2
HMEC : Human Mammary Epithelial Cells
HP1 : Heterochromatin Protein 1
HPLC : High-Performance Liquid Chromatography
HPRT : Hypoxanthine-guanine PhosphoRibosylTransferase
HRAS : Harvey RA Sarcoma viral oncogene homolog
HST2P : Homologue of SirT2 Protein
HTLV : Human T-cell Leukemia Virus
Huh7 : Human hepatoma 7
ID : Inhibitor of DNA binding

IgG : Immunoglobulines de type G
INCENP : INner CENtromere Protein
INK4A/B/C/D : INhibitor of CDK4A/B/C/D
iNKT : invariant Natural Killer T
IPMN : Intraductal Papillary Mucinous Neoplasia
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
JNK : c-Jun N-terminal Kinase
KAP1 : Krüppel-associated box domain-Associated Protein-1
KD : KnockDown
KIF6/23 : KInesin Family member 6/23
KRAB : KRüppel Associated Box
KRAS : Kirsten RAt Sarcoma viral oncogene homolog
KRIP-1 : KRAB-A-Interacting Protein 1
LTR : Long Terminal Repeat
M : Mitosis
MAD1/2 : Mitotic Arrest Deficient 1/2
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MAT1 : Menage A Trois 1 (CAK Assembly Factor)
MCC : Mitotic Checkpoint Complex
MCF10A : Michigan Cancer Foundation 10A
MCM : MiniChromosome Maintenance complex
MDM2 : Mouse Double Minute 2 homolog
MEF : Mouse Embryonic Fibroblasts
mESC : mouse Embryonic Stem Cells
MI-2/NuRD : MI-2/Nucleosome Remodeling Deacetylase
MIP1 : MPS1 Interacting Protein-1
MIXL1 : MIX-Like homeobox protein 1
MKLP1 : Mitotic Kinesin-Like Protein 1
MOI : Multiplicity Of Infection
MMR : Methyl-directed Mismatch Repair
MMTV : Mouse Mammary Tumor Virus
MPF : Mitosis-Promoting Factor
MPS1 : MonoPolar Spindle 1
MRE11 : Meiotic REcombination 11 homolog A
MRN : Mre11, Rad50 and Nbs
MYT1 : MYelin Transcription factor 1
NANOG : Nanog homeobox
NBS : Nijmegen Breakage Syndrome
NEAA : Non-Essential Amino-Acids
NEBD : Nuclear Envelope BreakDown
NEK2 : NIMA (Never In Mitosis gene A)-related Kinase 2
NER : Nucleotide Excision Repair
NFκB : Nuclear Factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells
NMuMG : Normal Murine Mammary Gland
NR : Nuclear Receptor

NuMA : Nuclear Mitotic Apparatus protein
OCT4 : OCTamer-binding transcription factor 4
ORC : Origin Recognition Complex
PAF : Pol II-Associated Factor
PARP : Poly ADP-Ribose Polymerase
PBK : PDZ Binding Kinase
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCM : PeriCentriolar Material
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDX1 : Pancreatic and Duodenal homeoboX 1
PDZ : Post synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor, and Zonula occludens-1 protein
PHD : Plant HomeoDomain
PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase
PKC : Protein Kinase C
PLK1 : Polo-Like Kinase 1
PP1/2A : Protein Phosphatase 1/2A
pTEFb : positive Transcription Elongation Factor b
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
PUMA : P53 Upregulated Modulator of Apoptosis
RAD3 : role of RADiation repair 3
RAF : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAS : RAt Sarcoma
Rb : RetinoBlastoma
RBCC : RING finger, B-box, Coiled-Coil
RCP : Replication CheckPoint
RET : REarranged during Transfection
RING : Really Interesting New Gene
RPA : Replication Protein A
S : Synthesis
SAC : Spindle Assembly Checkpoint
SCF : Skp1/Cul1/F-box protein
SCL : Stem Cell Leukemia
SETDB1 : SET (Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax) Domain, Bifurcated 1
SGO1 : ShuGOshin 1
shARN : short hairpin ARN
SirT2 : SirTuin 2
Skp1 : S-phase kinase-associated protein 1
SMAD2/3/4 : Sma (Small body size) Mothers Against Decapentaplegic homolog 2/3/4
SMC2/4 : Structural Maintenance of Chromosome 2/4
SNAI1 : Snail Homolog 1 (Drosophila)
SNON : Ski-related NOvel protein N
SOX2 : SRY (Sex determining Region Y)-bOX 2
STAT5 : Signal Transducer and Activator of Transcription 5
SV40 : Simian Virus 40

SVF : Sérum de Veau Fœtal
SWI6 : SWItching deficient 6
TAME : Tosyl-L-Arginine Methyl Ester
Tax : Transactivator of pX
TβRI/II : TGFβ Receptor I/II
TCGA : The Cancer Genome Atlas
TEV : Tobacco Etch Virus
TGFβ : Transforming Growth Factor β
TIF1γ : Transcriptional Intermediary Factor 1 γ
TRF2 : Telomeric Repeat-binding Factor 2
TRIM : TRiPartite Motif
TSS : TIF1 Signature Sequence
UBC9 : UBiquitin-Conjugating enzyme 9
USP9x : Ubiquitin Specific Peptidase 9, X-linked
WAF1 : Wild-type p53-Activated Fragment 1
WAP : Whey Acidic Protein
X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside
ZEB1 : Zinc finger E-box-Binding homeobox 1

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation des différentes phases du cycle cellulaire et de l'activité des complexes Cycline/CDK.....	33
Figure 2 : Régulation des complexes Cycline/CDK par modifications post-traductionnelles et séquestration cytosolique.	35
Figure 3 : Régulation des complexes Cycline/CDK par les CKI : familles CIP/KIP et INK4.....	36
Figure 4 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la transition G1/S et le point de restriction	38
Figure 5 : Mécanismes moléculaires impliqués dans l'initiation de la réplication de l'ADN et la duplication de centrosomes au cours de la phase S.....	39
Figure 6 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la progression du cycle en phase G2	40
Figure 7 : Mécanismes moléculaires de la phase G2 impliqués dans l'activation du complexe Cycline B/CDK1 nécessaire à la progression du cycle cellulaire en phase M.....	41
Figure 8 : Mécanismes moléculaires de la division mitotique.....	42
Figure 9 : Représentation de l'activité des différents points de contrôle du cycle cellulaire.....	44
Figure 10 : Les différentes étapes de la mitose	46
Figure 11 : Activité du point de contrôle du fuseau mitotique au cours de la mitose.....	47
Figure 12 : Représentation du fuseau mitotique et des différents types de microtubules qui le composent	48
Figure 13 : Modèles de capture des kinétochores par le fuseau mitotique.....	49
Figure 14 : Différents types d'associations observées entre les microtubules et les kinétochores.	50
Figure 15 : Détection des associations non-amphitéliques et détachement des microtubules	51
Figure 16 : Mécanismes moléculaires d'activation du SAC au niveau des kinétochores	52

Figure 17 : Mécanismes moléculaires du SAC et inhibition du complexe APC/C.	53
Figure 18 : Inhibition du SAC suite à la capture des kinétochores par le fuseau mitotique.	55
Figure 19 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la ségrégation des chromatides sœurs et la progression mitotique	56
Figure 20 : Différents substrats d'APC/C au cours de la progression mitotique	56
Figure 21 : Mécanismes moléculaires d'activation du point de contrôle post-mitotique	57
Figure 22 : Mécanismes moléculaires permettant le blocage du cycle cellulaire par le point de contrôle post-mitotique	58
Figure 23 : Surexpression des protéines du SAC dans de nombreuses néoplasies humaines.....	64
Figure 24 : Différents domaines fonctionnels des protéines TIF1	73
Figure 25 : Voie de signalisation canonique du TGF β	76
Figure 26 : Régulation négative de la voie du TGF β par TIF1 γ : ubiquitination de SMAD4	78
Figure 27 : Régulation positive de la voie du TGF β par TIF1 γ : accessibilité du complexe SMAD2/3/4 aux régions promotrices des <i>poised genes</i> impliqués dans la différenciation mésendodermique.....	80
Figure 28 : Différents rôles de TIF1 γ dans la différenciation des tissus embryonnaires et la voie du TGF β en fonction des espèces.....	81
Figure 29 : Implication de TIF1 γ dans l'élongation de la transcription des <i>poised genes</i>	83
Figure 30 : Régulation de la différenciation hématopoïétique par le TGF β : rôles des complexes SMAD2/3/TIF1 γ et SMAD2/3/4.....	85
Figure 31 : Modèle intégratif du rôle de TIF1 γ dans la voie de signalisation du TGF β	87
Figure 32 : Remaniements génétiques du locus 1p13.1 contenant le gène codant TIF1 γ dans différentes néoplasies humaines	92

Figure 33 : Dualité fonctionnelle du TGF β et de TIF1 γ au cours de la progression tumorale	94
Figure 34 : TIF1 γ inhibe l'EMT médiée par l'axe TGF β -SMAD4	103
Figure 35 : L'inactivation stable de TIF1 γ dans les cellules NMuMG entraîne une sensibilité accrue à l'EMT induite par le TGF β	105
Figure 36 : L'inactivation stable de TIF1 γ entraîne une augmentation des propriétés migratoires des cellules NMuMG.....	105
Figure 37 : TIF1 γ et SMAD4 exercent des effets suppresseurs de tumeurs indépendants dans les NMuMG transformées par Hras ^{V12}	106
Figure 38 : Génération de MEFs primaires délétées pour <i>Tif1γ</i>	124
Figure 39 : Classification fonctionnelle des différents gènes dérégulés en absence de TIF1 γ	126
Figure 40 : Classification fonctionnelle des gènes surexprimés en absence de TIF1 γ	127
Figure 41 : La perte de TIF1 γ entraîne, précocement, un blocage du cycle cellulaire en mitose associé à un arrêt de prolifération et à une augmentation de la sénescence dans les MEFs primaires.....	141
Figure 42 : La perte de TIF1 γ entraîne, précocement, un blocage du cycle cellulaire en mitose associé à un arrêt de prolifération et à une augmentation de la sénescence dans les MEFs immortalisées.....	143
Figure 43 : Analyse transcriptionnelle par RT-qPCR de cellules inactivées pour TIF1 γ en comparaison des cellules contrôles.....	144
Figure 44 : Modèle intégratif du rôle de TIF1 γ au cours de la transformation et de la progression tumorale	150
Figure 45 : La perte de TIF1 γ favorise la formation de vaisseaux sanguins péri-tumoraux et entraîne une augmentation de l'expression du facteur Angptl4.....	209
Figure 46 : Représentation de la protéine TIF1 γ mutée pour son activité E3-Ubiquitine ligase	211
Figure 47 : Action de la Cre recombinase sur les sites LoxP en fonction de leur orientation.....	213

Figure 48 : Stratégie de recombinaison du modèle murin Flex.....	213
Figure 49 : Criblage d'interactants protéiques par la technique du « Tap-Tag ».....	215
Figure 50 : Mécanismes moléculaires du point de contrôle des dommages à l'ADN.	315
Figure 51 : Mécanismes moléculaires du point de contrôle de la réplication.....	316
Figure 52 : Mécanismes moléculaires permettant la séparation des centrosomes	319
Figure 53 : Migration des centrosomes.....	320
Figure 54 : Mécanismes moléculaires permettant la condensation de l'ADN	321
Figure 55 : Régulation de p53 par TIF1 α	331
Figure 56 : Implication de TIF1 β dans la répression transcriptionnelle médiée par les KRABs.	335
Figure 57 : Implication de TIF1 β dans la réparation des dommages à l'ADN : décondensation de la chromatine.....	336
Figure 58 : Régulation de p53 et E2F par TIF1 β	337

AVANT-PROPOS

Le TGF β (*Transforming Growth Factor beta*) est un facteur sécrété dont la concentration intra-tumorale augmente avec le grade et le stade des tumeurs, et dont la voie de signalisation est altérée dans de nombreuses néoplasies, notamment dans 100 % des cancers pancréatiques. La signalisation intracellulaire du TGF β peut être modulée par différents facteurs membranaires, cytoplasmiques ou nucléaires. Parmi ces facteurs, TIF1 γ (*Transcriptional Intermediary Factor 1 gamma*) est une protéine nucléaire de 1127 acides aminés possédant plusieurs domaines fonctionnels : un domaine E3-Ubiquitine ligase (RING finger) et différents domaines impliqués dans la régulation de la transcription ou les interactions protéine-protéine (B-box, Coiled-Coil, PHD et Bromodomaine).

L'adénocarcinome du pancréas (ADKP) représente plus de 90 % des tumeurs pancréatiques. Cette tumeur très agressive (survie à 5 ans inférieure à 3 %) constitue la 5^{ème} cause de mortalité par cancer en France (après le poumon, le côlon, le sein et la prostate) et est résistante à tous les traitements chimiothérapeutiques actuels. Afin de mieux appréhender le développement de cette pathologie et pouvoir proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques, notre équipe s'intéresse aux mécanismes moléculaires responsables de la transformation et de la progression tumorale de l'ADKP.

Dans ce contexte, notre équipe a été la première à démontrer en 2009, grâce à l'utilisation de modèles murins, que *TIF1 γ* était un gène suppresseur de tumeur dans le pancréas, cet effet ayant ensuite été confirmé par d'autres équipes dans des tumeurs hépatiques et certaines leucémies. De plus, le locus 1p13.1 contenant le gène *TIF1 γ* est remanié dans différentes néoplasies dont les tumeurs du sein, les cancers bronchiques, les cancers de la thyroïde, ainsi que certaines leucémies. Néanmoins, les mécanismes moléculaires par lesquels TIF1 γ exerce ses fonctions anti-tumorales sont, à ce jour, méconnus. Ainsi, l'objectif de ma thèse était d'identifier les fonctions oncosuppressives de TIF1 γ dans le pancréas, mais également d'une manière générale dans d'autres tissus.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Mes travaux de thèse ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires responsables des effets suppresseurs de tumeur de TIF1 γ . Sa perte d'expression *in vitro* et *in vivo* entraîne :

- une augmentation des **propriétés invasives** des cellules tumorales *via* son rôle dans la **transition épithélio-mésenchymateuse** médiée par la voie de signalisation du **TGF β** .
- l'émergence de cellules aneuploïdes présentant une forte **instabilité chromosomique**, *via* son implication dans la progression mitotique et la régulation **du point de contrôle du fuseau mitotique**.

Cette introduction bibliographique abordera, dans un premier temps, les bases moléculaires de la **progression du cycle cellulaire** (paragraphe I-A), en se focalisant ensuite sur la **mitose** et le **point de contrôle du fuseau mitotique** (paragraphe I-B) dont la dérégulation intervient fréquemment dans les processus de **tumorigenèse** (paragraphe I-C). Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons à la protéine **TIF1 γ** (paragraphe II-A) en décrivant ses **différentes fonctions**, dépendantes ou indépendantes de la voie du TGF β (paragraphe II-B), ainsi que son implication dans la carcinogenèse (paragraphe II-C).

Des annexes bibliographiques sont disponibles à la fin de ce manuscrit. Elles ne sont pas indispensables à la compréhension du manuscrit mais apportent néanmoins des informations permettant d'approfondir certains aspects brièvement évoqués dans la partie introductive : les points de contrôle du cycle cellulaire et les différentes phases de la mitose (paragraphe I des annexes bibliographiques) et les fonctions des protéines de la famille TIF1 ainsi que leur implication dans le développement tumoral (paragraphe II des annexes bibliographiques). J'ai, en effet, choisi de ne pas inclure le contenu de ces annexes dans la partie bibliographique principale car cette dernière aurait perdu en clarté et en fluidité. La lecture de ces annexes est donc laissée à la discrétion du lecteur qui, s'il le souhaite, peut s'y référer pour obtenir plus de détails.

PARTIE I :
LE POINT DE CONTROLE DU FUSEAU
MITOTIQUE

Comme indiqué précédemment, cette partie s'intéressera, dans un premier temps, à la **progression** du cycle cellulaire au cours des différentes phases (paragraphe I-A). Puis, nous aborderons plus particulièrement les mécanismes moléculaires du **point de contrôle du fuseau mitotique** dont l'activité est indispensable à la ségrégation équitable des chromatides sœurs lors de la division cellulaire (paragraphe I-B). Enfin, nous étudierons l'implication de ce point de contrôle dans le développement tumoral et discuterons des différentes **stratégies thérapeutiques** ciblant son activité pour bloquer le cycle cellulaire des cellules cancéreuses (paragraphe I-C).

A. Présentation du cycle cellulaire

La division cellulaire est un processus ubiquitaire et fortement conservé au cours de l'évolution, classiquement très actif au niveau des cellules embryonnaires et des cellules peu différenciées chez l'adulte. Au cours des divisions successives intervenant pendant l'embryogenèse, la plupart des cellules vont se différencier afin de former les nombreux organes et tissus composant l'organisme adulte, spécialisation généralement associée à une diminution des capacités de prolifération. Une minorité de cellules, qualifiées de cellules « souches » adultes, conserveront un certain potentiel réplicatif, ainsi que des caractéristiques de multipotence, afin d'assurer le renouvellement des tissus et donc compenser la mort des cellules différenciées de l'organisme adulte. La dérégulation du cycle cellulaire et la reprise d'une prolifération active au niveau des cellules adultes différenciées sont à la base des phénomènes de transformation tumorale et du développement de pathologies néoplasiques.

Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases distinctes aboutissant à la naissance de deux cellules filles issues d'une seule cellule mère (**Figure 1**).

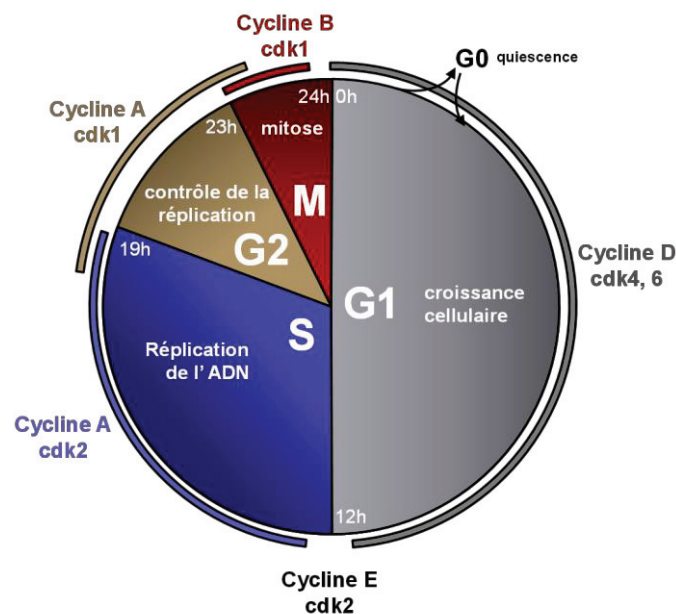


Figure 1 : Représentation des différentes phases du cycle cellulaire et de l'activité des complexes Cycline/CDK.

Pour cela, deux événements essentiels interviennent : la réplication fidèle du contenu en ADN de la cellule mère et la répartition équitable de ce matériel génétique entre les deux cellules filles. Ces événements représentent les deux phases principales du cycle

cellulaire : la phase S (Synthèse) et la phase M (Mitose). Les deux autres phases, G1 et G2 (Gap), sont des intervalles permettant à la cellule de se préparer, soit à la réplication de l'ADN pour la phase G1, soit à la division cellulaire pour la phase G2. Il existe également une cinquième phase, **la phase G0**, correspondant à une phase de quiescence cellulaire. Les phases G0, G1, S et G2 se caractérisent par un matériel génétique décondensé et appartiennent ainsi à l'interphase, par opposition à la phase M de mitose, où les chromosomes sont condensés afin de permettre la séparation des chromatides sœurs (Pollard and Earnshaw, 2004; Vermeulen et al., 2003).

1. Implication des complexes Cycline/CDK

Chaque phase du cycle cellulaire est associée à la formation de complexes protéiques spécifiques associant une protéine **Cycline** à une protéine **CDK** (*Cyclin-Dependent Kinase*) (**Figure 1**). Les complexes Cycline-CDK possèdent une activité kinase et sont responsables de l'avancée du cycle cellulaire *via* la phosphorylation de leurs différents substrats.

Historiquement, l'association Cycline/CDK a été mise en évidence chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, où une seule CDK (*cdc28*) intervient tout au long du cycle cellulaire, en association avec différentes Cyclines (Malumbres and Barbacid, 2009). Chez l'Homme, les CDK et les Cyclines sont codées respectivement par 13 et 25 loci différents. Néanmoins, seulement certaines d'entre elles sont classiquement impliquées dans la progression du cycle cellulaire (les CDKs 1, 2, 4, 6 et 7 et les Cyclines A, B, D, E et H) (Malumbres and Barbacid, 2005).

Tandis que les CDK sont exprimées de façon constitutive tout au long du cycle cellulaire, l'expression des Cyclines varie en fonction des différentes phases (Evans et al., 1983; Murray, 2004). Ainsi, la formation du complexe Cycline/CDK est subordonnée à l'expression de la Cycline et permet d'induire l'activité kinase intrinsèque du CDK : l'interaction Cycline-CDK entraîne un changement conformationnel des CDK permettant l'ouverture de leur poche ATP (indispensable à l'activité kinase), ainsi que l'accessibilité au site de fixation des substrats phosphorylables (Coqueret, 2002).

L'activité enzymatique de ces complexes est régulée par diverses modifications post-traductionnelles : phosphorylations/déphosphorylations et ubiquitination (**Figure 2**).

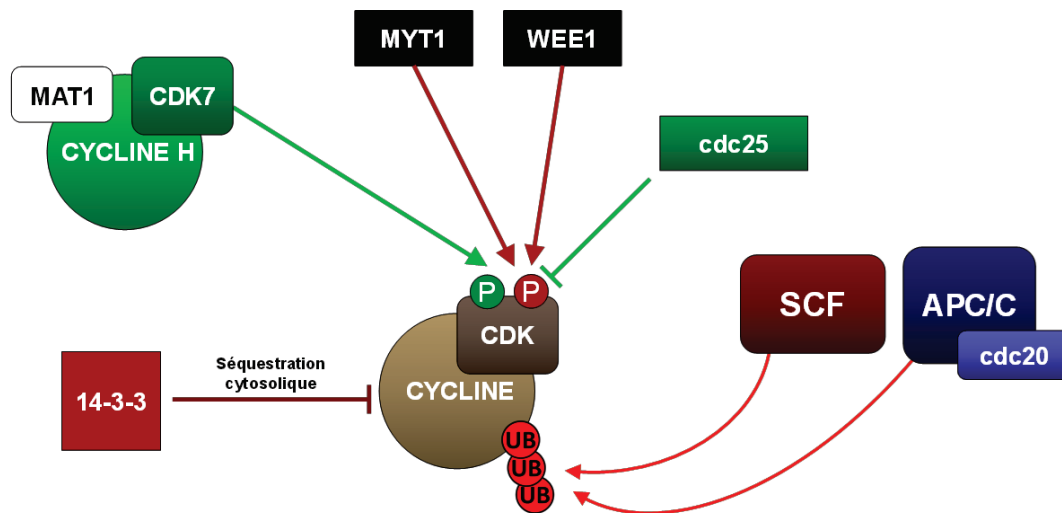


Figure 2 : Régulation des complexes Cycline/CDK par modifications post-traductionnelles et séquestration cytosolique (P: phosphorylation activatrice ; P: phosphorylation inhibitrice ; UB: ubiquitination).

En effet, **l'activité kinase** des complexes Cycline/CDK n'est pas seulement induite suite à leur interaction physique, mais est également dépendante des **phosphorylations activatrices** de certains des résidus thréonines des CDK, par un autre complexe Cycline/CDK appelé **CAK** (*CDK-Activating Kinase*). Ce complexe est composé de la **Cycline H** associée à la kinase **CDK7** ainsi qu'à la protéine **MAT1**, cette dernière permettant l'activité kinase constitutive de ce complexe Cycline/CDK (Fisher, 2012; Inamoto et al., 1997; Pines, 1995; Vermeulen et al., 2003).

Des **phosphorylations inhibitrices** interviennent au niveau des résidus thréonine 14 ou tyrosine 15 des CDK *via* l'activité kinase des protéines **Wee1** et **Myt1**. Ces phosphorylations inhibitrices peuvent être révertées par les phosphatases **cdc25** jouant ainsi un rôle clé dans l'activation des complexes Cycline/CDK (Chin and Yeong, 2010; Poehlmann and Roessner, 2010; Pommier et al., 2010).

L'inhibition des complexes Cycline/CDK s'effectue également *via* **l'activité ubiquitine ligase** des complexes **APC/C-cdc20** (*Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome*) et **SCF** (*Skp1/Cul1/F-box protein*) entraînant la poly-ubiquitination et la dégradation, respectivement, des Cyclines A/B et D/E par le protéasome (Lin et al., 2006; Massagué, 2004; Reed, 2003; Vodermaier, 2004).

Enfin, certains complexes Cycline/CDK sont inhibés par **séquestration cytosolique**. C'est le cas du complexe Cycline B/CDK1 dont la localisation nucléaire, indispensable à ses

fonctions, est inhibée par le groupe de protéines **14-3-3** en réponse, notamment, à la détection de dommages à l'ADN (Graves et al., 2001; Pietenpol and Stewart, 2002; Pines, 1999; Vermeulen et al., 2003).

En plus de la régulation par des phosphorylations inhibitrices, des processus d'ubiquitination ou de séquestration cytosolique, d'autres protéines peuvent inhiber l'avancée du cycle cellulaire par **interaction directe** avec les CDK. Ces protéines sont qualifiées de **CKI (CDK Inhibitor protein)** et ont la capacité d'interagir avec la partie non catalytique des CDK, induisant ainsi un changement conformationnel qui altère leur site de liaison aux Cyclines et limite leur affinité pour l'ATP (Johnson and Walker, 1999; Ortega et al., 2002). C'est le cas des protéines **CIP/KIP (CDK-Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein)** et **INK4 (INhibitor of CDK4)** (**Figure 3**).

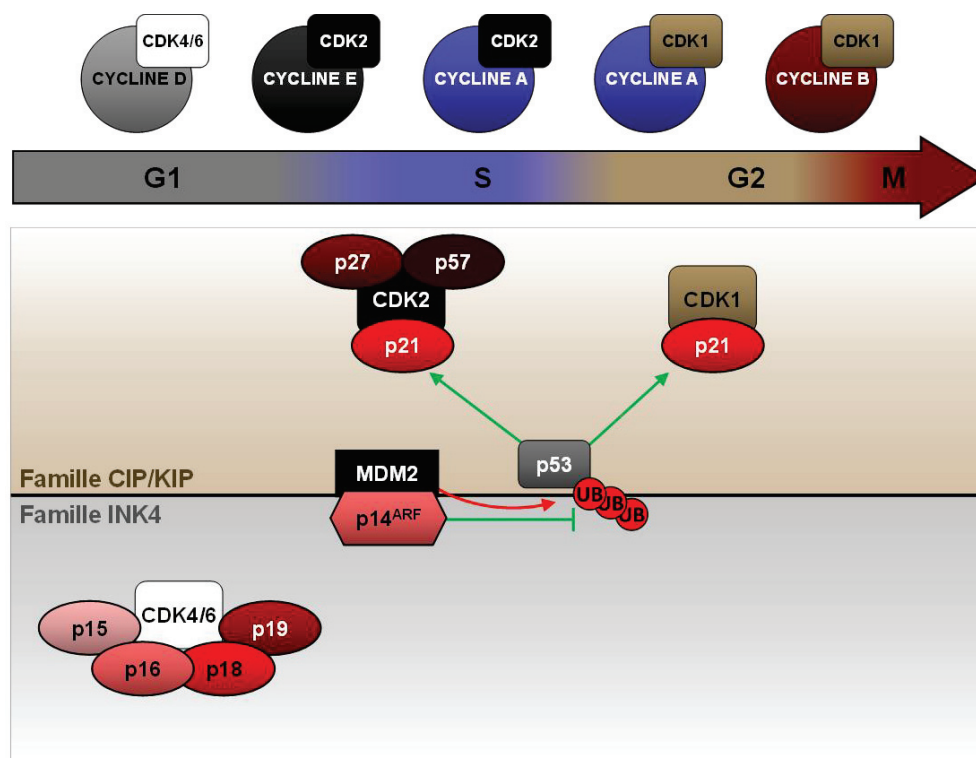


Figure 3 : Régulation des complexes Cycline/CDK par les CKI : familles CIP/KIP et INK4 (UB: ubiquitination).

La famille CIP/KIP est composée de 3 membres : **p21** (WAF1/CIP1), **p27** (CIP2) et **p57** (KIP2) pouvant intervenir à toutes les étapes du cycle cellulaire afin de stopper sa progression. **La protéine p21** inhibe le cycle cellulaire (**1**) en interagissant avec les

complexes Cycline E-A/CDK2 et Cycline A-B/CDK1 et **(2)** en inhibant l'expression de la protéine PCNA, impliquée dans la réplication de l'ADN (Johnson and Walker, 1999; Maddika et al., 2007; Vermeulen et al., 2003; Waga et al., 1994). L'expression de p21 est transcriptionnellement induite par p53 en réponse à la détection de dommage à l'ADN, ainsi que par la stimulation de facteurs cytotostatiques tels que le TGF β (Massagué, 2004; Pietenpol and Stewart, 2002). **P27 et p57** inhibent préférentiellement le complexe Cycline E/CDK2, contrôlant ainsi la progression G1/S (Blagosklonny and Pardee, 2002; Guo et al., 2010, 2011). De façon intéressante, il a été décrit qu'un faible niveau d'expression des protéines CIP/KIP permettait l'assemblage et l'activation des complexes Cycline D/CDKs. En effet, il a été mis en évidence que les fibroblastes déficients pour p21 et p27 présentaient une forte réduction de l'expression protéique de la Cycline D associée à une diminution de la formation des complexes Cycline D/CDKs, limitant la phosphorylation de leur substrats (Bagui et al., 2000; Cheng et al., 1999). Ainsi, ces inhibiteurs du cycle cellulaire peuvent également se comporter en tant qu'activateurs en fonction de leur niveau d'expression (Blagosklonny and Pardee, 2002; Ortega et al., 2002).

La famille de protéines INK4 est codée par 4 gènes différents : *p16 (INK4A)*, *p15 (INK4B)*, *p18 (INK4C)* et *p19 (INK4D)* (**Figure 3**). A la différence des protéines CIP/KIP qui peuvent intervenir tout au long du cycle cellulaire, les protéines INK4 jouent un rôle primordial dans la régulation du cycle cellulaire en phase G1, *via* l'inhibition des kinases CDK4 et CDK6. Les protéines INK4 sont classiquement induites suite à un excès de facteurs mitogéniques tels que Ras (notamment pour *p16^{INK4A}*), ou en réponse à des facteurs cytotostatiques tels que le TGF β (pour la protéine *p15^{INK4B}*) (Blagosklonny and Pardee, 2002; Hannon and Beach, 1994; Massagué, 2004). Le gène codant *p16^{INK4A}* peut produire un variant d'épissage, la protéine *p14^{ARF}* (*Alternate Reading Frame*), qui n'est pas exprimée en condition physiologique, mais sous l'effet d'un stress oncogénique (Guan et al., 1994; Herkert et al., 2010; Zindy et al., 2003). Contrairement aux protéines INK4, *p14^{ARF}* n'interagit pas avec les kinases CDK, ce n'est donc pas une CKI. En effet, *p14^{ARF}* inhibe le cycle cellulaire en formant un complexe avec l'E3-Ubiquitine ligase MDM2, protégeant p53 de la poly-ubiquitination et de la dégradation par le protéasome et permettant ainsi l'induction transcriptionnelle du CKI p21 (Maddika et al., 2007).

2. Bases moléculaires des différentes phases

i. Phases G0/G1 et le point de restriction

La majorité des cellules constituant les organismes eucaryotes supérieurs sont en état de quiescence, en phase G0. Durant cette phase, les cellules ne prolifèrent pas mais sont fortement actives sur le plan transcriptionnel, traductionnel et métabolique (Vermeulen et al., 2003). L'avenir d'une cellule quiescente est dicté par divers stimuli extracellulaires (facteurs de croissance ou de différenciation, apport en nutriments et en oxygène, facteurs de stress...) qui vont donc déterminer son devenir : rester en quiescence, se différencier ou proliférer. Dans le cas de l'initiation d'un nouveau cycle prolifératif, la cellule entre alors en phase G1, durant laquelle les premiers complexes activés seront les complexes Cycline D/CDK4 et Cycline D/CDK6. Ceux-ci seront responsables de l'avancée du cycle en permettant à la cellule de passer une étape cruciale : **le point de restriction**. Ce dernier intervient en fin de phase G1 et correspond à une étape au-delà de laquelle la poursuite du cycle cellulaire devient indépendante de l'environnement extracellulaire (Figure 4) (Planas-Silva and Weinberg, 1997).

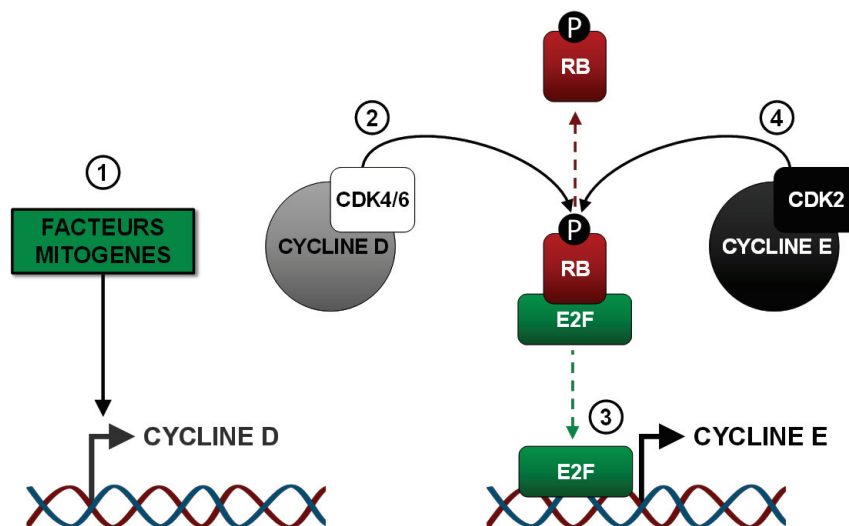


Figure 4 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la transition G1/S et le point de restriction (P: phosphorylation).

La présence de facteurs à activité mitogène dans le milieu extracellulaire active différentes voies de signalisation (PI3K, RAS, STAT, NFκB...) permettant la transcription de la Cycline D, et ainsi l'activation des complexes Cycline D/CDK4 et Cycline D/CDK6

(Bretones et al., 2014; Coqueret, 2002; Massagué, 2004; Sears and Nevins, 2002). Ces derniers phosphorylent les membres de la famille **Rb** (*Retinoblastoma*) composée de 3 protéines (p105, p107 et p130) et favorisent leur dissociation du facteur de transcription E2F qui initie alors la transcription de divers acteurs indispensables à la poursuite du cycle cellulaire, dont la Cycline E (Giacinti and Giordano, 2006; Lipinski and Jacks, 1999). Celle-ci s'associe à CDK2 et phosphoryle, à son tour, le complexe pRb/E2F. Le complexe Cycline E/CDK2 initie, par conséquent, sa propre transcription : une boucle d'auto-activation se met en place. Le passage du point de restriction correspond au moment où la synthèse de la Cycline E devient indépendante de la Cycline D et donc des facteurs de croissance extracellulaires (Blagosklonny and Pardee, 2002; Massagué, 2004; Ortega et al., 2002).

ii. Phase S

La phase S correspond à la phase de Synthèse permettant la duplication du contenu en ADN de la cellule, ainsi que la duplication des centrosomes. Au niveau moléculaire, le facteur de transcription E2F, activé par le complexe Cycline E/CDK2, permet la transcription de la Cycline A, ainsi que celle de divers acteurs de la réplication de l'ADN (ORC, *Origin Recognition Complex*, MCM, *MiniChromosome Maintenance complex*, PCNA, *Proliferating Cell Nuclear Antigen*, ADN polymérase α ...) (**Figure 5**) (Fukasawa, 2005; Massagué, 2004; Stevaux and Dyson, 2002; Woo and Poon, 2003).

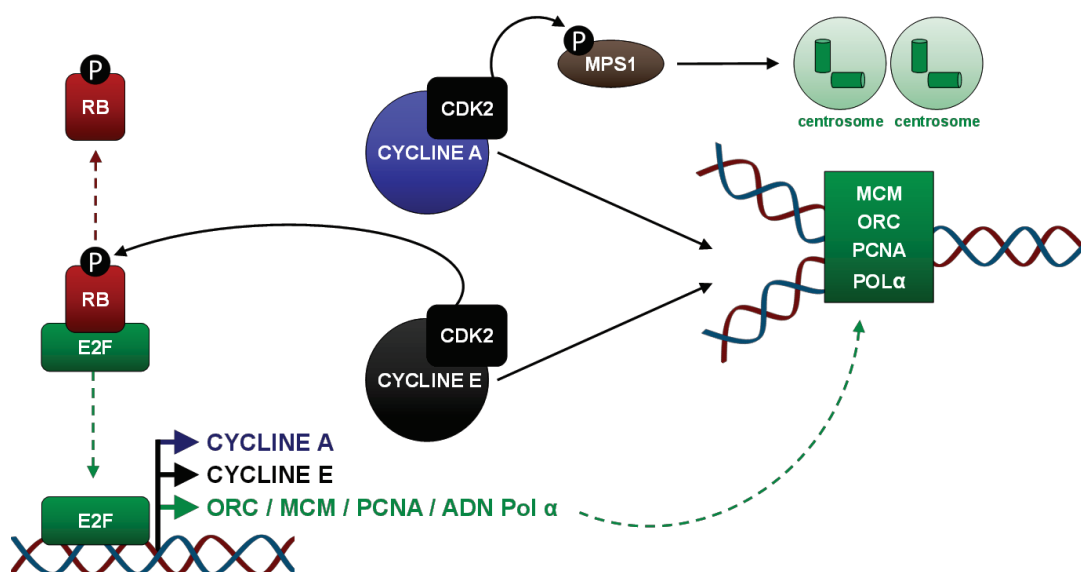


Figure 5 : Mécanismes moléculaires impliqués dans l'initiation de la réplication de l'ADN et la duplication de centrosomes au cours de la phase S (P : phosphorylation).

Les complexes Cycline A/CDK2 et Cycline E/CDK2 activent les origines de réplication en phosphorylant différentes protéines impliquées dans la mise en place du complexe de réplication (Hochegger et al., 2008; Woo and Poon, 2003). Ils permettent également d'initier la duplication des centrosomes notamment *via* la phosphorylation activatrice de la kinase MPS1 (*MonoPolar Spindle 1*) (Hinchcliffe, 1999; Kasbek et al., 2007; Lacey et al., 1999; Liu and Winey, 2012; Matsumoto et al., 1999; Meraldi et al., 1999).

Le complexe Cycline A/CDK2 assure ensuite la progression du cycle cellulaire en phase G2 en activant le complexe Cycline A/CDK1, ainsi que les phosphatases **cdc25b** et **cdc25c** responsables de l'avancée du cycle *via* la déphosphorylation activatrice de CDK1 (**Figure 6**) (Mitra and Enders, 2004; Pines, 1995; Xu et al., 1994). De plus, le complexe Cycline A/CDK2 inactive les facteurs d'initiation de la phase S (E2F et le complexe Cycline E/CDK2) par phosphorylation, permettant ainsi leur reconnaissance et donc leur dégradation par un complexe protéique ayant une activité E3-Ubiquitine ligase constitutive : l'enzyme SCF (*Skp1/Cul1/F-box protein*) (Lin et al., 2006; Pollard and Earnshaw, 2004; Reed, 2003).

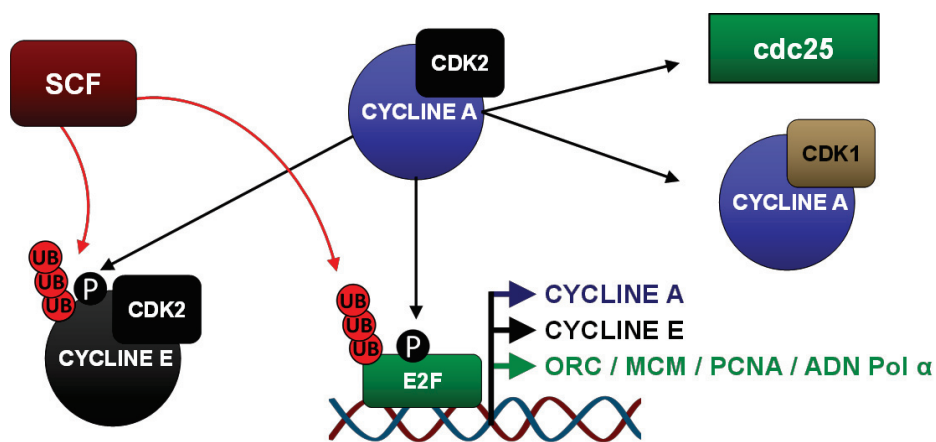


Figure 6 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la progression du cycle en phase G2 (P: phosphorylation ; UB: ubiquitination).

iii. Phase G2

Après duplication de son ADN, la cellule entre en phase G2, étape de préparation à la division mitotique. La principale fonction de celle-ci est de vérifier que le matériel génétique ait été entièrement répliqué (grâce à la détection de fourches de réplication résiduelles), sans altération génétique (cassure simple ou double brin,

mésappariement...), avant l'étape de mitose (Pollard and Earnshaw, 2004). La duplication des centrosomes s'achève durant cette phase (Doxsey et al., 2005). Les complexes Cycline/CDK majoritaires de la phase G2 sont la **Cycline A/CDK1** et la **Cycline B/CDK1**, ce dernier étant également appelé **MPF** (*Mitosis-Promoting Factor*) compte-tenu de son rôle primordial dans l'initiation de la mitose. La transcription de la Cycline B est induite par la protéine **FOXM1**, permettant également la transcription de nombreux gènes mitotiques tels que celui codant la kinase **PLK1** (*Polo-Like Kinase 1*), suite à sa phosphorylation par le complexe Cycline A/CDK1 (**Figure 7**) (Alvarez-Fernández et al., 2010; Laoukili et al., 2005, 2008).

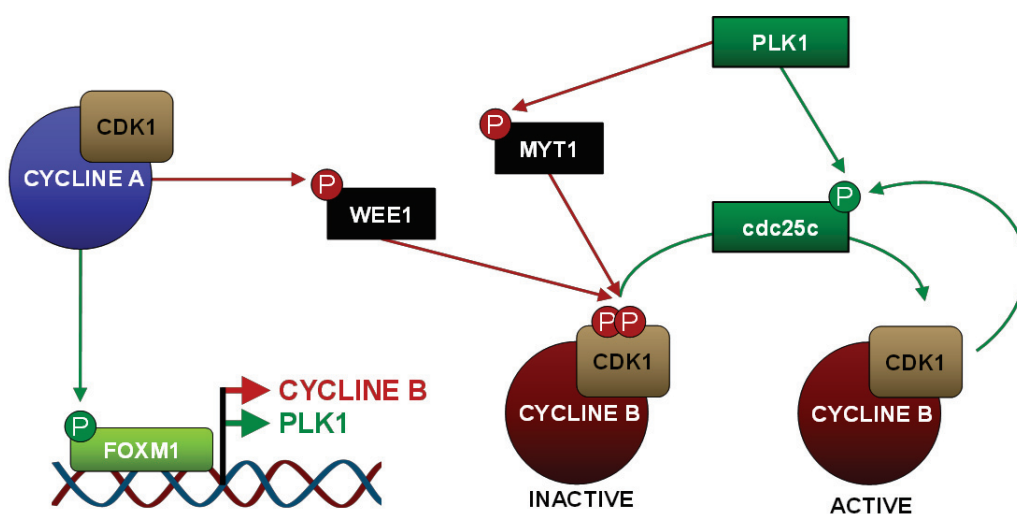


Figure 7 : Mécanismes moléculaires de la phase G2 impliqués dans l'activation du complexe Cycline B/CDK1 nécessaire à la progression du cycle cellulaire en phase M (P: phosphorylation activatrice ; P: phosphorylation inhibitrice).

Pendant la phase G2, le complexe Cycline B/CDK1 est inactivé *via* des phosphorylations inhibitrices des kinases **WEE1** (phosphorylation sur la tyrosine 15 de CDK1) et **MYT1** (phosphorylation sur la thréonine 14 et la tyrosine 15 de CDK1) (Graves et al., 2001). Le complexe Cycline A/CDK1 inactive la kinase WEE1 et induit ainsi un mécanisme de dérépression sur le complexe Cycline B/CDK1 (Fung et al., 2007). Son activation complète intervient à la fin de la phase G2 grâce à la kinase **PLK1** (activée transcriptionnellement par FOXM1), induisant la phosphorylation inhibitrice de la kinase MYT1 et la phosphorylation activatrice de la phosphatase **cdc25c**. Cette dernière va ensuite permettre la déphosphorylation et ainsi l'activation du complexe Cycline B/CDK1 (Bayliss et al., 2012; Nakajima et al., 2003; Okano-Uchida et al., 1998; Schafer, 1998). Enfin, le

complexe Cycline B/CDK1 actif phosphoryle en retour la phosphatase cdc25c. Il y a donc la mise en place d'une boucle d'autorégulation positive permettant l'activation rapide et massive du complexe Cycline B/CDK1 et ainsi, l'initiation de la mitose (Jackman et al., 2003; Pollard and Earnshaw, 2004).

iv. Phase M

Le complexe Cycline B/CDK1 induit l'entrée en mitose en permettant la condensation de l'ADN, la déstructuration de l'enveloppe nucléaire et la réorganisation du cytosquelette *via* la mise en place du fuseau mitotique (Pollard and Earnshaw, 2004). Il phosphoryle le complexe APC/C, permettant son interaction avec le cofacteur cdc20 (Vodermaier, 2004). Le complexe APC/C-cdc20 ainsi formé devient actif et est impliqué, *via* son activité E3-Ubiquitine ligase, dans la dégradation de nombreuses protéines, processus essentiel à la progression mitotique (voir paragraphe I-0-2-iii). Au début de la mitose, APC/C-cdc20 permet la dégradation du complexe Cycline A/CDK1, puis de la protéine Sécurine et pour terminer celle du complexe Cycline B/CDK1. La Sécurine est un inhibiteur de la protéase Séparase, impliquée dans la dégradation de la Cohésine liant les chromatides sœurs (Figure 8) (Fung and Poon, 2005; Peters, 2002). Les mécanismes moléculaires responsables de la progression mitotique seront plus largement décrits dans le paragraphe suivant.

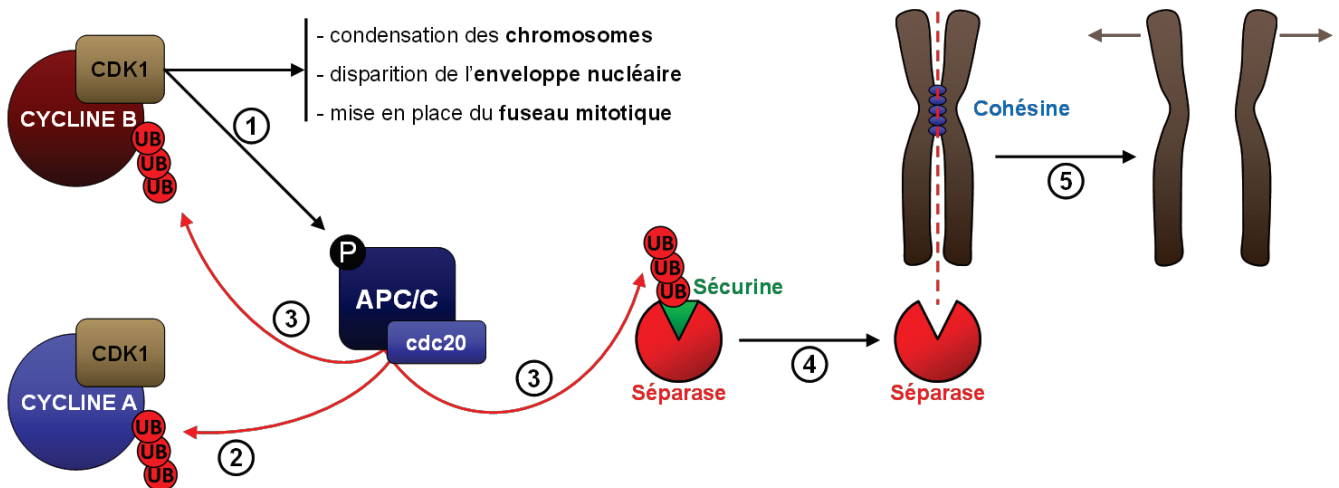


Figure 8 : Mécanismes moléculaires de la division mitotique (P: phosphorylation ; UB: ubiquitination).

Enfin, la sortie de la mitose permet d'obtenir deux cellules filles *via* le phénomène de cytotéière, impliquant la scission de la cellule mère grâce à la mise en place d'un anneau contractile composé d'actine et de myosine (Pollard and Earnshaw, 2004). Les deux cellules filles ainsi créées vont chacune entrer en phase G1, où elles seront soumises à des stimuli extracellulaires qui induiront l'initiation d'un nouveau cycle prolifératif ou leur passage en phase de quiescence G0.

B. Contrôle de la division mitotique

Une division cellulaire « équilibrée » est cruciale pour la conservation et la perpétuation du patrimoine génétique des espèces. Au cours de l'évolution, les cellules ont donc sélectionné des systèmes de surveillance veillant au bon déroulement de ce processus. Ces systèmes hautement conservés, communément appelés « points de contrôle », interviennent au cours des différentes phases du cycle pour vérifier l'intégrité du matériel génétique de la cellule et la bonne ségrégation des chromosomes. En cas d'anomalies, ces points de contrôle bloquent le cycle cellulaire et permettent la mise en place de divers mécanismes de réparation.

Il existe **six points de contrôle du cycle cellulaire**, répartis au cours des différentes phases (**Figure 9**) :

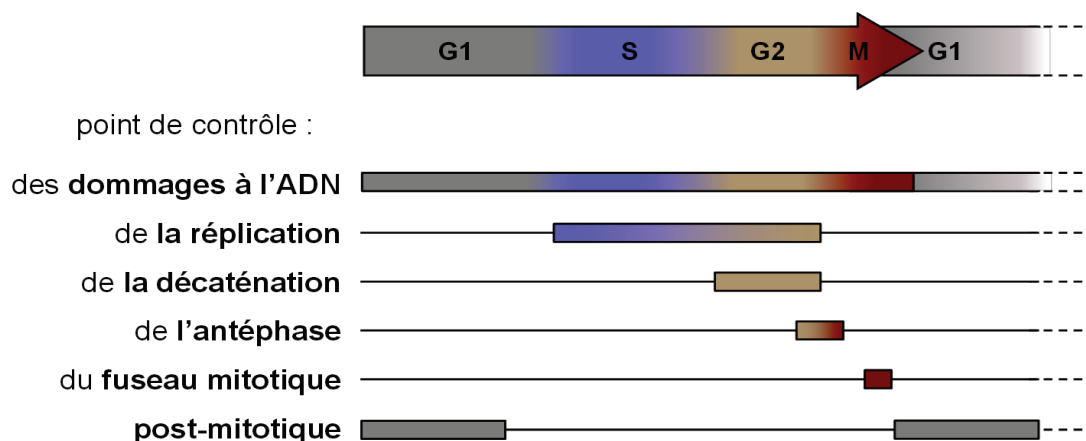


Figure 9 : Représentation de l'activité des différents points de contrôle du cycle cellulaire.

1. le point de contrôle des **dommages à l'ADN** (phases G1, S, G2 et M) activé en réponse à des cassures (simple ou double brin) ou des mésappariements nucléotidiques permet la mise en place des mécanismes de réparation de l'ADN indispensables à la préservation de l'information génétique.
2. le point de contrôle de la **réplication** (phases S et G2 précoce) détecte les fourches de réplication stoppées par différentes anomalies et permet l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN.
3. le point de contrôle de la **décaténation** (phase G2 tardive) activé en réponse à la détection de « nœuds » entre les chromatides sœurs permet leur désenroulement,

afin de prévenir d'éventuelles cassures chromosomiques lors de leur séparation en mitose.

4. le point de contrôle de l'**antéphase** (transition G2/M) entraîne la décondensation des chromosomes face à un stress génotoxique et inhibe ainsi l'entrée en mitose.
5. le point de contrôle du **fuseau mitotique** (phase M) veille à la ségrégation équitable des chromatides sœurs lors de l'anaphase *via* l'inhibition de la progression mitotique tant que les chromosomes ne sont pas correctement attachés au fuseau mitotique.
6. le point de contrôle **post-mitotique** (phase G1 et sortie de phase M) entraîne un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 des cellules issues d'une division mitotique anormale et présentant ainsi un nombre aberrant de chromosomes.

Nous nous intéresserons ici plus spécifiquement au **point de contrôle du fuseau mitotique (SAC, Spindle Assembly Checkpoint)**, mes résultats de thèse ayant mis en évidence l'implication de la protéine TIF1 γ dans ce processus. Nous détaillerons également le **point de contrôle post-mitotique**, permettant de stopper les cellules ayant échappé à l'arrêt du cycle cellulaire médié par le SAC. Les autres points de contrôle du cycle cellulaire sont décrits dans les annexes bibliographiques.

1. Déroulement de la mitose

Avant de nous intéresser aux points de contrôles de la division mitotique (SAC et point de contrôle post-mitotique), il est important de décrire les différentes phases d'une mitose normale. Ainsi, la mitose (phase M) est l'étape ultime du cycle cellulaire aboutissant à la formation de deux cellules filles issues d'une seule cellule mère. Durant cette phase, le matériel génétique doit être équitablement réparti entre les deux cellules filles, afin d'éviter toute anomalie chromosomique pouvant mener à la mort cellulaire ou étant à la base de pathologies telles que le cancer.

La **mitose** est subdivisée en six phases (**Figure 10**) (Kops et al., 2005; Pollard and Earnshaw, 2004) :

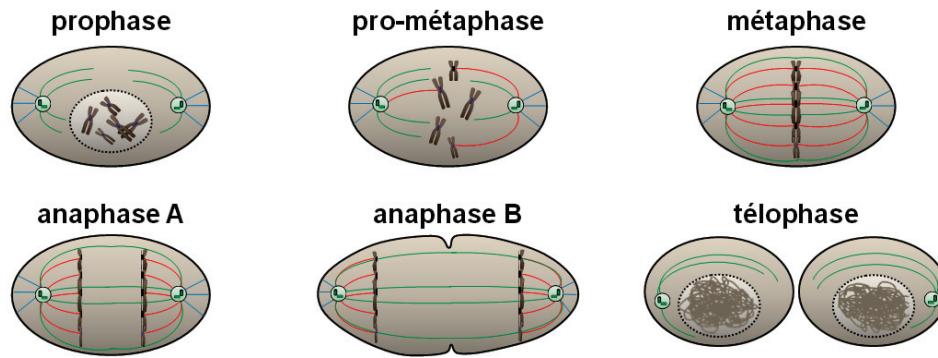


Figure 10 : Les différentes étapes de la mitose
(microtubules : impliqués dans la capture des chromosomes (—) ; permettant l'élongation du fuseau mitotique (—) ; stabilisant le fuseau au cortex cellulaire (—)).

1. **La prophase** : les chromosomes se condensent, les centrosomes dupliqués se séparent et le fuseau mitotique se met en place.
2. **La pro-métaphase** : l'enveloppe nucléaire disparaît, les kinétochores (structures protéiques localisés au niveau des centromères) sont « captés » par les microtubules kinétochoriens issus des deux pôles de la cellule.
3. **La métaphase** : les chromosomes s'alignent sur la plaque équatoriale de la cellule grâce à leur capture par le fuseau mitotique.
4. **L'anaphase A** : les chromatides sœurs se séparent grâce au raccourcissement des chromosomes kinétochoriens et à l'action de l'enzyme Séparase, chargée de rompre les interactions les liant entre elles : les deux chromatides migrent, chacune vers un pôle de la cellule.
5. **L'anaphase B** : la séparation des deux chromatides se termine grâce au raccourcissement des microtubules ancrés au cortex cellulaire (réseau dense de filaments d'actine et de protéines situé sous la membrane plasmique) et à l'allongement des microtubules interpolaire (traversant la cellule de part en part et interagissant en son centre) : les deux pôles de la cellule s'éloignent l'un de l'autre.
6. **La téléphase** : les enveloppes nucléaires se reforment, les chromosomes se décondensent et la cellule mère se scinde en deux cellules filles *via* le processus de cytotélerèse impliquant la formation d'un anneau contractile d'actine et de myosine.

Dans cette partie, nous nous concentrerons sur la transition métaphase-anaphase régulée par le point de contrôle du fuseau mitotique. Le déroulement des autres phases de la mitose (prophase, pro-métaphase, anaphase A/B et télophase) sont détaillées dans les annexes bibliographiques.

2. Le point de contrôle du fuseau mitotique et la transition métaphase-anaphase

Lors de la métaphase, les chromosomes, captés par les microtubules, s'alignent sur la plaque équatoriale de la cellule. A ce moment précis du cycle cellulaire intervient un point de contrôle fondamental : **le point de contrôle du fuseau mitotique (SAC)**. Ce point de contrôle bloque le cycle cellulaire en métaphase tant que chaque chromatide sœur n'est pas correctement liée à un pôle du fuseau mitotique (**Figure 11**). Il empêche ainsi la formation de cellules aneuploïdes, ne possédant pas le bon nombre de chromosomes, pouvant être à l'origine de pathologies néoplasiques.

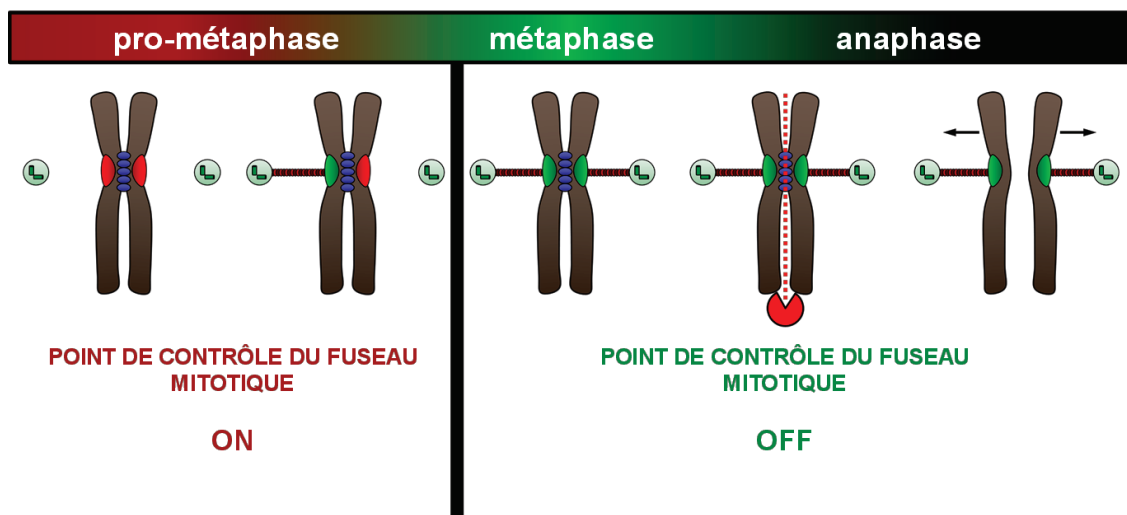


Figure 11 : Activité du point de contrôle du fuseau mitotique au cours de la mitose.

Contrairement aux autres points de contrôle du cycle cellulaire, activés seulement en cas d'anomalies avérées (cassures de l'ADN, mésappariements...), le point de contrôle du fuseau mitotique est activé « par défaut ». En effet, à chaque mitose, les chromosomes passent nécessairement par un stade au cours duquel ils ne sont pas attachés aux microtubules kinétochoriens, avant d'être captés par ces derniers. La progression normale du cycle cellulaire en anaphase est donc subordonnée à l'inactivation du point de

contrôle du fuseau mitotique, suite à l'attachement de tous les chromosomes au fuseau mitotique (Kops et al., 2005; Lara-Gonzalez et al., 2012; Musacchio and Salmon, 2007; Walczak and Heald, 2008).

La transition métaphase-anaphase peut être chronologiquement subdivisée en trois étapes :

- i. **Mise en place** du fuseau mitotique et capture des chromosomes.
- ii. **Activation de la voie de signalisation du SAC**, inhibition du complexe APC/C-cdc20 et blocage du cycle cellulaire en métaphase.
- iii. **Inhibition du SAC** et progression du cycle cellulaire en anaphase *via* l'activité d'APC/C-cdc20.

i. Mise en place du fuseau mitotique et capture des chromosomes

Les centrosomes sont des structures protéiques, localisées aux deux pôles de la cellule, permettant l'organisation des microtubules et ainsi, la mise en place du fuseau mitotique. Les microtubules sont regroupés et stabilisés autour des pôles, *via* leurs extrémités négatives, par l'intermédiaire de la protéine **NuMA** (Schatten, 2008).

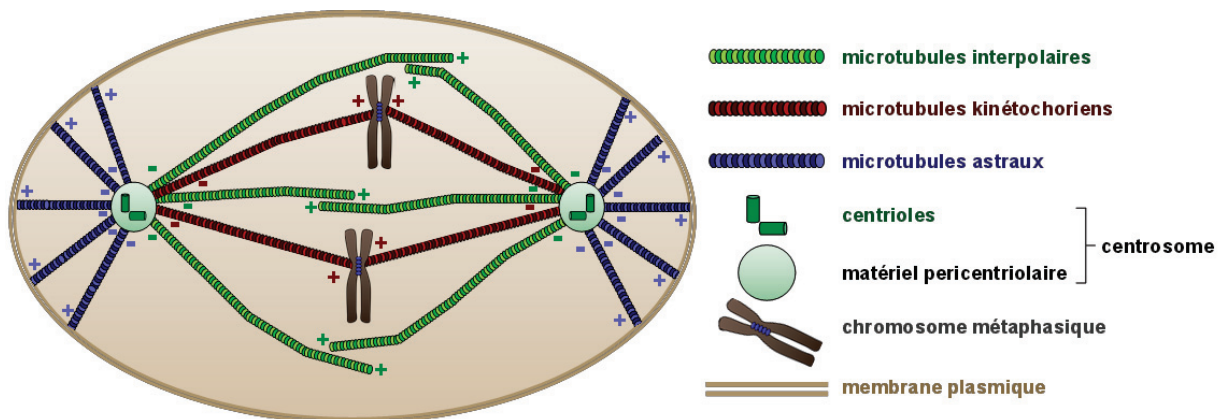


Figure 12 : Représentation du fuseau mitotique et des différents types de microtubules qui le composent.

Au sein du fuseau mitotique, trois types de microtubules sont à distinguer : les microtubules **kinétochoriens** qui capturent les chromosomes, les microtubules **astraux** ancrés au cortex cellulaire participant au bon positionnement du fuseau mitotique et les

microtubules **interpolaires** parcourant la cellule de part en part afin d'interagir au niveau de leur extrémité positive et ainsi, relier les deux pôles de la cellule (**Figure 12**) (Rieder and Maiato, 2004).

Les chromosomes sont captés par le fuseau mitotique au niveau de structures spécialisées permettant l'interaction microtubule-chromosome : les **kinétochores**. Ce sont des structures protéiques se formant au niveau des centromères en prophase. Ils sont constitués de plus de 80 protéines dont la présence peut être constitutive (CENP-A, CENP-B, HEC1...) ou transitoire (CENP-E, Aurora B...) (Cheeseman and Desai, 2008; Santaguida and Musacchio, 2009). La capture des chromosomes par les microtubules kinétochoriens fait intervenir **deux modèles** complémentaires (**Figure 13**) (Walczak and Heald, 2008) :

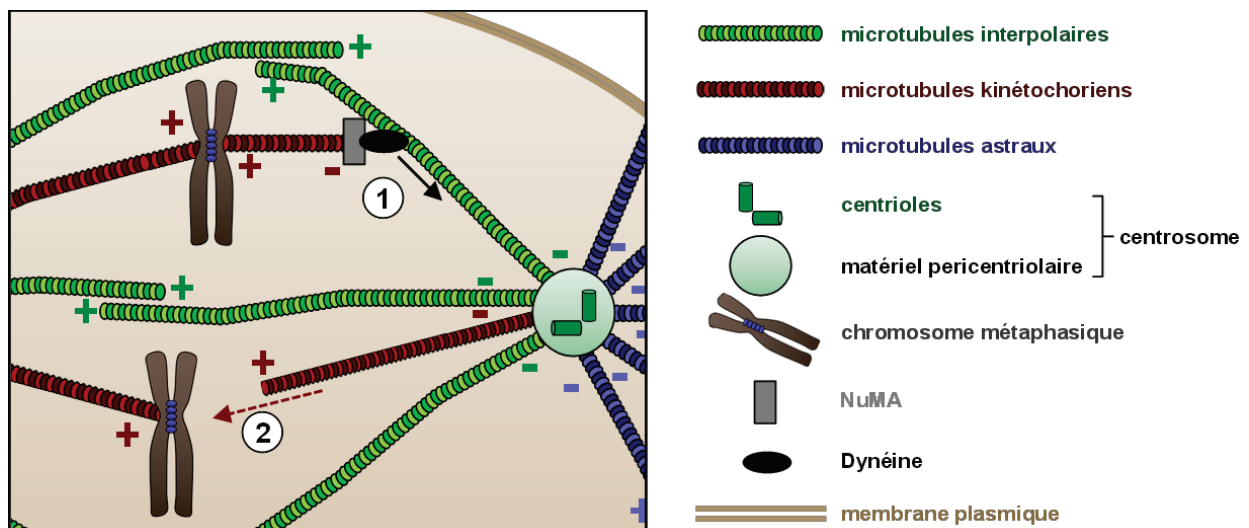


Figure 13 : Modèles de capture des kinétochores par le fuseau mitotique.

1. les microtubules se polymérisent à **partir des kinétochores libres** et sont orientés jusqu'au pôle grâce à la protéine NuMA, localisée au niveau de leurs extrémités libres. *Via* son interaction avec le moteur moléculaire **dynéine**, NuMA va migrer le long des microtubules existants jusqu'à leurs extrémités négatives, et ainsi jusqu'au centrosome (Khodjakov et al., 2003).
2. la polymérisation des microtubules s'effectue à **partir des centrosomes** et entraîne, de façon stochastique, une interaction entre leur extrémité positive et les kinétochores (Holy and Leibler, 1994).

Divers types d'associations entre les kinétochores et les microtubules sont observées : **monotélique**, **syntélique**, **mérotélique** et **amphitélique** (**Figure 14**) (Rieder and Maiato, 2004).

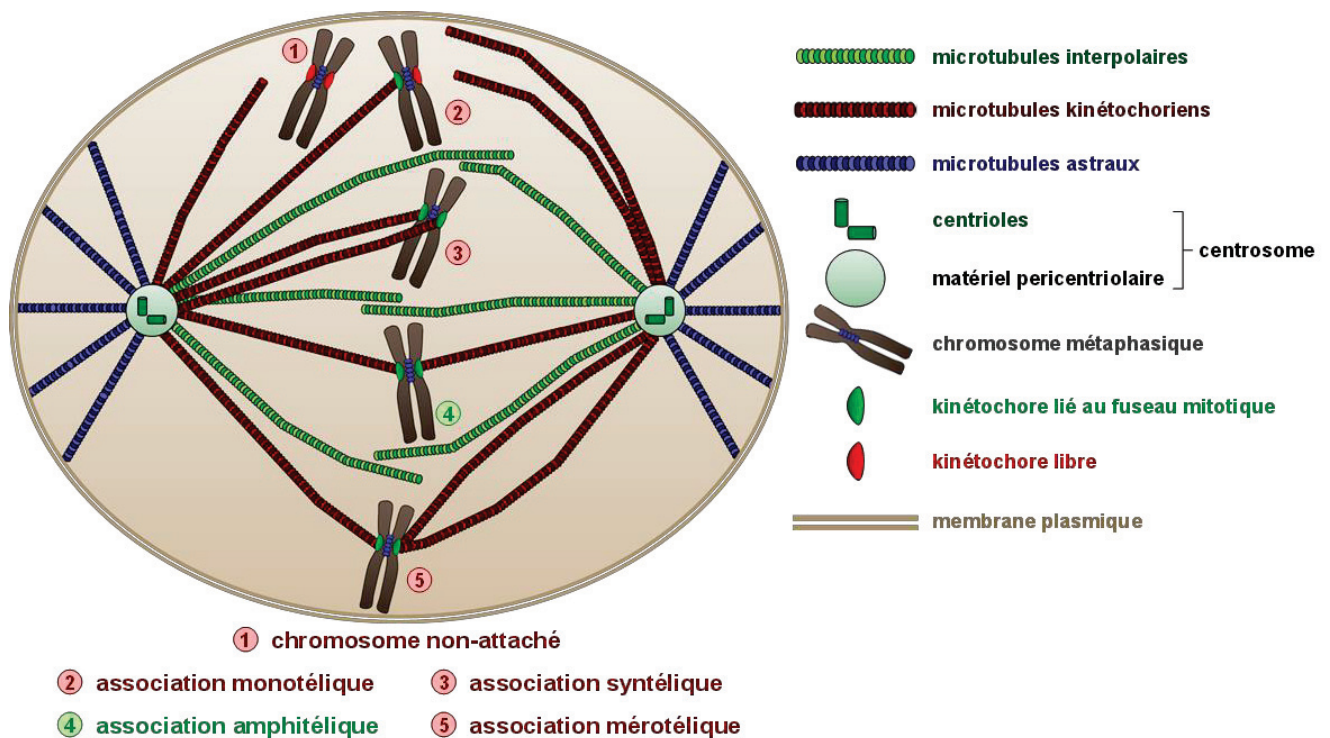


Figure 14 : Différents types d'associations observées entre les microtubules et les kinétochores.

La conformation amphitélique (ou bipolaire) est indispensable à une répartition équitable des chromosomes dans les deux cellules filles issues de la division cellulaire. Les autres types de conformations (monotélique, syntélique ou mérotélique) ne sont pas équilibrés : elles maintiennent activé le point de contrôle du fuseau mitotique, de manière à empêcher la séparation des chromatides sœurs jusqu'à ce que tous les chromosomes soient capturés par des interactions amphitéliques (Walczak and Heald, 2008).

ii. Activation de la voie de signalisation du SAC, inhibition du complexe APC/C-cdc20 et blocage du cycle cellulaire en métaphase

1) Les kinétochores, « senseurs » de l'attachement au fuseau mitotique

Le point de contrôle du fuseau mitotique détecte la présence de chromatides non attachées au fuseau mitotique. Néanmoins, le SAC n'est pas activé uniquement par les kinétochores libres, auquel cas les interactions syntéliques et mérotéliques permettraient la progression du cycle cellulaire en anaphase et ainsi l'émergence de cellules aneuploïdes. En effet, les protéines kinétochoriennes **détectent** également la **tension exercée** par le fuseau mitotique, afin de déterminer si l'interaction chromatide-fuseau est correcte ou non, et **déstabilisent** les interactions non amphitéliques (Pinsky and Biggins, 2005). Puis, en absence de microtubules, les protéines kinétochoriennes sont responsables de l'activation du **point de contrôle du fuseau mitotique**. Ainsi, les kinétochores ne sont pas seulement des structures « plateformes » permettant l'interaction physique des chromosomes avec le fuseau mitotique, mais sont également des « senseurs » impliqués dans la mise en place des associations amphitéliques et constituant le point de départ de la signalisation activatrice du SAC.

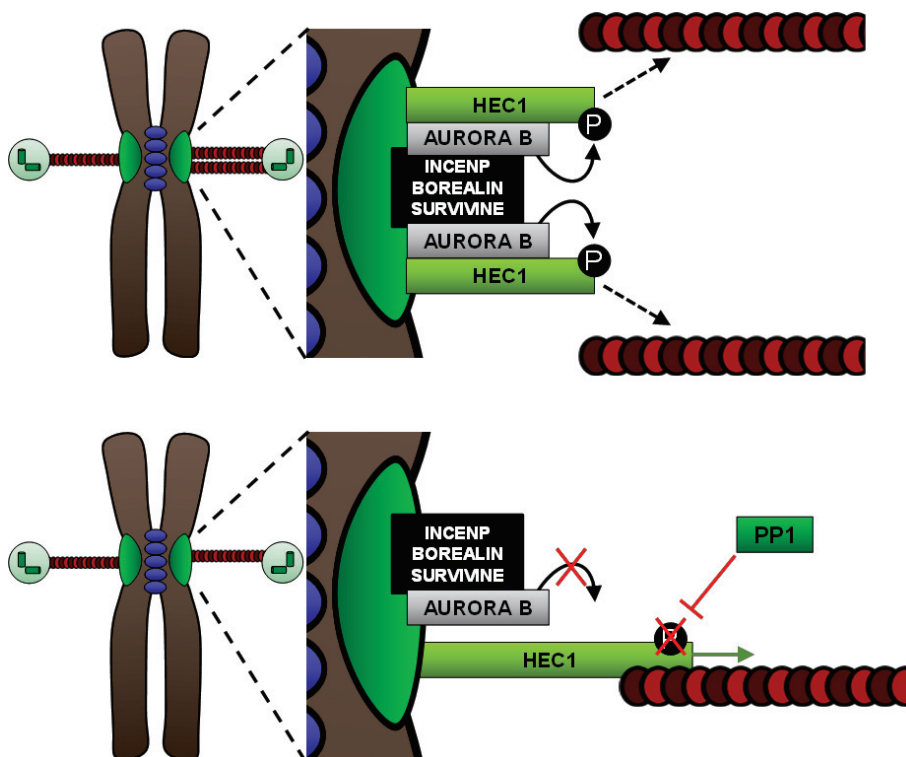


Figure 15 : Détection des associations non-amphitéliques et détachement des microtubules (P: phosphorylation).

La protéine kinase **Aurora B** s'associe aux protéines **INCENP** (*IN*ner *CEN*tromere *Protein*), **Borealine** et **Survivine**, au niveau des kinétochores, afin de former le complexe protéique **CPC** (*Chromosome Passenger Complex*) (**Figure 15**) (van der Horst and Lens, 2014; van der Waal et al., 2012a). Ce complexe déstabilise la liaison microtubule/kinétochore, lorsque la tension exercée par le fuseau mitotique ne correspond pas à une association amphitélétique. Pour cela, en absence d'une tension adéquate, la protéine kinase Aurora B phosphoryle la protéine kinétochorienne **HEC1** (*Highly Expressed in Cancer 1*) interagissant avec les microtubules. La phosphorylation d'HEC1 par Aurora B diminue ses capacités d'interaction avec le fuseau mitotique, ce qui entraîne la dissociation du microtubule sur le kinétochore (DeLuca et al., 2011; Ricke and Deursen, 2012). Lorsque la tension correspond à une association amphitélétique, HEC1 s'éloigne physiquement d'Aurora B, grâce à la force de traction exercée par le fuseau mitotique. Ainsi, Aurora B ne peut plus phosphoryler HEC1, qui est alors déphosphorylé par la phosphatase **PP1**, entraînant la consolidation de l'interaction microtubule/kinétochore (Lampson and Cheeseman, 2011). Ces protéines empêchent ainsi la mise en place d'associations monotéliques, syntéliques ou mérotéliques en détachant les microtubules, si la tension exercée par ces derniers n'est pas appropriée, ce qui génère des kinétochores libres activant le point de contrôle du fuseau mitotique.

De plus, Aurora B permet le recrutement aux kinétochores libres de la **kinase MPS1** impliquée, à son tour, dans le recrutement et l'activation de nombreuses protéines du SAC telles que **MAD2**, **MAD1**, **CENP-E** ou **BUBR1** (**Figure 16**) (Abrieu et al., 2001; Conde et al., 2013; Liu and Winey, 2012; London and Biggins, 2014; Saurin et al., 2011; Tipton et al.,

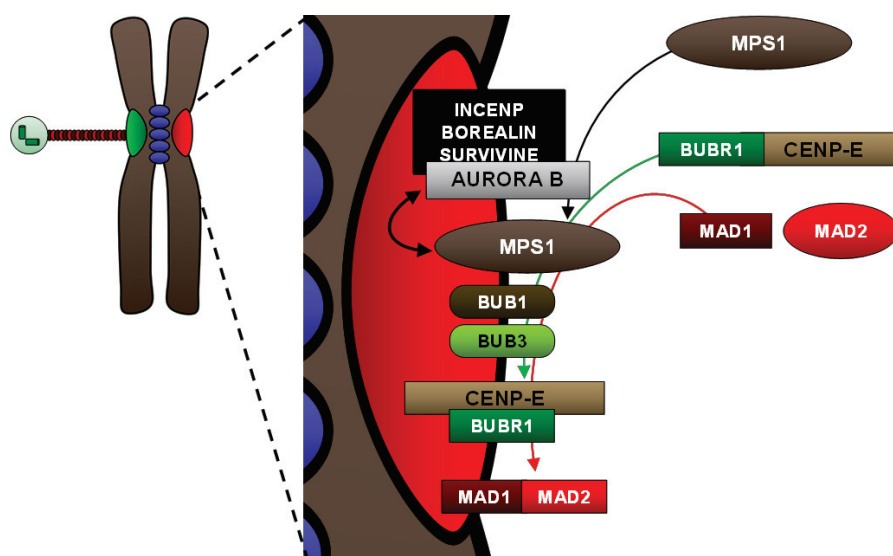


Figure 16 : Mécanismes moléculaires d'activation du SAC au niveau des kinétochores.

2013; Vigneron et al., 2004). De plus, il a été mis en évidence que le recrutement de MPS1, MAD1 et MAD2 était dépendant de la présence d'HEC1 (DeLuca et al., 2003; Martin-Lluesma et al., 2002). MPS1 est également impliquée, en retour, dans le recrutement et l'activation, d'AURORA B entraînant ainsi l'installation d'une boucle d'autorégulation positive (Jelluma et al., 2008; van der Waal et al., 2012b).

Les kinases BUB1 et BUB3 se localisent très rapidement au niveau des kinétochores, dès la prophase, *via* leur interaction directe avec les protéines constitutives de ces structures (Elowe, 2011; Lara-Gonzalez et al., 2012). Elles interviennent également dans le recrutement de nombreuses protéines mitotiques responsables de la signalisation activatrice du SAC et du blocage du cycle cellulaire, telles que **CENP-E**, **BUBR1**, **MAD1** ou **MAD2** (Figure 16) (Johnson et al., 2004; London and Biggins, 2014; Perera et al., 2007).

L'initiation de l'arrêt du cycle cellulaire en métaphase s'effectue grâce à la **protéine kinétochorienne CENP-E**, qui, lorsqu'elle n'est pas attachée à un microtubule, induit l'activité kinase de la **protéine BUBR1**, permettant ainsi son auto-phosphorylation responsable de l'immobilisation de complexes **MAD2-MAD1** au niveau des kinétochores. La protéine BUBR1 est également un acteur majeur du point de contrôle du fuseau mitotique, en participant à la cascade de signalisation menant à l'arrêt du cycle cellulaire (voir paragraphe suivant) (Guo et al., 2012). Ainsi, CENP-E intervient dans ce point de contrôle comme un senseur, dont le statut attaché ou non à un microtubule, est la base de nombreuses interactions protéiques menant à un blocage ou à une avancée du cycle cellulaire.

2) Formation du MCC (*Mitotic Checkpoint Complex*) et inhibition d'APC/C-cdc20

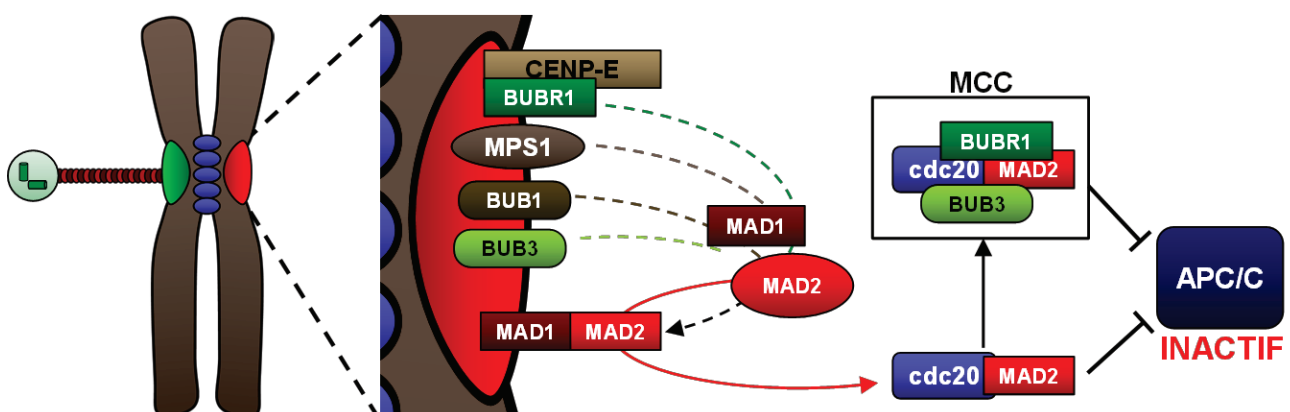


Figure 17 : Mécanismes moléculaires du SAC et inhibition du complexe APC/C.

Le blocage du cycle cellulaire débute avec la fixation des complexes **MAD2-MAD1** au niveau des kinétochores, grâce à leur recrutement par **les kinases MPS1, BUB1 et BUB3 et BUBR1** (Guo et al., 2012; Hewitt et al., 2010; London and Biggins, 2014; Tighe et al., 2008; Xu et al., 2009) (**Figures 16 et 17**).

Les complexes MAD2-MAD1 recrutent ensuite les protéines **MAD2** libres, ce qui entraîne le changement conformationnel de ces dernières, augmentant leur affinité pour **la protéine cdc20** (Antoni et al., 2005). Les complexes MAD2-cdc20 ainsi formés, inhibent alors la mise en place du complexe APC/C-cdc20 par séquestration de cdc20. De plus, ces mêmes complexes MAD2-cdc20 permettent le recrutement des protéines **BUBR1 et BUB3** formant alors le **MCC (Mitotic Checkpoint Complex)** (Davenport et al., 2006). Ce dernier interagit directement avec **APC/C** et inhibe son activité E3-Ubiquitine ligase en limitant son interaction avec le cofacteur cdc20, bloquant ainsi l'avancée du cycle cellulaire (**Figure 17**) (Chao et al., 2012).

De façon intéressante, les complexes MAD2-cdc20 formés au niveau des kinétochores grâce aux complexes MAD2-MAD1, permettent la formation de nouveaux complexes MAD2-cdc20, de façon indépendante au recrutement par les complexes MAD2-MAD1 (Musacchio and Salmon, 2007). Cette auto-activation des complexes MAD2-cdc20 cytosoliques, indépendamment d'une signalisation émanant des kinétochores, explique qu'un seul kinétochore libre soit capable d'activer rapidement et efficacement le point de contrôle du fuseau mitotique (Rieder et al., 1994).

Malgré l'inhibition du complexe APC/C-cdc20 par le MCC, certains substrats d'APC/C-cdc20 peuvent être dégradés en présence d'un SAC actif. C'est le cas de la **Cycline A** dont la dégradation protéique, dépendante du complexe APC/C-cdc20 intervient dès la pro-métaphase, alors que le point de contrôle du fuseau mitotique est actif. En effet, la Cycline A interagit directement avec le cofacteur cdc20 avec une **plus forte affinité que le MCC**, forme alors un complexe Cycline A-cdc20 qui interagit à son tour avec APC/C afin de constituer un complexe transitoire APC/C-cdc20-Cycline A. La Cycline A permet ainsi la **délocalisation ponctuelle du MCC** induisant l'activité E3-Ubiquitine ligase d'APC/C-cdc20, responsable de l'ubiquitination et la dégradation de la Cycline A. Une fois cette dernière dégradée, cdc20 est de nouveau inhibé par le MCC. La Cycline A entre donc en compétition avec le MCC pour interagir avec cdc20 afin de promouvoir sa propre dégradation protéique, processus essentiel à l'alignement des chromosomes. En effet, il a été mis en évidence que la surexpression de la Cycline A inhibait l'alignement des

chromosomes sur la plaque métaphasique, retardant l'avancée du cycle cellulaire en anaphase (den Elzen and Pines, 2001; Di Fiore and Pines, 2010; Geley et al., 2001; Hames et al., 2001).

iii. Inhibition du SAC et progression du cycle cellulaire en anaphase via l'activité d'APC/C-cdc20

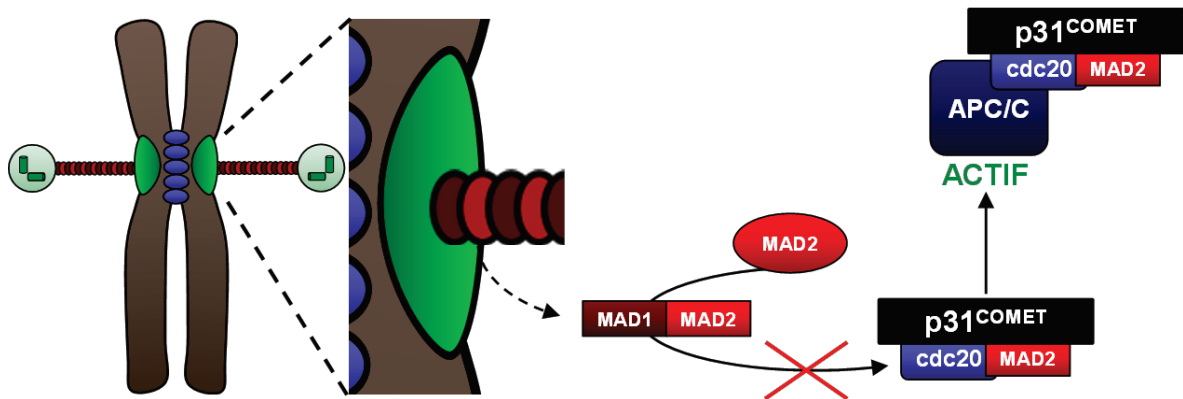


Figure 18 : Inhibition du SAC suite à la capture des kinétochores par le fuseau mitotique.

Une fois tous les chromosomes attachés au fuseau mitotique, les complexes **MAD2-MAD1** se **dissocient** du kinétochore. Les microtubules interagissent directement avec la protéine **CENP-E** entraînant son changement de conformation. CENP-E ne peut plus induire l'activité kinase de **BUBR1**, limitant le recrutement de nouveaux complexes MAD2-MAD1 (Guo et al., 2012; Lara-Gonzalez et al., 2012; Maldonado and Kapoor, 2011; Mao et al., 2003). Les protéines MAD2 libres n'interagissent alors plus avec les complexes MAD2-MAD1, ce qui diminue leur affinité pour cdc20. De plus, la protéine **p31^{COMET}** se lie aux complexes MAD2-cdc20 encore existants et contrecarre l'activité inhibitrice de MAD2, en permettant l'interaction de cdc20 avec APC/C en présence de MAD2 (**Figure 18**) (Habu and Matsumoto, 2013; Xia et al., 2004).

Le complexe **APC/C-cdc20** devient alors actif, provoquant l'ubiquitination, et par conséquent, la dégradation de la **Sécurine**, une protéine inhibitrice de la **Séparase**. La Séparase ainsi libérée va cliver la **Cohésine** et entraîner la séparation des chromatides sœurs (**Figure 19**) (Jallepalli et al., 2001; Peters, 2006; Waizenegger et al., 2002). APC/C-cdc20 est également responsable de la dégradation de la Cycline B, conduisant à **l'inactivation du complexe Cycline B/CDK1** (Clute and Pines, 1999). De plus, la kinase

CDK1 est également inhibée par différentes phosphorylations/déphosphorylations inactivatrices catalysées par les kinases WEE1 et MYT1, ainsi que par la phosphatase PP2A inactivant cdc25c (Chow et al., 2011; Forester et al., 2007).

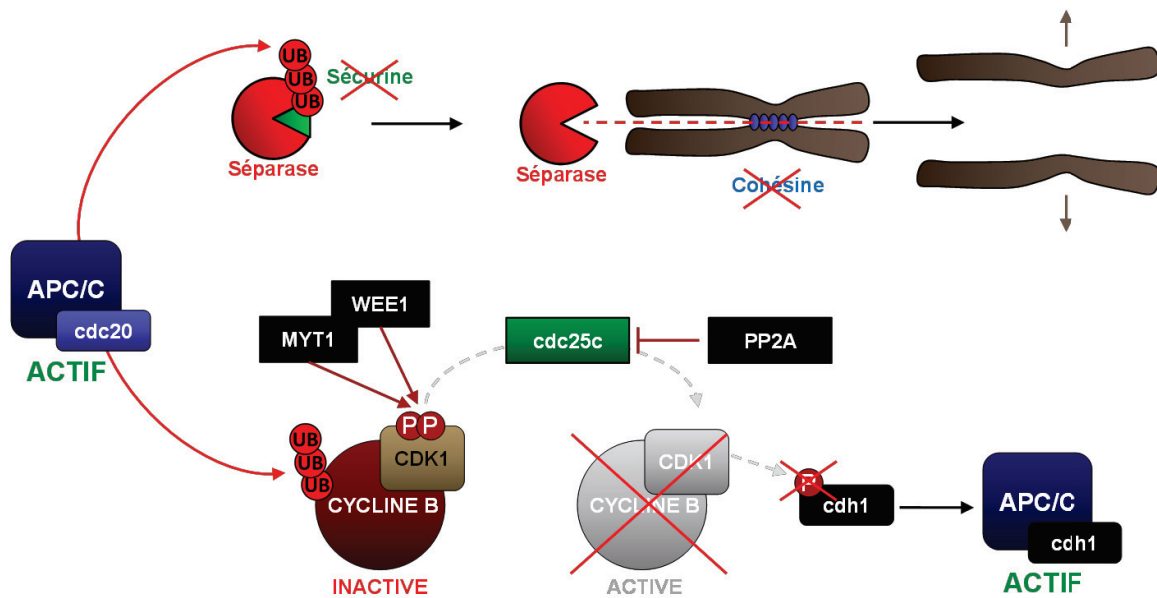


Figure 19 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la ségrégation des chromatides sœurs et la progression mitotique (P: phosphorylation inhibitrice ; UB: ubiquitination).

L'inhibition de CDK1 conduit à l'activation d'un autre cofacteur d'APC/C, **cdh1**, qui était jusqu'alors inhibé *via* sa phosphorylation par CDK1 (Clijsters et al., 2014; Fung and Poon, 2005). Le complexe APC/C-**cdh1** est responsable de la sortie de mitose en dégradant par poly-ubiquitination de nombreuses protéines mitotiques (Cycline B, Cycline A, cdc20, Aurora B, PLK1, FOXM1...) (Figure 20) (Malumbres and Barbacid, 2009; Peters, 2006).

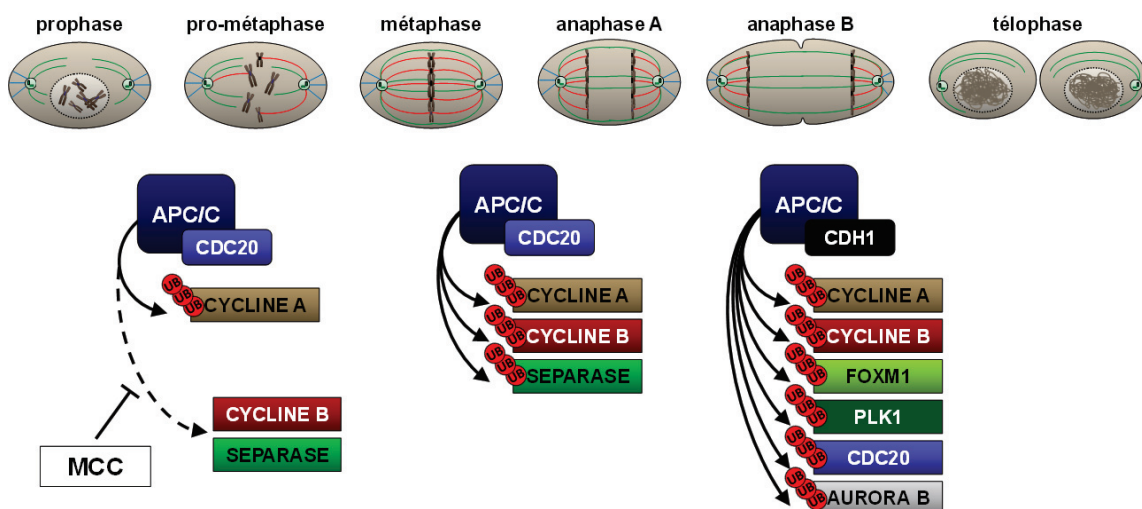


Figure 20 : Différents substrats d'APC/C au cours de la progression mitotique (UB: ubiquitination).

3. Le point de contrôle post-mitotique

Le point de contrôle post-mitotique, aussi appelé « *G1 tetraploid checkpoint* » ou « *G1 post-mitotic checkpoint* », agit en début de phase G1 afin de prévenir la progression dans le cycle cellulaire de cellules possédant une quantité d'ADN supérieure à 2n. Ainsi, il évite que la polyploïdie ne soit transmise aux cellules nouvellement formées. Ce point de contrôle est activé en réponse à plusieurs anomalies mitotiques :

- 1) une inactivation du SAC
- 2) un blocage permanent du cycle cellulaire en métaphase par le SAC

(1) Une inactivation du SAC entraîne la progression du cycle cellulaire en anaphase malgré la présence de chromosomes mal attachés au fuseau mitotique. Ainsi, lors de la séparation des chromatides sœurs, ces chromosomes restent au niveau de la plaque métaphasique et forment des chromosomes dits « retardés » (appelés « *lagging chromosome* ») (Chandhok and Pellman, 2009; Davoli and de Lange, 2011). Lors de l'anaphase et de la télophase, la kinase Aurora B est localisée dans la région médiane de la cellule et est impliquée dans la mise en place de l'anneau contractile d'actine et de myosine responsable de la scission des deux cellules filles (voir annexes bibliographiques). La localisation de chromosomes « retardés » dans cette zone médiane lors de l'anaphase et de la télophase permet le maintien de l'activité d'Aurora B, qui se déplace le long des chromosomes à partir des kinétochores et atteint les régions télomériques des chromosomes (Figure 21) (Hayashi and Karlseder, 2013; Wang et al., 2011).

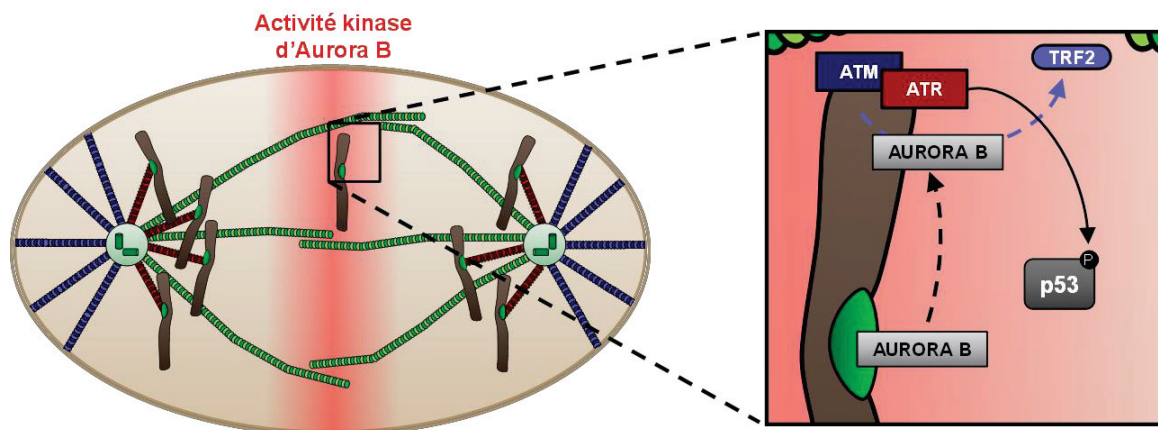


Figure 21 : Mécanismes moléculaires d'activation du point de contrôle post-mitotique (P: phosphorylation).

Les télomères sont associés à un complexe protéique nommé **Shelterin**, les protégeant de l'élongation par la télomérase et inhibant l'activation de la réponse aux dommages à l'ADN (Diotti and Loayza, 2011; Oganessian and Karlseder, 2009). La localisation télomérique d'Aurora B entraîne la dissociation de la protéine **TRF2** (*Telomeric Repeat-binding Factor 2*) appartenant au complexe Shelterin (**Figure 21**) (Ganem and Pellman, 2012; Hayashi and Karlseder, 2013). Il est tentant de spéculer que cette délocalisation puisse être la conséquence de la phosphorylation de TRF2 par Aurora B. Néanmoins, le mécanisme moléculaire responsable de la dissociation de TRF2 n'est pas décrit à ce jour.

Toutefois, il a été mis en évidence que l'absence de TRF2 entraînait le recrutement et ainsi l'activation des kinases ATM et ATR, impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN (Buscemi et al., 2009; Hayashi and Karlseder, 2013) (voir annexes bibliographiques). ATM/ATR sont la cible de l'activité kinase d'AURORA B, ainsi que de leur propre activité kinase, ce qui permet leur activation (Yang et al., 2011). Elles entraînent alors un blocage du cycle cellulaire en phase G1 en phosphorylant directement le facteur transcriptionnel p53, menant à sa stabilisation et à l'induction de son activité transcriptionnelle (**Figures 21 et 22**). De plus, ATM/ATR phosphorylent les kinases Chk1 et Chk2 qui phosphorylent à leur tour la protéine p53 ainsi que les phosphatases cdc25, inhibant ainsi leur activité (voir annexes bibliographiques concernant le point de contrôle des dommages à l'ADN) (Vogel et al., 2004; Wilsker et al., 2012). P53 est également la cible directe de l'activité kinase de la protéine MPS1, recrutée par Aurora B lors de la mise en place du SAC (voir paragraphe I-0-2-0) (Huang et al., 2009). P53 phosphorylé induit la transcription du CKI p21 bloquant le cycle cellulaire *via* l'inhibition des kinases CDK (voir paragraphe I-A-1). De plus, p53 induit l'expression de facteurs pro-apoptotiques tels que PUMA ou Bcl-2 entraînant la mort cellulaire (**Figure 22**) (Reinhardt and Schumacher, 2012).

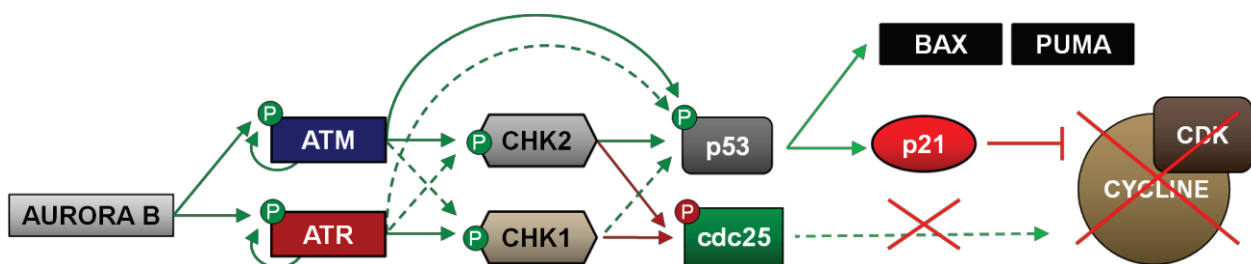


Figure 22 : Mécanismes moléculaires permettant le blocage du cycle cellulaire par le point de contrôle post-mitotique
(P: phosphorylation activatrice ; P: phosphorylation inhibitrice).

Pour résumer, la relocalisation d'Aurora B au niveau des télomères permet de déstabiliser le complexe protéique impliqué dans la protection des extrémités chromosomiques. Ceci active le point de contrôle des dommages à l'ADN inhibant la progression du cycle cellulaire *via* l'activation de p53. Le point de contrôle post-mitotique induit donc, dans ce cas de figure, un arrêt du cycle cellulaire en activant le point de contrôle des dommages à l'ADN en absence de dommage à l'ADN.

(2) Un blocage permanent par le SAC peut intervenir suite à une exposition prolongée à divers poisons du fuseau mitotique entraînant une désorganisation des microtubules (taxol, nocodazole, colcémide...). Le cycle cellulaire est alors théoriquement indéfiniment bloqué par le SAC, les kinétochores ne pouvant être captés par le fuseau mitotique. Un blocage prolongé peut néanmoins entraîner un retour des cellules en phase G1, sans qu'elles n'aient terminé la mitose ni séparé les chromatides sœurs, et ce, *via* un mécanisme appelé *mitotic slippage*. Ce processus résulte de la dégradation lente mais continue de la Cycline B, le SAC n'étant pas efficace à 100 % pour inhiber l'activité du complexe APC/C-cdc20. Cela se traduit par une activité résiduelle du complexe APC/C-cdc20 qui mène à la dégradation de la Cycline B, se poursuivant jusqu'à atteindre un seuil en dessous duquel l'activité du complexe Cycline B/CDK1 ne permet plus de maintenir l'inhibition du deuxième cofacteur d'APC/C : cdh1. Le blocage du cycle cellulaire est alors levé, *via* l'activité d'APC/C-cdh1, entraînant la fin de la mitose sans avoir séparé les chromatides sœurs (la Séparase étant la cible spécifique du complexe APC/C-cdc20 et non du complexe APC/C-cdh1 (Brito and Rieder, 2006; Dai et al., 2004; Fung and Poon, 2005; Hashimoto and Todo, 2013; Rossio et al., 2010)). Le blocage prolongé du cycle cellulaire en métaphase permet également une activation continue de la kinase Aurora B, qui entraîne, comme décrit précédemment, la délocalisation de la protéine TRF2 au niveau des télomères. Ainsi, les kinases ATM/ATR sont activées, puis p53 conduisant à l'arrêt du cycle et la mort cellulaire par apoptose (Denchi and Li, 2014; Hayashi et al., 2012).

Ainsi, un blocage prolongé du cycle cellulaire par le point de contrôle du fuseau mitotique résulte inexorablement, au bout d'un certain temps, en la complétion d'une mitose anormale et un retour des cellules en phase G1 par *mitotic slippage*. Les cellules polypléïdes ainsi générées sont stoppées par la voie p53/p21, suite à l'activation des kinases ATM/ATR, ce qui permet l'arrêt du cycle cellulaire puis la mise en place d'un programme pro-apoptotique.

C. Le point de contrôle du fuseau mitotique en carcinogénèse

La dérégulation du point de contrôle du fuseau mitotique est un phénomène fréquemment observé dans les cellules cancéreuses (Kops et al., 2005; Malumbres and Barbacid, 2009; Pérez de Castro et al., 2007; Schwartzman et al., 2010). L'une des premières observations de l'altération de ce point de contrôle fût mise en évidence dans les cancers colorectaux, dont un large nombre de tumeurs présente une instabilité chromosomique menant à l'émergence de cellules aneuploïdes. Il a été proposé pour la première fois en 1998, que cette instabilité chromosomique puisse être due à une altération du point de contrôle du fuseau mitotique, et plus particulièrement à des mutations inactivatrices du gène *BUB1* (Cahill et al., 1998). Depuis, l'analyse transcriptomique à grande échelle de tumeurs, d'origine cellulaire variée, présentant de l'instabilité chromosomique a mis en évidence la dérégulation de nombreux gènes impliqués dans le SAC (Carter et al., 2006). L'instabilité chromosomique résultant de l'absence de contrôle de la division mitotique, permet à une cellule (normale ou cancéreuse) d'accumuler des altérations chromosomiques. Au cours du temps, ces altérations peuvent faciliter l'émergence de modifications de l'expression de certains gènes suppresseurs de tumeur, notamment par des processus de perte d'hétérozygotie, augmentant le potentiel réplicatif des cellules ou leurs propriétés invasives et leur conférant ainsi un avantage sélectif (Roschke et al., 2008; Zhang et al., 2008; Zhivotovsky and Kroemer, 2004).

La réduction de l'expression de *BUB1* dans des fibroblastes primaires humains par une stratégie antisens, entraîne l'apparition de cellules aneuploïdes ayant la capacité de former des colonies en agar mou, mais n'ayant néanmoins pas de propriété tumorigène chez la souris *Nude* (Musio et al., 2003). Ainsi, une inactivation du point de contrôle du fuseau mitotique n'est pas suffisante, à elle seule, pour induire la transformation tumorale mais doit systématiquement être associée à un stress oncogénique (activation d'un oncogène, association à des agents mutagènes...) dont l'effet délétère ne pourra pas être compensé par un point de contrôle du fuseau mitotique inactivé. Ce point de contrôle est donc un **mécanisme de sauvegarde** limitant l'acquisition de propriétés agressives par les cellules cancéreuses, mais ne permettant pas la transformation tumorale par sa seule inactivation.

1. Inhibition du SAC

i. Inhibition par mutations sporadiques ou germinales

Certaines cellules tumorales présentent des mutations ou délétions inactivatrices au niveau de gènes codant des acteurs centraux du point de contrôle du fuseau mitotique. Ceci aura pour conséquence une absence ou une diminution d'expression des protéines impliquées dans le point de contrôle du fuseau, d'où une impossibilité de ce dernier à se mettre en place. Il résulte de ces mutations (sporadiques ou germinales), chez l'Homme ou l'animal, l'impossibilité de former un MCC fonctionnel lors de la division mitotique et donc, une sensibilité accrue à la transformation tumorale par accumulation d'anomalies chromosomiques. Chez l'Homme, des mutations inactivatrices de BUBR1 et BUB1 ont été détectées dans des hémopathies malignes T, des cancers du côlon et de la langue (Cahill et al., 1998; Gemma et al., 2000; Ohshima et al., 2000). MPS1, activé par la kinase Aurora B et permettant le recrutement de nombreuses protéines mitotiques aux kinétochores, est également mutée dans diverses néoplasies telles que les tumeurs du poumon, du pancréas et de la vessie (mutations non-sens ou décalant le cadre de lecture) (Carter et al., 2010; Liu and Winey, 2012; Olesen et al., 2001). De plus, des mutations inactivatrices au niveau des gènes *MAD1* et *MAD2* ont été identifiées dans les cancers du sein, de l'estomac et de l'ovaire (Kim et al., 2005; Percy et al., 2000; Wang et al., 2002). La faible expression de *MAD2* a été corrélée à des défauts du point de contrôle du fuseau mitotique, ainsi qu'à l'instabilité chromosomique fréquemment observée dans les myélomes multiples et les carcinomes nasopharyngés (Díaz-Rodríguez et al., 2011; Wang et al., 2000). La mutation germinale du gène codant BUBR1 associée à la mutation du gène codant CEP57, protéine impliquée dans la stabilisation des microtubules, est responsable du syndrome « d'aneuploïdie en mosaïque », une maladie génétique se caractérisant notamment par la survenue de cancers dès l'enfance (néphroblastomes, leucémies...) (Matsuura et al., 2006; Pinson et al., 2014).

De nombreux modèles murins ont permis de confirmer la relation de cause à effet entre l'inactivation du point de contrôle du fuseau mitotique et l'apparition de pathologies cancéreuses. En effet, l'inactivation hétérozygote de *MAD1* chez la souris entraîne l'apparition de tumeurs diverses chez 20 % des individus à 18 mois (néoplasies oropharyngées, pulmonaires, hépatiques...). Ce phénotype est également retrouvé chez les souris *MAD2*^{+/-}, qui développent des adénocarcinomes papillaires de la langue au même âge (Iwanaga et al., 2007; LS et al., 2001). Cette tumorigenèse tardive suggère une

nouvelle fois que l'inactivation du point de contrôle du fuseau mitotique n'est pas suffisante pour engendrer des tumeurs, mais qu'elle doit être associée à des événements oncogéniques généralement acquis avec l'âge. Pour illustrer cela, la vincristine, un agent dépolymérisant les microtubules, coopère avec la délétion hétérozygote de MAD1 afin d'induire le développement de tumeurs de diverses origines (**42 %** des souris MAD1^{+/-} développent des tumeurs à **6 mois** après 3 semaines de traitement à la **vincristine** par injection intrapéritonéale contre **20 %** des souris MAD1^{+/-} non traitées à **18 mois** ; aucun individu sauvage ne développe de néoplasie à 6 mois après traitement à la vincristine) (Iwanaga et al., 2007). La diversité des tumeurs observées dans ces modèles (adénome hépatocellulaire, adénocarcinome de la langue, adénome broncho-alvéolaire...) illustre l'implication générale de ce point de contrôle dans les processus de transformation tumorale. La délétion d'autres membres du point de contrôle du fuseau mitotique, intervenant à différents niveaux de la signalisation, a également été impliquée dans la transformation tumorale : notamment pour les gènes BUB1, BUB3 et CENP-E, dont la délétion dans des modèles murins entraîne l'apparition de lymphomes, ainsi que des néoplasies hépatiques et pulmonaires (Babu et al., 2003; Jeganathan et al., 2007; Schliekelman et al., 2009; Weaver and Cleveland, 2007).

ii. Inhibition par des oncoprotéines virales

L'inactivation du point de contrôle du fuseau mitotique dans les cellules cancéreuses peut également résulter de la présence d'oncoprotéines virales telles que l'antigène grand T du virus SV40, les protéines E6 et E7 du papillomavirus, l'antigène nucléaire 2 du virus d'Epstein-Barr (EBNA2) et l'oncoprotéine Tax du virus HTLV (*Human T cell Leukemia Virus*). Classiquement, ces protéines inhibent les voies **p53** et **Rb**, deux voies majeures impliquées notamment dans le **point de restriction** (au-delà duquel la progression du cycle cellulaire en phase G1 n'est plus subordonnée à la présence de facteurs de croissance) et le **point de contrôle post-mitotique** (permettant un blocage du cycle en phase G1 des cellules aneuploïdes). En plus de leurs fonctions « classiques » sur la progression du cycle cellulaire en phase G1, ces protéines virales sont impliquées dans la régulation du point de contrôle du fuseau mitotique. Par exemple, **Tax** se fixe à la protéine MAD1, ce qui entraîne une localisation anormale de MAD1 et MAD2, limitant ainsi la formation du MCC (Jin et al., 1998a; Kasai et al., 2002). Les protéines **E6 et E7** du papillomavirus entraînent une dégradation précoce de la Cycline B, qui aura pour

conséquence une sortie de la phase M pouvant être prématurée en cas d'anomalies de ségrégation chromosomique. Il est également intéressant de remarquer que les cellules exprimant ces oncoprotéines E6 et E7 virales présentent souvent un taux élevé de protéine cdc20 non complexée au MCC, permettant ainsi son interaction avec APC/C et donc la ségrégation des chromatides sœurs, que ces dernières soient, ou non, correctement attachées au fuseau mitotique (Patel and Mccance, 2010; Thomas and Laimins, 1998). **L'antigène grand T** du virus SV40 interagit avec les protéines BUB1 et BUB3 et entraîne une perturbation du point de contrôle du fuseau mitotique. En effet, les cellules exprimant cette protéine et traitées par le nocodazole, agent déstabilisant les microtubules, présentent une forte proportion de cellules avec un contenu en ADN supérieur à 2n, suggérant un défaut dans la séparation des chromosomes au cours de la mitose (Cotsiki et al., 2004). Enfin, **l'antigène nucléaire 2** du virus d'Epstein-Barr, associé au développement de tumeurs lymphoïdes et épithéliales, désensibilise les cellules aux différents agents déstabilisant le fuseau mitotique (nocodazole et taxol) et leur permet de continuer leur cycle cellulaire, entraînant ainsi la formation de cellules polyploïdes (Leao et al., 2007; O'Nions and Allday, 2004). Ceci est causé par l'induction de l'expression de PLK1 (impliqué dans l'activation du complexe Cycline B/CDK1) et l'inhibition de l'expression de MAD2, induisant la dégradation précoce de la Sécurine et ainsi la séparation des chromatides sœurs (Pan et al., 2009). L'implication de ces oncoprotéines virales dans l'inhibition du point de contrôle post-mitotique, *via* l'inhibition des voies p53 et Rb, potentialise leur effet sur le point de contrôle du fuseau mitotique : les cellules aneuploïdes ainsi générées ne peuvent pas être stoppées par le point de contrôle post-mitotique ce qui permet l'émergence d'une population de cellules anormales.

2. Surexpression des acteurs du SAC

De façon moins intuitive, la majorité des acteurs du point de contrôle du fuseau mitotique sont plus classiquement retrouvés surexprimés, plutôt qu'inactivés, dans de nombreuses tumeurs humaines et sont associés aux **processus métastatiques**, à une **faible survie**, ainsi qu'à un **fort taux de récurrence**. En effet, la suractivation de ce point de contrôle est un événement moins létal pour les cellules que son inhibition : la surexpression des protéines du SAC est donc beaucoup plus couramment observée dans les processus de

transformation tumorale que l'inactivation des acteurs de ce point de contrôle (**Figure 23**).

SECURINE	(Fujii et al., 2006; Pei and Melmed, 1997; Yan et al., 2009; Zhu et al., 2006)
MAD2	(Hisaoka et al., 2008; Rimkus et al., 2007; Sotillo et al., 2010; Wang et al., 2009)
AURORA B	(Chieffi et al., 2006; Gibson et al., 2008; Smith et al., 2005; Tanaka et al., 2008)
BUBR1	(Grabsch et al., 2003; Liu et al., 2009; Wada et al., 2008)
HEC1	(Bièche et al., 2011; Hayama et al., 2006; Pérez de Castro et al., 2007)
MPS1	(Carter et al., 2006; Ling et al., 2014; Liu and Winey, 2012)
CENP-E	(Wierinckx et al., 2007)

Figure 23 : Surexpression des protéines du SAC dans de nombreuses néoplasies humaines.

Différents modèles murins et cellulaires mettent en évidence la relation de causalité entre la surexpression de ces protéines et l'émergence ou le caractère agressif de certaines tumeurs, notamment *via* l'augmentation de l'instabilité chromosomique (Ricke et al., 2011; Yuan et al., 2006). Par exemple, la surexpression des protéines HEC1 (permettant le recrutement des protéines MAD1, MAD2 et MPS1 au niveau des kinétochores) et MAD2 chez la souris entraîne une activité anormalement élevée du point de contrôle du fuseau mitotique, un allongement du temps nécessaire à la séparation des chromatides sœurs, des phénomènes d'aneuploïdie et l'apparition de tumeurs au niveau de différents organes après l'âge d'un an (langue, foie, intestin, tissus mous...) (Diaz-Rodríguez et al., 2008; Sotillo et al., 2010, 2007). Ces tumeurs, apparaissant tardivement et affectant différents organes, ont un profil très similaire à celles qui se développent suite à l'inactivation de certains acteurs du point de contrôle fuseau mitotique. Cette observation met en évidence que toute altération du point de contrôle du fuseau mitotique, résultant soit d'un déficit, soit d'une sur-représentation de certains acteurs de ce mécanisme de surveillance, aboutira au même résultat : une mauvaise ségrégation des chromosomes, l'apparition d'une aneuploïdie associée à une instabilité chromosomique pouvant entraîner l'émergence de tumeurs.

Au niveau mécanistique, la surexpression des protéines du SAC entraîne un allongement de la durée de la mitose et aboutit à la génération de cellules polyploïdes notamment *via* le mécanisme de **mitotic slippage** (voir paragraphe I-B-3 concernant le point de contrôle post-mitotique) (Brito and Rieder, 2006). Ce dernier implique la dégradation continue de la Cycline B par le complexe APC/C-CDC20, due au fait que le SAC, même fortement actif,

n'est pas complètement efficace pour inhiber tous les complexes APC/C-CDC20. Ainsi, la Cycline B est lentement détruite jusqu'à atteindre un niveau où l'activité du complexe Cycline B/CDK1 n'est plus suffisante pour maintenir l'inhibition par phosphorylation du deuxième cofacteur d'APC/C : **cdh1**. Alors, APC/C s'associe avec *cdh1* et initie la dégradation, par ubiquitination, des différents acteurs de la mitose (Cycline A Cycline B, CDC20, Sécurine...) permettant alors la sortie de la phase M et l'entrée des cellules en phase G1 (Brito and Rieder, 2006; Dai et al., 2004; Fung and Poon, 2005; Hashimoto and Todo, 2013; Rossio et al., 2010). Un arrêt prolongé en métaphase peut également entraîner l'apparition de cassures chromosomiques dues à une trop forte tension exercée sur les chromatides sœurs, en absence de dégradation de la Cohésine (Rossio et al., 2010; Sotillo et al., 2007). Le *mitotic slippage* permet ainsi à ces cellules anormales (aneuploïdie et cassures chromosomiques) de progresser en mitose et favorise l'émergence d'une population cellulaire présentant de nombreuses altérations chromosomiques.

Les cellules anormales ainsi générées sont classiquement détruites par le **point de contrôle post-mitotique**, dont l'acteur central est la protéine **p53**, qui inhibe le cycle cellulaire *via* l'induction transcriptionnelle du CKI p21 et entraîne la mort des cellules par apoptose. Ce point de contrôle post-mitotique représente ainsi le **dernier rempart** contre l'émergence de cellules présentant des altérations chromosomiques. Si p53 est inactivé, comme cela intervient dans un grand nombre de tumeurs, ou si les mécanismes de mort cellulaire sont défectueux, la surexpression, tout comme l'inhibition du SAC, mène à l'émergence d'une population cellulaire présentant une forte instabilité chromosomique et accumulant de nombreuses altérations génétiques.

Enfin, plusieurs études mettent en évidence la **forte létalité** induite par l'**ablation totale** du point de contrôle du fuseau mitotique *via* l'inhibition d'un de ces acteurs principaux, tel que MAD2 ou BUBR1, entraînant une aneuploïdie globale et une apoptose massive des cellules immortalisées ou cancéreuses (Kops et al., 2004; Michel et al., 2004). C'est pour cette raison que les acteurs du fuseau mitotique sont préférentiellement retrouvés surexprimés (plutôt que sous-exprimés) dans un grand nombre de tumeurs, engendrant, à long terme, les mêmes altérations chromosomiques que l'inhibition du SAC, mais tout en étant beaucoup moins létal à court terme. Ceci permet l'émergence, puis le maintien, d'une population cellulaire anormale.

3. Stratégies thérapeutiques

i. Tumeurs ayant un SAC fonctionnel

Les tumeurs présentant un **point de contrôle du fuseau mitotique fonctionnel** offrent une réelle opportunité de ciblage thérapeutique par des agents chimiothérapeutiques visant à activer ce point de contrôle, *via* la déstabilisation du fuseau mitotique, inhibant ainsi la prolifération cellulaire. L'induction de ces altérations du fuseau aura pour conséquence **la mort cellulaire pour la majorité des cellules cancéreuses**. En effet, même si des processus d'échappement peuvent intervenir, notamment par *mitotic slippage*, ces mécanismes s'établissent à long terme (mécanismes de résistance acquise) et nécessitent également la survenue d'autres altérations, telles que l'inhibition du point de contrôle post-mitotique. Ainsi, la plupart des cellules possédant un SAC fonctionnel seront, face à des traitements à court terme, détruites en réponse à un blocage du cycle cellulaire impliquant ce point de contrôle. A ce titre, les composés chimiques hyperstabilisant les microtubules tels que les taxanes ou inhibant leur polymérisation tels que les vincalcaloïdes sont très largement utilisés en thérapie anti-cancéreuse (Gascoigne and Taylor, 2008; Jordan and Wilson, 2004).

Ces composés chimiques à large spectre, à l'instar de la plupart des thérapeutiques anti-cancéreuses classiques, ont pour inconvénient d'affecter également les cellules normales, en particulier celles à fort potentiel réplicatif, induisant ainsi des effets indésirables très sévères (aplasie médullaire, leucopénie...). De plus, ils affectent également les microtubules qui ne sont pas impliqués dans la mitose, mais qui appartiennent au cytosquelette des cellules en interphase. Ainsi, ces composés ont un effet délétère, notamment, sur les cellules du système nerveux, dans lesquelles les microtubules jouent un rôle clé dans le transport des vésicules de neurotransmetteurs, entraînant différentes pathologies neurologiques (Salmela and Kallio, 2013). Le ciblage du point de contrôle du fuseau mitotique nécessite donc la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques, notamment plus spécifiques des cellules en mitose.

Un inhibiteur de la protéine **Aurora B**, le ZM447439, constitue une éventuelle thérapie anti-cancéreuse (Girdler et al., 2006). En effet, ce dernier induit le même phénotype que l'inhibition du gène codant Aurora B par des mutations inactivatrices : accumulation de cellules tétraploïdes, par inhibition du point de contrôle du fuseau mitotique et de la cytodivision, dont la prolifération est stoppée en phase G1 par le point de contrôle post-

mitotique. Néanmoins, si les mécanismes pro-apoptotiques sont inactifs, l'inhibition d'Aurora B peut conduire au maintien de la polyploïdie et augmenter l'agressivité de ces tumeurs. Ainsi, la combinaison d'agents thérapeutiques ciblant le SAC, comme les inhibiteurs d'AURORA B, et ciblant les mécanismes de résistance à l'apoptose, comme les inhibiteurs de Bcl2, représente une stratégie thérapeutique prometteuse (Colombo and Moll, 2011).

Les kinésines intervenant dans la mise en place et le maintien du fuseau mitotique (voir paragraphe I-B-1-i des annexes bibliographiques) constituent également une cible thérapeutique potentielle. Notamment, la kinésine Eg5 fait actuellement partie des cibles thérapeutiques pour le développement de nouveaux traitements anti-cancéreux puisqu'elle exerce principalement ses effets durant la mitose (Ferenz et al., 2010). Une nouvelle famille d'inhibiteurs a été récemment mise en évidence : les **composés biarylés** qui possèdent la capacité de concurrencer la fixation de l'ATP sur la kinésine Eg5, grâce à leur interaction sur un site de liaison allostérique. Ils inhibent ainsi l'activité du moteur moléculaire, donc la migration des centrosomes et par conséquent la division cellulaire (Brier et al., 2004; Luo et al., 2007; Marcus et al., 2005; Sakowicz et al., 2004; Tao et al., 2005). Ces inhibiteurs présentent une forte spécificité pour la kinésine Eg5 et exercent ainsi leurs effets très majoritairement sur les cellules prolifératives. Leur efficacité a été mise en évidence dans plusieurs modèles cellulaires ou murins et est actuellement testée dans différents essais cliniques (Jackson et al., 2007) (<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Eg5+inhibitor&Search>). De récentes études *in vitro* mettent en évidence un rôle de cette kinésine dans les cellules du système nerveux, et ainsi un risque potentiellement délétère pour les cellules neurales des patients traités avec ces inhibiteurs. Néanmoins, les tests de toxicité révèlent, à ce jour, le développement peu fréquent de neuropathies en réponse à ces thérapies (El-Nassan, 2013; Falnikar et al., 2011; Nadar et al., 2012; Wojcik et al., 2013).

La kinase MPS1 représente également une cible thérapeutique possible, étant impliquée dans les mécanismes de duplication des centrosomes, du point de contrôle du fuseau mitotique et de cytotélerèse. De plus, MPS1 est retrouvée surexprimée dans de nombreux cancers et a été mise en évidence comme appartenant à la « signature » transcriptomique des tumeurs présentant un taux élevé d'instabilité chromosomique (Carter et al., 2006). Ainsi, des inhibiteurs de MPS1 ont été générés et induisent une inhibition complète du point de contrôle du fuseau mitotique, menant à une aneuploïdie massive associée aux

processus de catastrophe mitotique et d'apoptose (Castedo and Kroemer, 2004; Vitale et al., 2011). Ces inhibiteurs ont démontré leur efficacité *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de xénogreffes, entraînant la mort cellulaire et la régression des tumeurs (Colombo et al., 2010; Jemaà et al., 2013). Néanmoins, comme toutes les molécules conduisant à un arrêt du cycle cellulaire *via* la suractivation d'un point de contrôle (ici le point de contrôle post-mitotique), des mécanismes d'échappement peuvent intervenir et entraîner notamment l'inhibition de la mort cellulaire. A ce titre, les thérapies combinées associant différents agents thérapeutiques devront être envisagées.

ii. Tumeurs au SAC non fonctionnel

Dans le but de traiter les tumeurs ayant un **SAC inactif**, en raison de l'inhibition de l'un de ses acteurs tel que MAD2, MAD1, BUB1 ou BUBR1, les thérapies induisant un arrêt du cycle cellulaire par activation du point de contrôle du fuseau mitotique sont inefficaces. En effet, il a été mis en évidence que les cellules présentant un SAC inactif étaient résistantes aux traitements chimiothérapeutiques classiques impliquant les agents ciblant les microtubules (McGrogan et al., 2008; Weaver and Cleveland, 2005). L'alternative thérapeutique pour ces tumeurs serait d'inhiber l'acteur principal de la progression mitotique : **le complexe APC/C-CDC20**, empêchant ainsi la dégradation de la Cycline B et donc l'avancée du cycle cellulaire.

Il a été mis en évidence dans des modèles *in vitro* et *in vivo* que la **délétion de cdc20** entraînait une diminution du potentiel réplicatif des cellules tumorales et une régression des tumeurs chez la souris (Manchado et al., 2010, 2012). Cet arrêt du cycle cellulaire est observé dans les cellules présentant **un SAC ou un point de contrôle post-mitotique déficients**, *via* l'inhibition de l'activité de CDK1 ou *via* la délétion de la Sécurine, p53 ou Rb, illustrant l'efficacité de cette stratégie pour cibler un grand nombre de tumeurs, quel que soit le statut de leurs points de contrôles mitotiques. Ainsi, plusieurs études ont récemment décrit des inhibiteurs chimiques de CDC20 bloquant efficacement le cycle cellulaire et entraînant une diminution du volume tumoral de xénogreffes chez la souris *Nude* (Jiang and Sliva, 2010; Jiang et al., 2011, 2012; Wang et al., 2013b). L'inhibition du cofacteur cdc20 semble, à ce titre, une stratégie thérapeutique particulièrement prometteuse notamment pour les tumeurs possédant un SAC non fonctionnel.

D'autres études ont permis de mettre en évidence des inhibiteurs de l'activité E3-Ubiquitine ligase d'APC/C. Néanmoins, de façon inattendue, l'efficacité de ces inhibiteurs pour stopper le cycle cellulaire est dépendante d'un SAC fonctionnel. C'est le cas du **TAME** (*Tosyl-L-Arginine Methyl Ester*) (inhibant APC/C) et du **Bortezomib** (un inhibiteur du protéasome, à l'instar du **MG132** classiquement utilisé dans les laboratoires) (Wagenblast et al., 2008; Zeng et al., 2010).

Le TAME se fixe au niveau du site d'interaction d'APC/C avec cdc20 et inhibe ainsi l'activité E3-Ubiquitine ligase du complexe APC/C-cdc20. Cet inhibiteur entraîne un arrêt du cycle en métaphase et la mort cellulaire pour 92 % des cellules (contre 73 % pour le taxol, molécule chimiothérapique conduisant à une activation du SAC par déstabilisation du fuseau mitotique) (Zeng et al., 2010). Le **Bortezomib** permet d'inhiber la dégradation protéique médiée par le complexe APC/C-cdc20. De façon intéressante, bien que les mécanismes d'ubiquitination régulent de nombreux processus biologiques, les effets secondaires issus de l'utilisation du Bortezomib sont faibles et cet agent thérapeutique a été approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) (Matson and Stukenberg, 2011; Wagenblast et al., 2008).

Il a été mis en évidence que l'arrêt du cycle cellulaire médié par l'utilisation du TAME ou du MG132 (dont l'effet peut être transposé au Bortezomib) est dépendant du point de contrôle du fuseau mitotique : la délétion de MAD2 réduit considérablement leurs effets et permet aux cellules de terminer leur division mitotique, limitant leur utilisation aux tumeurs possédant un SAC fonctionnel. Les auteurs expliquent cette dépendance au SAC par l'antagonisme mutuel existant entre APC/C et ce point de contrôle : l'inhibition de l'activité du complexe APC/C par le TAME et le MG132 est amplifiée en présence d'un SAC actif qui inhibe également APC/C-cdc20 (Zeng et al., 2010). Toutefois, le mécanisme moléculaire par lequel les cellules parviennent à se diviser, malgré l'inactivation du complexe APC/C, reste à élucider. De nombreux essais cliniques, dont certains sont actuellement en phase III, utilisant le **Bortezomib** sont en cours, notamment en combinaison avec différents agents ciblant les microtubules, afin d'activer la signalisation du SAC et ainsi amplifier l'inhibition du complexe APC/C (<http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Bortezomib&Search>).

Le point de contrôle du fuseau mitotique constitue donc une cible thérapeutique substantielle utilisée dans de nombreuses pathologies cancéreuses. Néanmoins, les stratégies thérapeutiques actuelles ne semblent pas parfaitement adaptées compte-tenu **(1) de l'inefficacité** des traitements sur les tumeurs dont ce **point de contrôle a été inactivé** dans les processus de transformation tumorale et **(2) de l'émergence** de populations cellulaires **résistantes** à l'arrêt du cycle médié par le SAC, notamment par *mitotic slippage*, **suite à des traitements chimiothérapeutiques** suractivant ce point de contrôle. Dans ce contexte, **bloquer la sortie de mitose** en inhibant l'activité du complexe APC/C-cdc20 apparaît comme une stratégie thérapeutique prometteuse, non seulement pour les tumeurs au SAC inactif, mais également en thérapie combinatoire avec des agents activant ce point de contrôle pour les tumeurs au SAC actif, afin de limiter les mécanismes d'échappement et de chimiorésistance.

PARTIE II :

LA PROTEINE TIF1 γ

TIF1 γ appartient à la famille des protéines TIF1 (*Transcriptional Intermediary Factor 1*), répresseurs transcriptionnels impliqués dans divers processus biologiques. Cette partie décrira, dans un premier temps, la structure des protéines TIF1 (paragraphe II-A), puis nous nous intéresserons aux différentes fonctions cellulaires et moléculaires régulées par TIF1 γ (paragraphe II-B). Enfin, nous étudierons le rôle de cette protéine dans les processus de transformation tumorale, grâce à l'analyse de modèles cellulaires et murins, ainsi que son implication dans les pathologies humaines (paragraphe II-C).

Les fonctions majeures des protéines TIF1 α , β et δ , ainsi que leur rôle en carcinogénèse sont développés dans les annexes bibliographiques.

A. Structure des protéines de la famille TIF1

La famille des protéines TIF1 est composée de quatre membres : **TIF1 α** /TRIM24, **TIF1 β** /TRIM28, **TIF1 γ** /TRIM33 et **TIF1 δ** /TRIM66 (**Figure 24**) (Le Douarin et al., 1995; Friedman et al., 1996; Khetchoumian et al., 2004; Venturini et al., 1999).

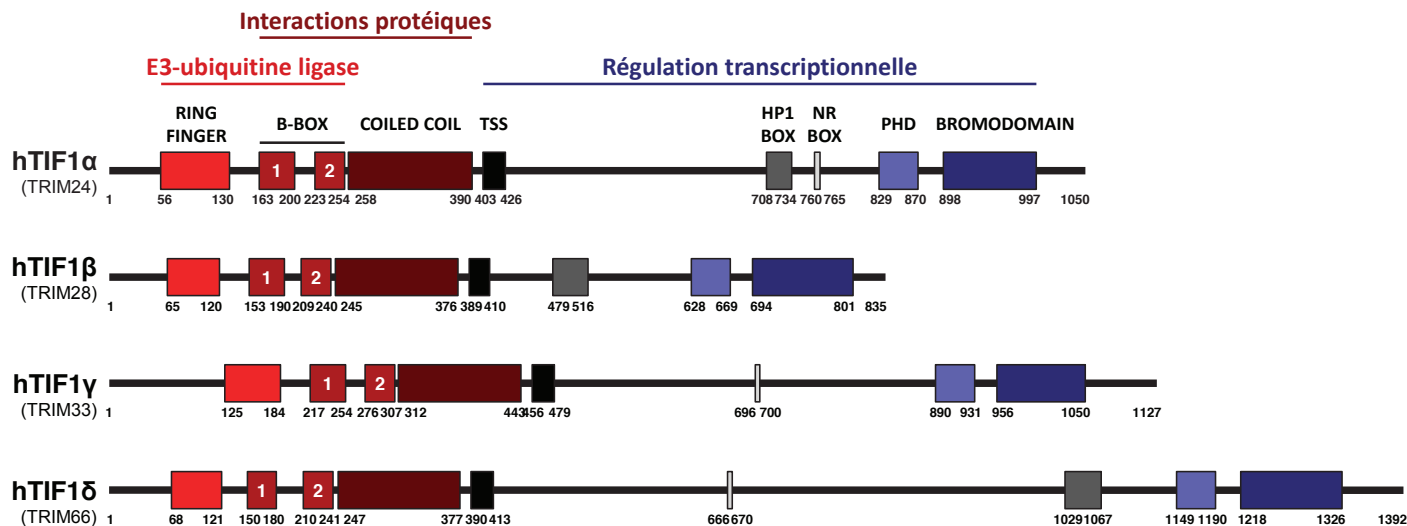


Figure 24 : Différents domaines fonctionnels des protéines TIF1.

Les protéines TIF1 appartiennent à la sous-famille des protéines TRIM (*TRIPartite Motif*) qui ont la particularité d'être composées, en N-terminal, d'un motif RBCC combinant trois domaines protéiques : un motif **RING finger** (*Really Interesting New Gene*), deux domaines **B-Box** et un motif **Coiled-Coil**. Le **domaine RING** est impliqué dans les mécanismes d'ubiquitination et confère une fonction d'E3-Ubiquitine ligase aux protéines qui en sont composées (Deshaies and Joazeiro, 2009). Le **motif Coiled-Coil** des protéines TRIM est impliqué dans les interactions protéines/protéines, jouant ainsi un rôle dans la localisation subcellulaire et l'homo-/hétéro-oligomérisation des protéines TRIM (Peng et al., 2002; Reymond et al., 2001; Vink et al., 2012). Enfin, contrairement aux domaines RING et Coiled-Coil retrouvés dans un grand nombre de protéines, les **motifs B-Box** sont spécifiques de la famille des protéines TRIM (Meroni and Diez-Roux, 2005; Napolitano and Meroni, 2012; Reymond et al., 2001). Ce sont des motifs régulateurs des domaines RING et Coiled-coil, *via*, d'une part, l'amplification de l'activité E3-Ubiquitine ligase apporté par le domaine RING et, d'autre part, la modulation de l'orientation du domaine Coiled-Coil, facilitant ainsi les interactions protéines/protéines de façon directe ou indirecte (Torok and Etkin, 2001).

Parmi la famille TRIM, les protéines TIF1 ont la particularité d'être composées, en C-terminal, d'un domaine **PHD** (Plant HomeoDomain) et d'un **Bromodomaine**, ces domaines de liaisons à l'ADN étant impliqués dans la répression transcriptionnelle notamment *via* le recrutement de cofacteurs de transcription (Bienz, 2006; Ivanov et al., 2007; Meroni and Diez-Roux, 2005; Napolitano and Meroni, 2012).

Les protéines TIF1 partagent également un motif **TSS** (*TIF1 Signature Sequence*) de 25 acides aminés, riche en phénylalanine et tryptophane, ainsi qu'un domaine « **HP1 box** » permettant l'interaction avec la protéine HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) impliquée dans le compactage de la chromatine. Ces deux motifs sont indispensables à la fonction de répresseur transcriptionnel des protéines TIF1 (Venturini et al., 1999; Nielsen et al., 1999). Enfin, les protéines TIF1 possèdent un motif de **liaison aux récepteurs nucléaires** de type LxxLL (**NR box**, *Nuclear Receptor*) leur conférant un rôle dans la régulation transcriptionnelle médiée par ces récepteurs (Plevin et al., 2005) (voir paragraphe II-A-1-i des annexes bibliographiques).

B. Fonctions de TIF1 γ

TIF1 γ est le troisième membre de la famille TIF1 à avoir été identifié, chez l'Homme en 1999, puis chez la souris en 2004 (Venturini et al., 1999; Yan et al., 2004). Ce facteur nucléaire de 124 kDa est exprimé de façon ubiquitaire dans divers organes et est conservé au cours de l'évolution (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Danio rerio*, *Xenopus laevis*...) (Wisotzkey et al., 2014).

TIF1 γ est décrit par de nombreuses études comme un régulateur de la voie de signalisation du TGF β (*Transforming Growth Factor β*), que ce soit *via* son activité E3-Ubiquitine ligase ou grâce à ses fonctions de régulateur transcriptionnel.

Le TGF β est une cytokine pléiotrope jouant un rôle essentiel aussi bien pendant l'embryogénèse que chez l'adulte. Il intervient dans divers processus biologiques tels que la différenciation, la prolifération, l'apoptose et la migration, notamment *via* la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes (Massagué, 2012; Ross and Hill, 2008).

Le rôle de TIF1 γ dans la voie du TGF β reste très controversé, TIF1 γ agissant soit comme un régulateur positif, soit comme un régulateur négatif de cette voie de signalisation, en fonction du contexte cellulaire. Ainsi, TIF1 γ est impliqué, *via* son rôle dans la voie du TGF β , dans le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire et la prolifération. Néanmoins, TIF1 γ exerce également certaines de ses fonctions indépendamment de la voie du TGF β , comme la réparation de l'ADN et la régulation de la progression mitotique.

1. Fonction de TIF1 γ dépendante de la voie du TGF β : contrôle de la différenciation cellulaire

i. Description générale de la voie du TGF β

Au niveau moléculaire, le TGF β se fixe à son récepteur de type II (**T β RII**, *TGF β Receptor II*), possédant une activité sérine/thréonine kinase constitutive, ce qui permet son interaction avec le récepteur de type I (**T β RI**, *TGF β Receptor I*) et ainsi la formation d'un tétramère composé de deux récepteurs T β RII et de deux récepteurs T β RI en association avec un dimère de ligands TGF β . Cette interaction induit la phosphorylation et ainsi l'activation, des récepteurs de type I par les récepteurs de type II (Derynck and Feng,

1997; Huang and Chen, 2012; Shi and Massagué, 2003). T β RI ainsi activé, et possédant également une activité sérine/thréonine kinase, va à son tour poursuivre la voie de signalisation en phosphorylant les protéines **SMAD2** (*Sma and Mothers Against Decapentaplegic related proteins*) et **SMAD3** en C-terminal, permettant leur multimérisation avec la protéine **SMAD4**. Le complexe SMAD2 phosphorylé/SMAD3 phosphorylé/SMAD4, ainsi formé, va être transloqué dans le noyau et interagir avec la chromatine, afin de réguler la transcription de différents gènes cibles (**Figure 25**) (ten Dijke and Hill, 2004; Feng and Derynck, 2005; Javelaud and Mauviel, 2004; Mauviel, 2005; Moustakas and Heldin, 2009).

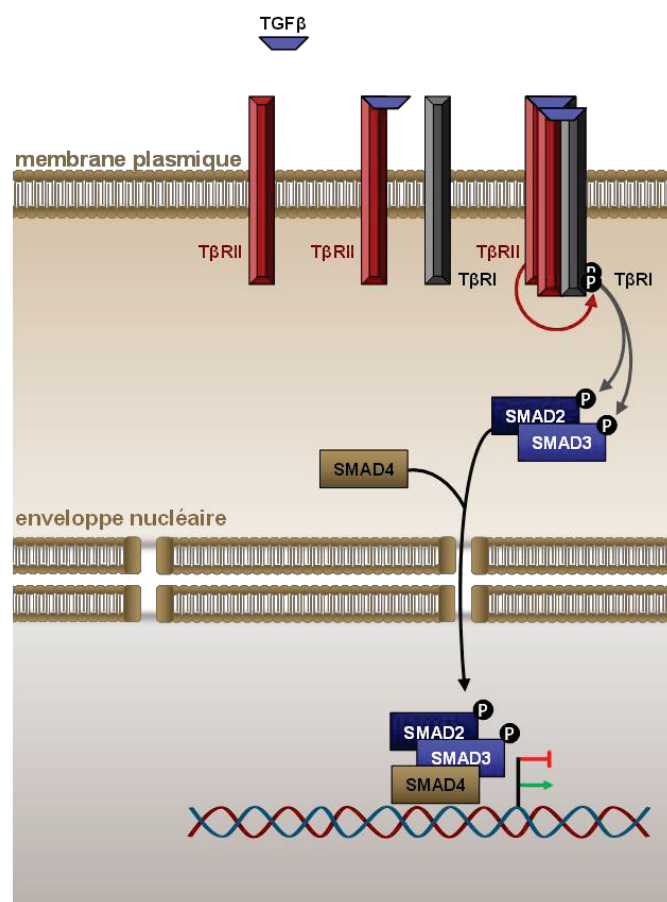


Figure 25 : Voie de signalisation canonique du TGFβ (P: phosphorylation).

La voie de signalisation du TGFβ dépendante des protéines SMADs est qualifiée de voie « canonique », par opposition aux autres voies de signalisation intracellulaires pouvant être activées par la fixation du TGFβ sur ses récepteurs (voies des MAPK (ERK, p38 et JNK), PI3K et des Rho GTPases) (Giehl et al., 2007; Javelaud and Mauviel, 2005; Yamashita

et al., 2009; Yue and Mulder, 2000; Zhang, 2010). De façon intéressante, les récepteurs T β RI et T β RII possèdent, en plus de leur activité sérine-thréonine kinase, une activité **tyrosine kinase** qui semble être impliquée dans l'activation des voies non canoniques (Lee et al., 2007a; Moustakas and Heldin, 2005). La voie de signalisation activée en réponse à la fixation du ligand TGF β sur ses récepteurs serait donc dépendante du type d'activité kinase de T β RII et T β RI.

La voie canonique des protéines SMADs induit classiquement, au sein des cellules épithéliales, **un arrêt de prolifération** (activation transcriptionnelle des CKI p21 et p15 et inhibition des facteurs prolifératifs c-MYC et ID (*Inhibitor of DNA binding*) (Alexandrow and Moses, 1995; Datto et al., 1995; Hannon and Beach, 1994; Kang et al., 2003; Reynisdottir et al., 1995; Siegel and Massagué, 2003)), un programme **pro-apoptotique** (inhibition du facteur anti-apoptotique Bcl2, relargage de cytochrome C, activation des caspases... (Francis et al., 2000; Freathy et al., 2000; Inman and Allday, 2000; Sánchez-Capelo, 2005; Schuster and Krieglstein, 2002; Shima et al., 1999)), ainsi que l'induction de la **transition épithélio-mésenchymateuse** (inhibition des marqueurs épithéliaux, induction des marqueurs mésenchymateux et des gènes embryonnaires (Heldin et al., 2009, 2012; Kang and Massagué, 2004; Valcourt et al., 2005; Zavadil and Böttinger, 2005)).

ii. Différenciation des tissus embryonnaires : rôle controversé de TIF1 γ

En 2005, TIF1 γ a été identifié chez le xénope, par le groupe du Dr Stefano Piccolo, grâce à un criblage dont le but était d'identifier des protéines impliquées dans la différenciation ectodermique. Dupont *et al.* ont ainsi pu mettre en évidence une protéine nommée **Ectodermin** (protéine homologue de TIF1 γ) dont la **surexpression** chez l'embryon de xénope induisait une **diminution d'expression des marqueurs mésodermiques et une augmentation des marqueurs ectodermiques** (Dupont et al., 2005). Cette étude décrit, pour la première fois, le rôle de TIF1 γ dans la régulation négative de la voie de signalisation du TGF β , par le biais de son activité E3-Ubiquitine ligase. En effet, l'induction de la différenciation ectodermique par TIF1 γ implique l'inhibition des voies TGF β /Activine/Nodal (ligands appartenant à la superfamille du TGF β), voies classiquement impliquées dans la différenciation mésodermique (Hill, 2001; Whitman, 2001; Wu and Hill, 2009). TIF1 γ interagit *in vivo* avec SMAD4, induit sa mono-

ubiquitination entraînant sa délocalisation dans le cytoplasme et ainsi l'inhibition de ses fonctions de régulateur transcriptionnel (Dupont et al., 2009; Xue et al., 2014). A l'inverse, SMAD4 peut être déubiquitinée par l'enzyme FAM/USP9x, permettant sa relocalisation nucléaire et le rétablissement de la voie de signalisation canonique du TGF β . Ainsi, la **délétion de FAM/USP9x** entraîne le même phénotype que la **surexpression de TIF1 γ** dans les embryons de xénope : **inhibition de la différenciation mésodermique** et **induction de la différenciation ectodermique** (Dupont et al., 2009). Le mécanisme moléculaire par lequel TIF1 γ inhibe les fonctions transcriptionnelles de SMAD4 a été plus précisément décrit par une étude mettant en évidence l'importance des régions PHD/Bromodomaine de TIF1 γ dans son rôle de régulateur négatif de la voie du TGF β (Agricola et al., 2011). En effet, cette étude a démontré, qu'après traitement au TGF β , TIF1 γ était recrutée au niveau de la chromatine, *via* ses motifs PHD/bromodomaine, ce qui induit son activité E3-Ubiquitine ligase et permet ainsi, l'ubiquitination de SMAD4, lorsque cette dernière est complexée aux protéines SMAD2/3 phosphorylées au niveau de la chromatine. SMAD4 est alors délocalisée dans le cytoplasme et l'expression des gènes cibles de la voie du TGF β ne peut plus être modulée par la voie de signalisation canonique (Figure 26) (Agricola et al., 2011).

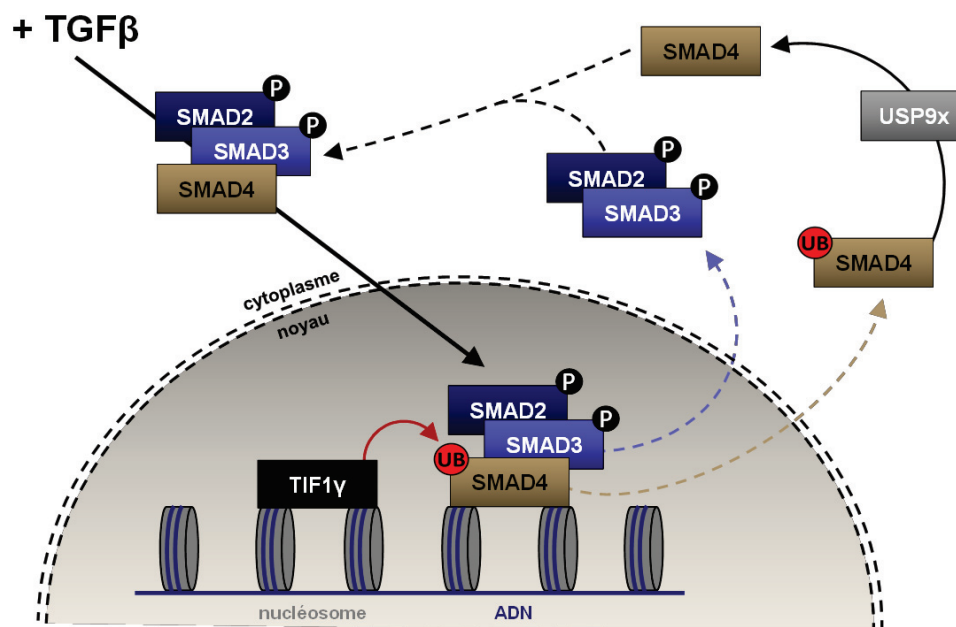


Figure 26 : Régulation négative de la voie du TGF β par TIF1 γ : ubiquitination de SMAD4 (P: phosphorylation ; UB: ubiquitination).

Le rôle de TIF1 γ dans la différenciation des tissus ectodermiques a par la suite été remis en question dans une seconde étude, également réalisée par le groupe du Dr Stefano Piccolo. Ces travaux, effectués chez la souris, identifient cette fois-ci TIF1 γ comme un activateur de la **différenciation mésodermique** et de la maintenance des annexes embryonnaires (Morsut et al., 2010). En effet, de façon surprenante, les embryons de souris présentant **une inactivation homozygote de TIF1 γ** présentent une **absence de mésoderme**, contrairement à ce qui est observé dans l'embryon de xénope. Les auteurs expliquent ce résultat par le fait que, chez les amphibiens, la formation du mésoderme est un évènement précoce, tandis que chez les mammifères, c'est un évènement tardif qui nécessite la présence d'annexes extra-embryonnaires fonctionnelles. TIF1 γ , en limitant la voie Nodal/Smad4, perturberait la mise en place des annexes embryonnaires et ainsi, la formation du mésoderme au cours du processus de gastrulation (Morsut et al., 2010). Le rôle activateur de TIF1 γ dans la différenciation mésodermique est conforté par une précédente étude mettant en évidence la forte expression de Moonshine (l'homologue de TIF1 γ chez le poisson zèbre) dans le mésendoderme (Ransom et al., 2004). Néanmoins, l'hypothèse selon laquelle l'implication de TIF1 γ dans la différenciation mésodermique impliquerait son rôle dans la formation des annexes embryonnaires ne peut pas être transposée dans le modèle de poisson zèbre, ce dernier appartenant au clade des anamniotes (poissons et amphibiens) n'ayant pas d'annexes embryonnaires. TIF1 γ doit donc réguler la différenciation mésodermique par d'autres mécanismes moléculaires.

Les travaux du groupe du Dr Joan Massagué confortent le rôle activateur de TIF1 γ dans la différenciation **mésendodermique** dans un modèle de cellules souches embryonnaires de souris (mESCs, *mouse Embryonic Stem Cells*). Lorsqu'elles sont cultivées en conditions appropriées, les mESCs forment des corps embryonnaires ayant la capacité de se différencier dans les trois types de tissus embryonnaires (mésoderme, endoderme et ectoderme). Les mESCs **délétées pour TIF1 γ** , par interférence à l'ARN, présentent un **défaut de différenciation des tissus mésodermiques et endodermiques**, comme observé précédemment dans les embryons de souris (Massagué and Xi, 2012; Morsut et al., 2010; Xi et al., 2011). Ces travaux mettent en évidence, cette fois-ci, un rôle collaboratif de TIF1 γ et SMAD4 dans la régulation transcriptionnelle pro-mésodermique. Dans les cellules indifférenciées, les *poised genes*, impliqués dans les processus de différenciation, sont classiquement quiescents et hétérochromatiques, afin de maintenir la pluripotence

des cellules. En réponse à divers stimuli, les *poised genes* sont facilement ré-activables, afin d'initier rapidement la différenciation. Pour cela, les facteurs de dédifférenciation Nanog, Oct4 et Sox2 sont fixés sur les promoteurs des *poised genes* et régulent leur état hétérochromatique en recrutant la méthyl-transférase SETDB1, permettant la triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (Bilodeau et al., 2009; Loh et al., 2006; Yeap et al., 2009; Young, 2011). Cette signature épigénétique entraîne la fixation de la protéine HP1 (*Heterochromatin Protein 1*) et ainsi, le compactage de la chromatine (Schultz et al., 2002). Néanmoins, malgré la régulation du statut « compacté » des *poised genes*, les facteurs Nanog, Oct4 et Sox2 recrutent également l'ARN polymérase de type II sur les régions promotrices, mais sous une forme inactive car complexée à différentes protéines inhibitrices (Kagey et al., 2010; Young, 2011).

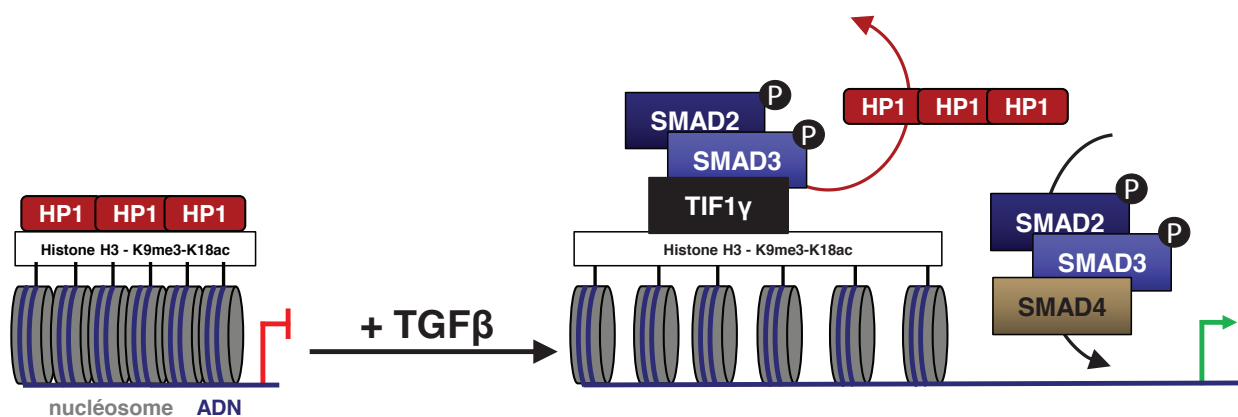


Figure 27 : Régulation positive de la voie du TGFβ par TIF1γ : accessibilité du complexe SMAD2/3/4 aux régions promotrices des *poised genes* impliqués dans la différenciation mésendodermique (P: phosphorylation).

Après traitement par les ligands Nodal ou Activine, le complexe SMAD2/SMAD3/TIF1γ se forme et se fixe sur les histones méthylées des promoteurs des *poised genes* via son interaction avec l'histone H3 K9me3-K18ac. TIF1γ permet ainsi la délocalisation de la protéine HP1, impliquée dans le compactage de la chromatine, et rend « accessibles » au complexe transcriptionnel SMAD2/3/4, les régions promotrices de gènes impliqués dans la différenciation mésendodermique, tels que *Gsc* (*Goosecoid*) ou *Mixl1* (*Mix-like homeobox protein 1*) (Figure 27) (Kwon and Workman, 2008; Massagué and Xi, 2012; Xi et al., 2011). Ainsi, l'absence de TIF1γ limite l'accessibilité de SMAD4 à la chromatine et empêche la formation des tissus mésodermiques et endodermiques *in vivo*, mettant en évidence un rôle collaboratif de TIF1γ et SMAD4.

Pour résumer, TIF1 γ est donc impliquée, **de différentes façons en fonction des espèces**, dans la régulation de la voie du TGF β et ainsi, dans les processus de différenciation des tissus embryonnaires. Chez le xénope, TIF1 γ induit la différenciation ectodermique en inhibant la voie du TGF β *via* l'ubiquitination de SMAD4, alors que chez la souris et le poisson zèbre, TIF1 γ induit la différenciation méso-endodermique en augmentant l'accessibilité de SMAD4 aux promoteurs des gènes impliqués dans ce type de différenciation (**Figure 28**).

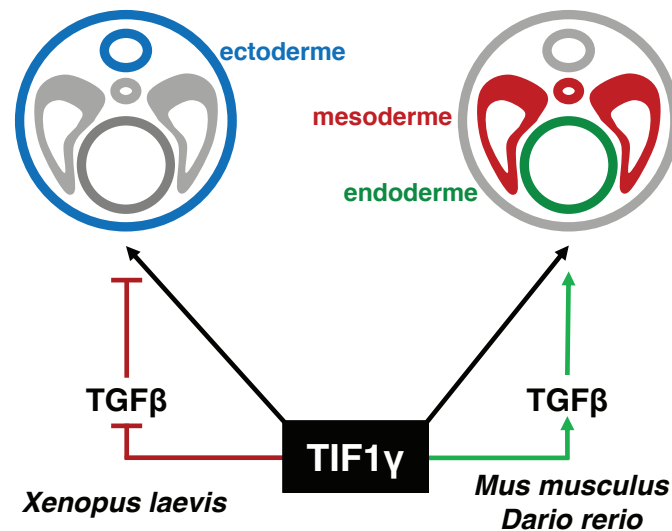


Figure 28 : Différents rôles de TIF1 γ dans la différenciation des tissus embryonnaires et la voie du TGF β en fonction des espèces.

iii. Différenciation hématopoïétique

TIF1 γ a également été largement impliquée dans la différenciation hématopoïétique. Dans les embryons de poisson zèbre, **l'inhibition de l'expression de Moonshine** (homologue de TIF1 γ), induit l'apoptose des progéniteurs hématopoïétiques, menant à **l'absence d'érythrocytes** et ainsi, à un phénotype létal embryonnaire. Les rares individus échappant à cette létalité présentent de graves anomalies du système cardio-vasculaire, ainsi qu'une **absence de maturation des érythrocytes** (Monteiro et al., 2011; Ransom et al., 2004). La même observation a été faite dans des cellules humaines et murines dans lesquelles la perte de TIF1 γ ralentit la différenciation hématopoïétique érythrocytaire à partir de cellules progénitrices CD34 $^+$ (He et al., 2006; Randrianarison-Huetz et al., 2010). Les auteurs de ces travaux ont ainsi pu mettre en évidence le rôle distinct des voies du TGF β dépendantes soit de SMAD4, soit de TIF1 γ , dans la différenciation hématopoïétique : TIF1 γ peut interagir avec les protéines SMAD2 et SMAD3 phosphorylées, afin de former

un complexe SMAD2/SMAD3/TIF1 γ régulant d'autres processus biologiques que le complexe canonique SMAD2/3/4 (He et al., 2006). En effet, tandis que le complexe **SMAD2/3/4** est impliqué dans **l'inhibition de la prolifération** des progéniteurs hématopoïétiques, le complexe **SMAD2/SMAD3/TIF1 γ** permet, quant à lui, **la différenciation érythrocytaire**. Cette étude démontre également que la formation du complexe SMAD2/SMAD3/TIF1 γ s'effectue au détriment du complexe SMAD2/3/4, TIF1 γ et SMAD4 se liant de façon compétitive aux protéines SMAD2/3 phosphorylées.

Le rôle de TIF1 γ dans la différenciation hématopoïétique a par la suite été approfondi par Bai et al. dans deux études décrivant l'implication de TIF1 γ , chez le poisson zèbre et la souris, dans l'élongation de la transcription des gènes de différenciation érythrocytaire (Bai et al., 2010, 2013). En effet, dans les phénomènes de différenciation, l'un des processus clé est **l'inhibition de l'ARN polymérase II** qui est **fixée** sur les promoteurs de gènes nécessaires à la différenciation (les *poised genes*), mais stoppée par les protéines **PAF** (*Pol II-Associated Factor*) et **DSIF** (DRB Sensitivity Inducing Factor) inhibant l'élongation de la transcription. Ce processus permet une activation très rapide de la transcription et donc, de la différenciation, lorsque ce blocage est levé, puisque la machinerie de transcription est déjà en place.

De nouvelles études viennent confirmer le rôle de TIF1 γ dans l'activation transcriptionnelle des *poised genes* décrit par le groupe du Dr Joan Massague au cours de la différenciation mésodermique (Xi et al., 2011). En effet, TIF1 γ est impliqué dans l'activation de l'ARN polymérase et l'élongation de la transcription, permettant ainsi la différenciation érythrocytaire. **TIF1 γ** appartient au complexe protéique impliqué dans **la réactivation de la polymérase II**, avec la protéine chaperonne FACT (*FAcilitates Chromatin Transcription*), le complexe transcriptionnel SCL (*Stem Cell Leukemia*) et la protéine kinase pTEFb (*positive Transcription Elongation Factor b*) (**Figure 29**). TIF1 γ permet l'association de ce complexe et ainsi, l'activation de l'élongation de la transcription des ARN messagers *via* la phosphorylation de DSIF et de l'ARN polymérase II. Ainsi, en absence de TIF1 γ , seule l'extrémité 5' d'ARN messagers impliqués dans la différenciation érythrocytaire est détectable (*gata1, scl, be3, epb4.1, ekf, gfi-1b* et *hba*) et non l'extrémité 3'. TIF1 γ régule donc la différenciation hématopoïétique en permettant l'élongation de la transcription de gènes érythrocytaires (Bai et al., 2010, 2013; Boatman et al., 2013; Gilchrist and Adelman, 2010).

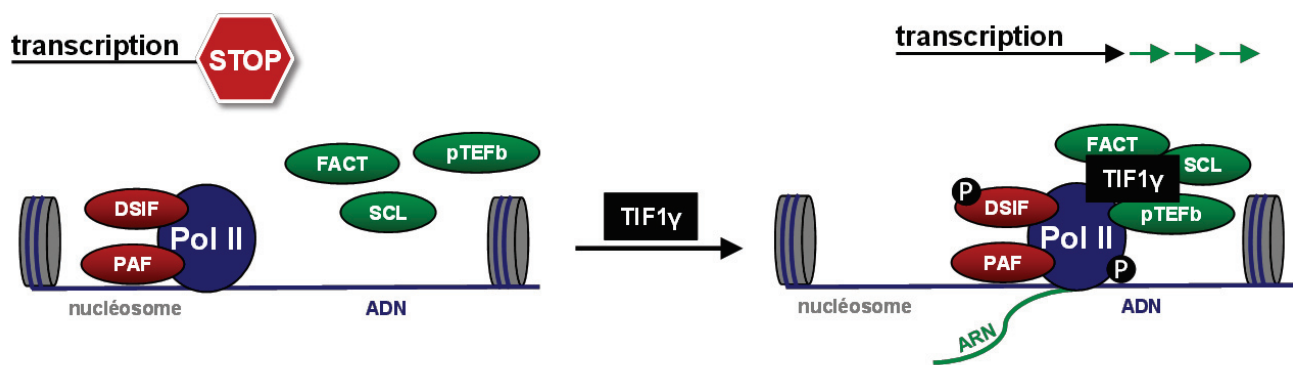


Figure 29 : Implication de TIF1 γ dans l'élongation de la transcription des *poised genes* (P : phosphorylation).

Afin d'activer la différenciation érythrocytaire, TIF1 γ induit, chez le poisson zèbre, l'expression du marqueur érythrocytaire *gata1* et réprime l'expression du gène *pu.1* impliqué dans la différenciation myéloïde. Ainsi, en absence de TIF1 γ , la différenciation érythrocytaire est inhibée au profit de la différenciation myéloïde (Kusy and Roméo, 2011; Kusy et al., 2011; Monteiro et al., 2011). De plus, TIF1 γ se fixe sur les régions promotrices cibles du facteur *pu.1* et inhibe son activité transcriptionnelle (Kusy et al., 2011). Chez la souris, la délétion homozygote de TIF1 γ , spécifiquement dans le compartiment hématopoïétique, (modèle [*cFES-Cre* ; *Tif1 γ ^{Lox/Lox}*]) induit une accumulation des monocytes dans le sang périphérique, la moelle osseuse, le foie et la rate, menant à un syndrome proche de la Leucémie MyéloMonocytaire Chronique (CMML) confortant un rôle de TIF1 γ dans l'inhibition de la différenciation myéloïde (Aucagne et al., 2011a). Contrairement au modèle du poisson zèbre dans lequel la perte de TIF1 γ mène à l'absence d'érythrocytes, aucune anémie n'est détectée chez les souris n'exprimant pas TIF1 γ spécifiquement dans le compartiment hématopoïétique. Ceci peut aisément être expliqué par un mécanisme de compensation : une diminution des érythroblastes de la moelle osseuse est compensée par une érythropoïèse splénique (Aucagne et al., 2011a; Bai et al., 2013).

Le TGF β a été décrit comme induisant la différenciation myéloïde et la différenciation érythrocytaire (Akel et al., 2013; Challen et al., 2010; Krystal et al., 1994; Miranda and Johnson, 2007). TIF1 γ participe donc à l'induction de la différenciation érythrocytaire induite par le TGF β , mais limite les effets de celui-ci sur la différenciation myéloïde médiée par SMAD4. TIF1 γ pourrait ainsi être l'acteur moléculaire permettant de dicter l'effet final du TGF β sur la différenciation hématopoïétique. Néanmoins, le mécanisme moléculaire impliqué n'est pas décrit à ce jour. Ce pourrait être *via* l'inhibition de SMAD4

par ubiquitination ou par compétition pour l'interaction avec le complexe des protéines SMAD2/3 phosphorylées. Ainsi, en absence de TIF1 γ , le TGF β induit la différenciation myéloïde, menant à une sur-représentation de cette sous-population hématopoïétique dans les souris déficientes pour TIF1 γ (Aucagne et al., 2011a). Ce résultat a été validé dans une autre étude démontrant le rôle de TIF1 γ dans le vieillissement des cellules souches hématopoïétiques chez l'adulte. En effet, l'expression de TIF1 γ est diminuée dans ces cellules au cours du vieillissement, ce qui entraîne une sensibilité accrue aux effets du TGF β médiés par SMAD4 conférant, aux cellules souches hématopoïétiques vieillissantes, une capacité à générer préférentiellement des cellules progénitrices de la lignée myéloïde (Quéré et al., 2014). Cette étude démontre également un mécanisme original par lequel TIF1 γ exerce un rôle négatif sur la voie du TGF β *via* la modification post-traductionnelle du récepteur au TGF β de type I : dans les cellules souches hématopoïétiques, TIF1 γ induit la poly-ubiquitination de T β RI, menant à sa dégradation par le protéasome, limitant ainsi l'initiation de la voie de signalisation du TGF β (Quéré et al., 2014). Néanmoins, cette étude ne décrit pas si ce phénomène est direct ou indirect. Compte-tenu de la localisation nucléaire de TIF1 γ et de la localisation membranaire de T β RI, l'ubiquitination de T β RI en présence de TIF1 γ implique sûrement un troisième partenaire, dont la localisation doit être, au moins de façon transitoire, cytoplasmique.

Enfin, TIF1 γ est également impliqué dans la différenciation lymphocytaire : chez la souris, la perte de TIF1 γ dans le compartiment hématopoïétique mène à une diminution drastique du nombre de lymphocytes B matures et immatures, ceci *via* l'induction transcriptionnelle de marqueurs pro-apoptotiques tels que *p53* et *Pten* (Bai et al., 2013). De plus, en collaboration avec l'équipe du Dr Julien Marie, nous avons mis en évidence en 2009, le rôle crucial du TGF β dans la différenciation et la maintien des cellules iNKT (*invariant Natural Killer T cells*), appartenant à une sous-classe des lymphocytes T reconnaissant la molécule présentatrice d'antigène glycolipidique CD1d (Matsuda et al., 2008). Tandis que la voie canonique du TGF β , impliquant la protéine SMAD4, permet la maintenance des marqueurs de différenciation terminale des cellules iNKT (marqueurs Tbet et CD122), la voie du TGF β dépendante de TIF1 γ exerce un effet anti-apoptotique sur les progéniteurs des cellules iNKT, permettant la survie et la prolifération de ces progéniteurs (Doisne et al., 2009). Ainsi, au niveau de la différenciation lymphoïde, TIF1 γ et SMAD4 semble coopérer : TIF1 γ inhibe la mort cellulaire tandis que SMAD4 permet d'initier les processus de différenciation.

En résumé, la régulation de la différenciation hématopoïétique par le TGF β s'effectue *via* des voies de signalisation différentes : la voie TIF1 γ induit la différenciation érythrocytaire, SMAD4 permet la différenciation myéloïde et ces deux protéines coopèrent au niveau de la différenciation lymphoïde (**Figure 30**). De façon intéressante, il a été suggéré que TIF1 γ puisse induire la transcription des récepteurs T β RI et T β RII, ainsi que celle de SMAD4 (Kusy et al., 2011). Ceci entraînerait un rétrocontrôle négatif permettant l'équilibre homéostatique entre les différents sous-types de cellules hématopoïétiques.

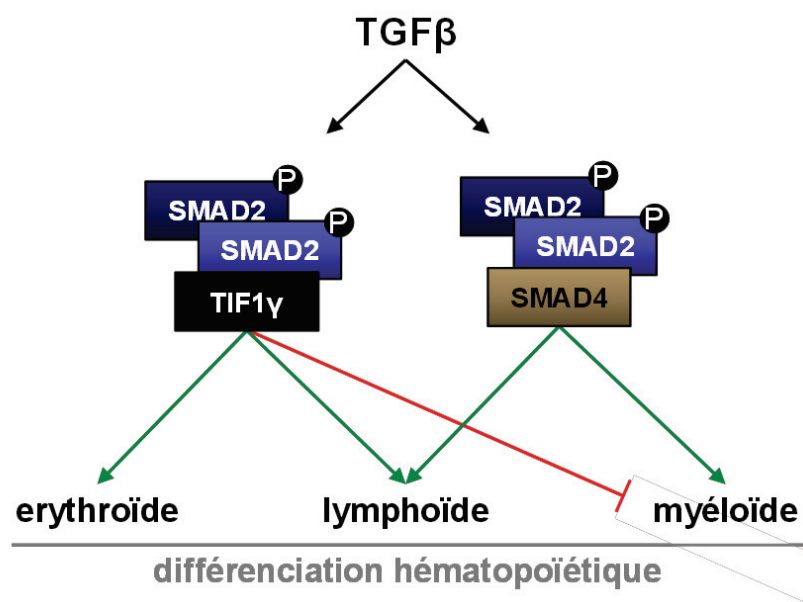


Figure 30 : Régulation de la différenciation hématopoïétique par le TGF β : rôles des complexes SMAD2/3/TIF1 γ et SMAD2/3/4 (P: phosphorylation)).

iv. Autres types de différenciation cellulaire

Plusieurs études rapportent un rôle de TIF1 γ dans la **différenciation neuronale**. En effet, une étude de 2004 met en évidence une forte expression de Moonshine dans le système nerveux central des embryons de poisson zèbre, ainsi que de TIF1 γ dans celui de la souris (Ransom et al., 2004). Ce résultat a été validé dans les embryons de xénope où TIF1 γ a été impliqué dans les processus de différenciation neurale *via* l'inhibition de la voie BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*) (Dupont et al., 2005), ainsi que chez la drosophile où l'homologue des protéines TIF1, Bonus, a été historiquement mis en évidence *via* son rôle dans le développement du système nerveux périphérique (Beckstead et al., 2001; Salzberg et al., 1997). Enfin, une étude récente décrit, chez la souris, la redondance

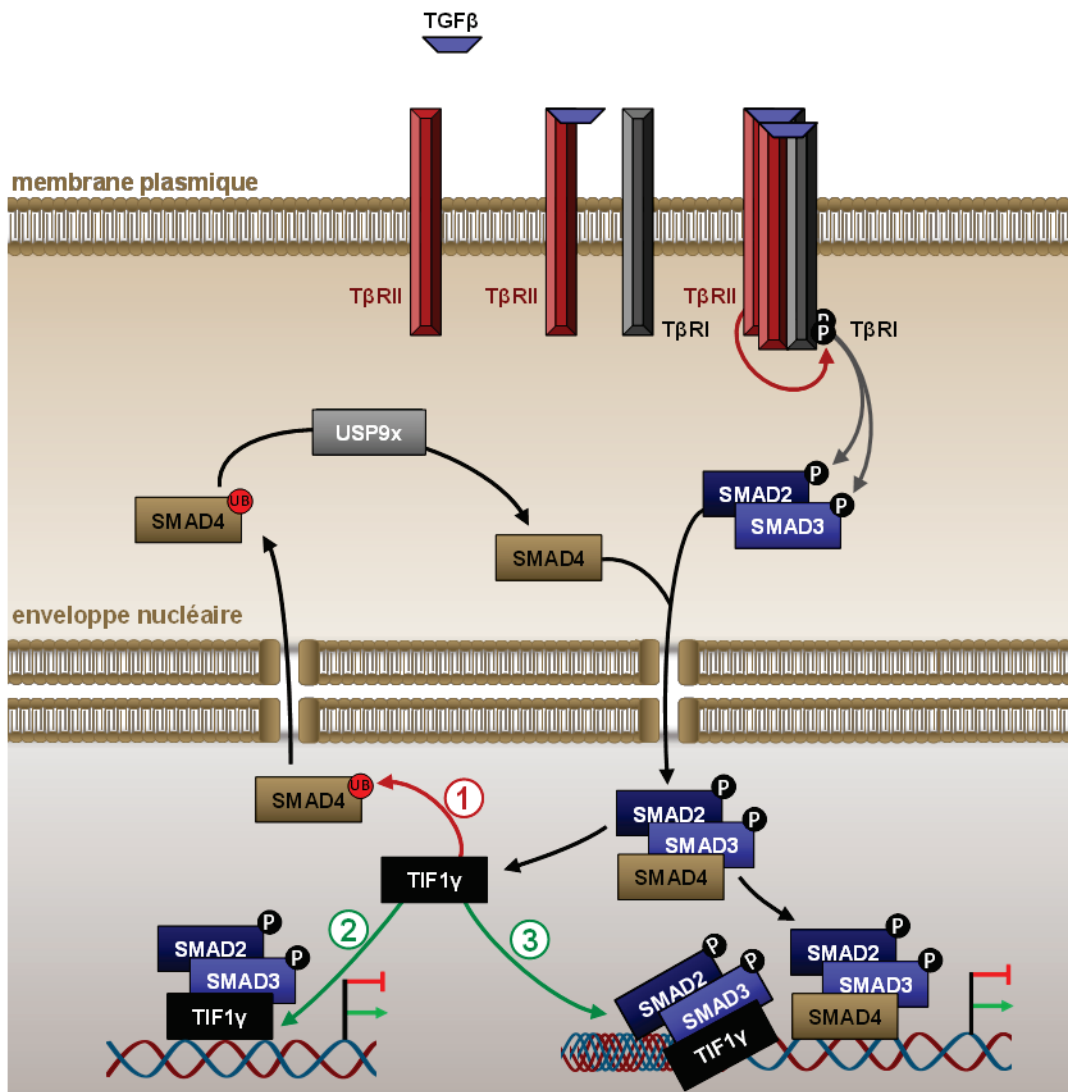
fonctionnelle entre SMAD4 et TIF1 γ dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules souches neurales (Falk et al., 2013).

Le rôle de TIF1 γ dans la différenciation cellulaire a également été décrit dans les **cellules mammaires**, grâce à l'utilisation de modèles murins permettant la délétion conditionnelle de TIF1 γ spécifiquement dans les cellules épithéliales mammaires (modèles [*Mmtv-Cre* ; *TIF1 γ ^{Lox/Lox}*] et [*Wap-Cre* ; *TIF1 γ ^{Lox/Lox}*]) (Hesling et al., 2013). Dans ces modèles, la perte de TIF1 γ entraîne l'absence de lactation chez les femelles gestantes, ainsi qu'une atrophie des glandes mammaires. Les auteurs ont ainsi pu mettre en évidence le rôle de TIF1 γ dans la prolifération terminale des canaux lobulaires et la différenciation des cellules épithéliales alvéolaires intervenant en fin de gestation. En condition normale, le TGF β exerce un rôle négatif sur la différenciation alvéolaire terminale et la lactation *via* l'inhibition de la phosphorylation du facteur de transcription STAT5 par le récepteur à l'hormone prolactine (Bierie et al., 2009; Wu et al., 2008). Ainsi, l'activité du TGF β doit être inhibée à la fin de la gestation pour permettre la mise en place des processus de lactation. En absence de TIF1 γ , la voie du TGF β reste active en fin de gestation, menant à l'absence de lactation *via* l'inhibition de la différenciation alvéolaire terminale et de la transcription de gènes tels que la β -caséine ou l' α -lactalbumine impliqués dans la composition du lait maternel (Hesling et al., 2013). Dans ce modèle, TIF1 γ inhibe donc la voie du TGF β et restaure la phosphorylation de STAT5 permettant la différenciation cellulaire, ainsi que la transcription des gènes codant les protéines du lait maternel.

v. Modèle intégratif du rôle de TIF1 γ dans la voie du TGF β

Les différentes études ci-dessus décrivent TIF1 γ comme un régulateur de la voie du TGF β au rôle antagoniste pouvant à la fois inhiber, activer ou participer aux effets du TGF β . Les différents rôles exercés par TIF1 γ dans cette voie de signalisation sont complémentaires, mais non mutuellement exclusifs (**Figure 31**): **(1)** l'inhibition de SMAD4 par ubiquitination permet **(2)** d'augmenter l'accessibilité des protéines SMAD2/3 phosphorylées à TIF1 γ , favorisant ainsi la formation d'un complexe transcriptionnel SMAD2/3/TIF1 γ qui régule différenciellement la transcription de nombreux gènes, et qui **(3)** permet de rendre accessible certaines régions chromatiniennes condensées au

complexe SMAD2/3/4, grâce à ces fonctions de remodelage de la chromatine (Dupont et al., 2012; He et al., 2006; Xi et al., 2011).



- ① **Rôle négatif** : ubiquitination et délocalisation de SMAD4
- ② **Rôle positif** : formation d'un complexe SMAD2/SMAD3/TIF1γ
- ③ **Rôle positif** : coopération avec le complexe SMAD2/3/4

Figure 31 : Modèle intégratif du rôle de TIF1γ dans la voie de signalisation du TGFβ (P: phosphorylation ; UB: ubiquitination).

De plus, les fonctions opposées du TGFβ lui-même, en fonction du contexte cellulaire, soutiennent cette hypothèse. Pour ne citer que quelques exemples, le TGFβ **(1)** exerce un effet cyostatique sur les cellules épithéliales, mais permet la croissance des cellules mésenchymateuses, **(2)** active ou inhibe l'apoptose selon le contexte cellulaire et enfin,

(3) possède des fonctions anti-tumorales dans les phases précoces de la transformation tumorale, mais agit comme un facteur pro-oncogénique dans les phases avancées (Ikushima and Miyazono, 2010; Massagué, 2012; Principe et al., 2014; Wakefield and Roberts, 2002). Ainsi, la voie du TGF β impliquant TIF1 γ apparaît comme une troisième option, après la voie canonique et les voies non-canoniques : une voie « pseudo-canonique » utilisant les effecteurs SMAD2/3 pour réguler son activité, mais pouvant agir indépendamment de l'acteur central SMAD4.

2. Fonctions de TIF1 γ indépendantes de la voie du TGF β

i. Réparation de l'ADN et infection virale

TIF1 γ a récemment été mis en évidence dans les processus de réparation de l'ADN, de façon indépendante de son rôle dans la voie du TGF β . Lors de dommages à l'ADN, les protéines **PARP** (*Poly ADP-Ribose Polymerase*) sont rapidement recrutées aux sites de lésions et induisent le recrutement des facteurs de réparation de l'ADN et des protéines entraînant le décompactage de l'ADN, permettant ainsi une meilleure accessibilité à l'ADN des protéines de réparation (Hassa et al., 2006). **ALC1** (*Amplified in Liver Cancer 1*) est recrutée aux sites de dommages à l'ADN par la protéine PARP1 et induit la relaxation de la chromatine (Gottschalk et al., 2012). Néanmoins, la surexpression d'ALC1 entraîne une sensibilité accrue aux dommages à l'ADN, due à la présence de chromatine décondensée préférentiellement sensible aux agents provoquant des cassures de l'ADN comme la bléomycine (Ahel et al., 2009). TIF1 γ est recrutée au niveau des protéines PARP *via* son interaction avec ALC1, en réponse à des dommages à l'ADN, et est impliquée dans la dissociation d'ALC1 après réparation des dommages. Ainsi, en absence de TIF1 γ , ALC1 reste associée à la chromatine, ce qui sensibilise les cellules aux dommages à l'ADN (Kulkarni et al., 2013). Cette étude ne décrit néanmoins pas de fonction directe de TIF1 γ dans la réparation de l'ADN. Il est tentant de spéculer que TIF1 γ puisse coopérer avec ALC1, afin de décompacter la chromatine, comme cela a été mis en évidence dans l'induction transcriptionnelle des *poised genes* (Xi et al., 2011).

Le rôle de TIF1 γ dans la réparation de l'ADN a été décrit dans une seconde étude mettant en évidence son implication dans l'inhibition des infections adénovirales (Forrester et al., 2011). En effet, de façon générale, les infections adénovirales entraînent la dégradation ou la séquestration des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (complexe MRN,

ADN ligase IV, p53...) (Baker et al., 2007; Carson et al., 2009; Stracker et al., 2002). Suite à une infection adénovirale, l'inhibition de l'expression de TIF1 γ par interférence à l'ARN entraîne l'expression précoce et importante des protéines virales. TIF1 γ protège la cellule infectée contre l'inhibition de son système de réparation de l'ADN, en inhibant la dégradation de la protéine MRE11 (appartenant au complexe de réparation de l'ADN MRN) par les protéines virales (Forrester et al., 2011). TIF1 γ est également dégradée lors des infections adénovirales, par le biais de la protéine E4orf3 qui induit sa dégradation par la voie du protéasome. Néanmoins, l'E3-Ubiquitine ligase impliquée dans la dégradation de TIF1 γ reste à ce jour inconnue.

ii. Contrôle de la prolifération

TIF1 γ exerce également un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire. Une analyse transcriptomique à grande échelle effectuée sur des cellules hépatiques murines délétées pour TIF1 γ , grâce au système de recombinaison homologue Cre-Lox, révèle une proportion statistiquement significative (8/77) de gènes impliqués dans le cycle cellulaire parmi les gènes dont l'expression est inhibée en absence de TIF1 γ (Herquel et al., 2013).

En effet, TIF1 γ intervient dans la **progression du cycle cellulaire en mitose** de façon indépendante à son implication dans la voie du TGF β : Sedgwick *et al.* ont mis en évidence, en 2012, le rôle de TIF1 γ dans la transition métaphase-anaphase (Sedgwick et al., 2012). Ces travaux décrivent que **TIF1 γ interagit avec le complexe protéique APC/C-cdc20**, en prophase et en métaphase, et est **indispensable à son activité E3-Ubiquitine ligase** : en absence de TIF1 γ , le complexe APC/C-cdc20 est beaucoup moins actif, ce qui limite la poly-ubiquitination et la dégradation de ses substrats tels que la **Cycline A et la Cycline B**. La dégradation de la Cycline A est nécessaire à l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique (voir paragraphe I-0-2-iii concernant les substrats d'APC/C-cdc20). Ainsi, la perte de TIF1 γ , en limitant l'activité d'APC/C-cdc20 et donc la dégradation de la Cycline A, entraîne un blocage prolongé du cycle cellulaire associé à un mauvais alignement des chromosomes (Sedgwick et al., 2012). De plus, cet arrêt en mitose est associé à une activation du SAC (augmentation de l'expression des protéines BUB1 et BUBR1) et l'inhibition de BUBR1 par interférence à l'ARN restaure la progression mitotique et l'activité d'APC/C-cdc20. Ces observations indiquent que le blocage du cycle cellulaire médié par la perte de TIF1 γ **est dépendant du SAC**, et n'est

pas uniquement due à l'inhibition de l'activité d'APC/C-cdc20 : une fois le SAC inhibé, TIF1 γ n'est plus nécessaire à l'activité d'APC/C-cdc20.

Le rôle de TIF1 γ dans la progression mitotique a été validé dans une étude récente dans laquelle l'inhibition de l'expression TIF1 γ par interférence à l'ARN, dans des lignées cellulaires pancréatiques, induit un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M, ainsi qu'une augmentation de l'expression de la Cycline B (Ligr et al., 2014).

TIF1 γ semble donc être nécessaire à la progression mitotique en inhibant le SAC. Néanmoins, le blocage du cycle cellulaire médié par la perte de TIF1 γ n'explique pas le rôle suppresseur de tumeur de TIF1 γ mis en évidence dans différentes néoplasies (voir paragraphe suivant).

C. Implication de TIF1 γ dans le développement tumoral

Le rôle suppresseur de tumeur de TIF1 γ a été mis en évidence pour la première fois par notre équipe, en 2009, dans un modèle murin prédisposant à la transformation tumorale pancréatique : le modèle [*Pdx1-Cre ; Kras^{G12D/+}*] (Vincent et al., 2009a). En effet, la délétion de TIF1 γ , spécifiquement dans le pancréas, couplée à l'expression de l'oncogène *Kras* constitutivement activé (*Kras^{G12D}*) entraîne la formation précoce (avant l'âge de 200 jours) de lésions précancéreuses kystiques (IPMN, *Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms*). De plus, l'analyse de tumeurs pancréatiques humaines a permis de mettre en évidence la diminution du taux d'ARNm et de protéine TIF1 γ dans les lésions précancéreuses, ainsi que dans les tumeurs établies. Ainsi, notre équipe a pu mettre en évidence TIF1 γ comme un nouveau gène suppresseur de tumeur impliqué dans la tumorigenèse pancréatique.

Les fonctions oncosuppressives de TIF1 γ ont par la suite été validées dans d'autres organes, grâce à l'utilisation de modèles murins. En effet, la délétion seule de TIF1 γ ou combinée avec l'inactivation de TIF1 α , sans activation oncogénique, mène à la formation de cancers hépatiques chez la souris (Herquel et al., 2011a). De façon intéressante, la délétion combinée de TIF1 γ et TIF1 α potentialise le développement tumoral, suggérant que les fonctions oncosuppressives de ces deux suppresseurs de tumeurs sont, au moins en partie, indépendantes. Enfin, la perte de TIF1 γ *in vivo* dans les cellules souches hématopoïétiques murines entraîne le développement de pathologies myéloprolifératives associées à une surreprésentation des monocytes (voir paragraphe II-B-1-iii sur le rôle de TIF1 γ dans la différenciation hématopoïétique) (Aucagne et al., 2011a, 2011b).

Malgré le rôle de TIF1 γ dans la tumorigenèse mis en évidence dans différents modèles murins, aucune mutation du gène codant TIF1 γ n'a, à ce jour, été mise en évidence. Néanmoins, de nombreuses altérations génétiques (perte d'hétérozygotie par délétion, translocation, fusion...) au niveau du locus de *TIF1 γ* (1p13.1) ont été décrites dans de multiples tumeurs humaines de diverses origines tissulaires (Figure 32).

sein	(Bieche et al., 1999; Bièche et al., 1994a, 1994b; Hoggard et al., 1995; Mitchell and Santibanez-Koref, 1990; Nagai et al., 1995)
poumon	(Drilon et al., 2013; Gasparian et al., 1998; Guo, 1990; Johansson et al., 1994; Lukeis et al., 1993; Testa and Siegfried, 1992)
cerveau	(Bello et al., 2000a, 2000b; Lopez-Gines et al., 2004; Reifenberger et al., 1994)
peau	(Casalone et al., 2001; Cowan et al., 1988; Hermsen et al., 1996; Jin et al., 1998b; Li et al., 2014)
compartiment hématopoïétique	(Caramazza et al., 2010; Kimm et al., 2007; Li et al., 2011; Ng et al., 1999)
tractus digestif	(Parada et al., 1999; Rao et al., 1995; Wu, 1990)
système neuroendocrinien	(Klugbauer and Rabes, 1999; Sandgren et al., 2010)
rein	(Natrajan et al., 2006, 2007)
os	(Sawyer et al., 2002)
cellules germinales	(Mathew et al., 1994)

Figure 32 : Remaniements génétiques du locus 1p13.1 contenant le gène codant TIF1 γ dans différentes néoplasies humaines.

De plus, notre équipe a démontré que **le taux d'ARN messager codant TIF1 γ est significativement réduit dans les tumeurs pancréatiques humaines**, en comparaison des tissus péri-tumoraux. De la même façon, au niveau protéique, la localisation nucléaire de TIF1 γ observée dans les tissus sains, est fortement diminuée au niveau des lésions pré-tumorales pancréatiques, ainsi que dans les tissus néoplasiques (Vincent et al., 2009a).

Cette perte d'expression de TIF1 γ , aussi bien au niveau transcriptionnel que protéique, a également été mise en évidence dans les **monocytes de 35 % des patients atteints de leucémies myélomonocytaires chroniques**, cette proportion atteignant même 50 % des patients les plus gravement atteints (Aucagne et al., 2011a, 2011b). Aucune mutation somatique du gène codant TIF1 γ n'a été mise en évidence dans les leucémies, la perte d'expression étant due à une **hyperméthylation des îlots CpG** au niveau des régions promotrices. En effet, après 3 jours de traitement avec un agent déméthylant l'ADN, la Decitabine (ou 5-aza-2'-désoxycytidine), l'expression de TIF1 γ est restaurée dans les monocytes de patients cultivés *in vitro*, ainsi qu'*in vivo* après 5 cycles de traitement. Il est intéressant de noter que la Decitabine a été mise en évidence comme traitement potentiel des leucémies myélomonocytaires chroniques, de façon indépendante aux études concernant TIF1 γ (Kantarjian et al., 2007).

La perte d'expression de TIF1 γ dans les tissus tumoraux a également été décrite dans les **cancers du poumon non à petites cellules** et les **carcinomes hépatocellulaires**, ainsi

que dans les lignées cellulaires issues de ces néoplasies (Ding et al., 2014; Wang et al., 2013a).

Dans les cancers hépatiques, la perte d'expression de TIF1 γ est associée à un stade tumoral avancé, ainsi qu'à un phénotype dédifférencié (Ding et al., 2014). Cette étude suggère que la perte d'expression de TIF1 γ serait un événement tardif de la transformation tumorale et favoriserait les capacités de dédifférenciation cellulaire et de migration étant à la base de la survenue de métastases. Soutenant cette hypothèse, la perte d'expression de TIF1 γ est corrélée à un mauvais pronostic chez les patients, ainsi qu'à un risque de rechute plus élevé après résection chirurgicale des tissus tumoraux. Cette étude rapporte également que cette perte d'expression est associée à une hyperméthylation du promoteur pouvant être inhibée, *in vitro*, par un traitement à la Decitabine permettant la réexpression de TIF1 γ (Ding et al., 2014). Cette étude met également en évidence un rôle pro-oncogénique de TIF1 γ : l'inhibition de son expression, dans les lignées humaines de carcinomes hépatocellulaires de stades précoces, inhibe leur croissance cellulaire et leur capacité à former des tumeurs après xénogreffes sous-cutanées chez la souris *Nude*. TIF1 γ agirait donc comme un **oncogène en début de tumorigenèse**, puis comme un **suppresseur de tumeur dans les stades plus avancés**.

Cette dualité est issue du rôle de TIF1 γ sur la régulation de la voie de signalisation du TGF β . Cette cytokine est particulièrement étudiée en carcinogénèse car, grâce à ses fonctions anti-prolifératives, le TGF β agit comme suppresseur de tumeur dans les stades précoces de transformation tumorale, tandis que son rôle dans l'EMT et la migration lui procure des capacités pro-oncogéniques dans les phases tardives (Heldin et al., 2012; Massagué, 2008; Principe et al., 2014; Tian et al., 2011). TIF1 γ , en inhibant la voie du TGF β *via* l'ubiquitination de SMAD4, agit ainsi comme un oncogène en inhibant les effets cytostatiques du TGF β dans les phases précoces, puis acquiert des fonctions anti-tumorales, dans les phases tardives, notamment *via* l'inhibition de l'EMT induite par le TGF β (**Figure 33**) (Ding et al., 2014). Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle la perte d'expression de TIF1 γ serait un événement tardif du processus de transformation tumorale, ce qui permet d'inhiber uniquement ses fonctions oncosuppressives et non ses fonctions pro-tumorales.

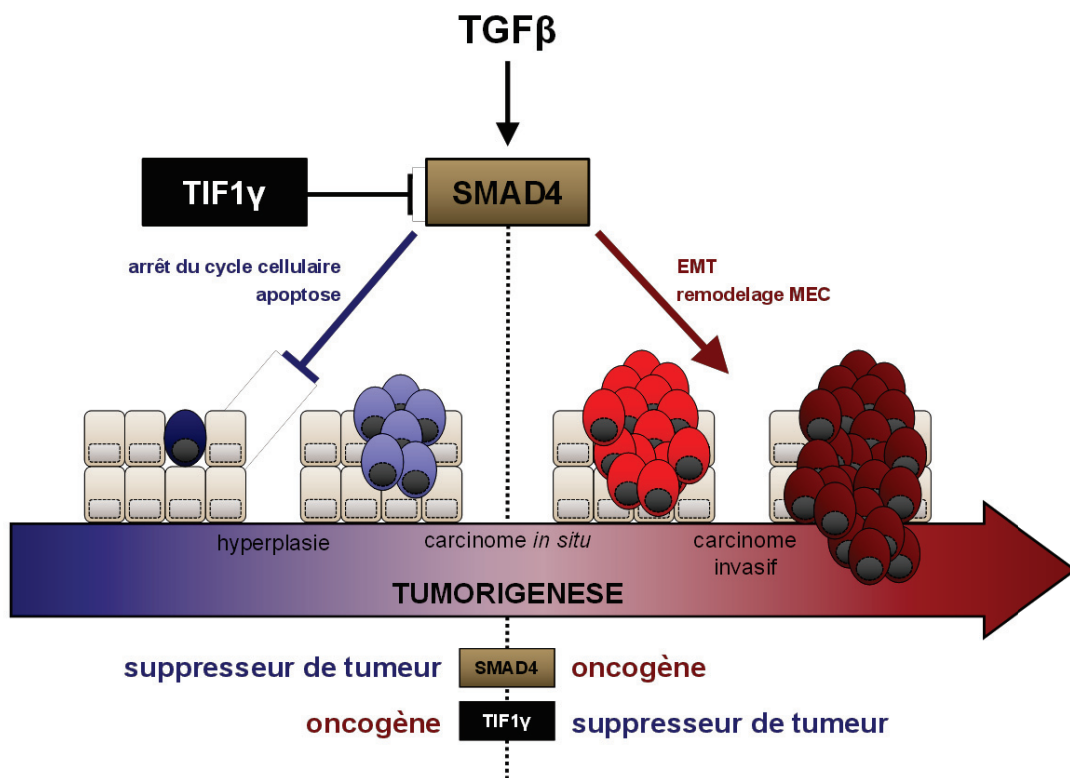


Figure 33 : Dualité fonctionnelle du TGFβ et de TIF1γ au cours de la progression tumorale.

Une autre étude lie les fonctions oncosuppressives de TIF1γ à son rôle inhibiteur de la voie de signalisation du TGFβ (Xue et al., 2014). **Dans les cancers du sein**, la voie du TGFβ est fréquemment suractivée *via* l'expression aberrante de SMAD4 et l'augmentation de la phosphorylation de SMAD3, ce qui est classiquement associé au phénomène métastatique (Araki et al., 2010; Koumoundourou et al., 2007; Tram et al., 2011; Vincent et al., 2009b; Xie et al., 2002). Cette étude décrit que l'expression de TIF1γ est diminuée dans les tumeurs du sein, ainsi que dans les tissus métastatiques (Xue et al., 2014). La perte de TIF1γ dans ces tumeurs est en accord avec la suractivation de la voie du TGFβ permettant l'accroissement du potentiel invasif des cellules *via* l'induction de l'EMT.

OBJECTIF GENERAL

DES TRAVAUX DE THESE

TIF1 γ est un acteur majeur de la tumorigenèse, dont l'expression est dérégulée dans de nombreuses tumeurs humaines. Il exerce majoritairement des **fonctions anti-tumorales**, mais semble également posséder un rôle pro-tumoral dans certains contextes cellulaires. De nombreuses fonctions moléculaires et biologiques lui ont été attribuées, mais peu d'entre elles ont été reliées à son implication dans les processus de tumorigenèse. Parmi celles-ci, son rôle dans la régulation de la voie de signalisation du TGF β semble être une fonction clé modulant son activité pro- ou anti-tumorale. Cependant, aucune étude n'a directement mis en évidence l'implication de la voie du TGF β dans les fonctions oncogéniques de TIF1 γ *in vivo*.

L'objectif de ma thèse était donc d'**identifier les fonctions moléculaires et cellulaires responsables du rôle de TIF1 γ dans la transformation et la progression tumorale**, grâce à l'utilisation de **modèles de souris génétiquement modifiées**, de diverses **approches expérimentales *in vitro***, ainsi que d'une **analyse transcriptomique à grande échelle** nous permettant d'identifier de nouvelles fonctions potentiellement impliquées dans le rôle oncogénique de TIF1 γ .

RESULTATS - DISCUSSION

Les travaux effectués durant ma thèse ont permis de mieux comprendre les fonctions anti-tumorales de TIF1 γ grâce à différentes expériences *in vitro* et *in vivo* :

- 1) A mon arrivée dans l'équipe, j'ai participé à la finalisation des travaux visant à définir l'implication de **la voie du TGF β** , *via* l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse, dans les fonctions anti-tumorales de TIF1 γ (**partie I**) (Vincent et al., 2012).
- 2) J'ai ensuite cherché à identifier de nouvelles fonctions biologiques altérées en absence de TIF1 γ , en réalisant une **analyse transcriptomique** à grande échelle. Ce criblage m'a permis de mettre en évidence un rôle de TIF1 γ dans la régulation de la mitose (analyse transcriptomique non publiée) (**partie II**).
- 3) Grâce aux informations obtenues dans le précédent criblage et à la littérature récente sur le sujet, je me suis intéressée au rôle de TIF1 γ dans le **point de contrôle du fuseau mitotique** au cours de la tumorigenèse. Ce troisième point constitue le travail principal de ma thèse (**partie III**) (Pommier et al., soumis).

J'ai également participé à la publication de cinq autres articles dans des journaux à comité de lecture (Alcaraz et al., 2014; Gout et al., 2013a, 2013b; Ripoche et al., 2012), dont un article en premier auteur (Pommier et al., 2012), et d'un chapitre d'ouvrage spécialisé (Valcourt et al., 2014). Ces travaux, ne traitant pas des fonctions oncosuppressives de TIF1 γ , ne seront pas détaillés dans ce manuscrit, mais sont disponibles dans la partie « **Autres publications** ».

I. Rôle suppresseur de tumeur de TIF1 γ dans la
tumorigenèse pancréatique
et implication de la voie du TGF β

A. Introduction

Notre équipe s'intéresse aux mécanismes moléculaires responsables de la transformation et de la progression tumorale de l'**adénocarcinome pancréatique** (ADKP) qui constitue plus de 90 % des tumeurs pancréatiques et représente actuellement la 5^{ème} cause de mortalité par cancer (plus de 10 000 décès/an en France). Une étude américaine (http://www.pancan.org/section_research/reports/pdf/incidence_report_2012.pdf) prédit que cette tumeur représentera la 2^{nde} cause de mortalité par cancer dès 2020, si aucun progrès substantiel n'est fait pour soigner cette pathologie. Le taux de survie à 5 ans est inférieur à 3 %, en raison du diagnostic généralement tardif et de l'inefficacité des traitements actuels. Dans ce contexte, notre équipe s'intéresse plus particulièrement à l'implication de **la voie du TGFβ** dans la transformation tumorale pancréatique. En effet, il a été mis en évidence que 100 % des tumeurs pancréatiques humaines présentaient des altérations génétiques d'au moins un acteur de cette voie de signalisation, le locus codant la protéine SMAD4 étant inactivé dans 50 % des cas (Jones et al., 2008; Ryan et al., 2014).

Nous avons alors étudié l'implication du facteur nucléaire **TIF1γ** dans la tumorigenèse pancréatique, ses fonctions décrites étant majoritairement reliées à la voie de signalisation du TGFβ (voir paragraphe II-B concernant les fonctions de TIF1γ). Nous avons ainsi démontré, pour la première fois en 2009, le rôle suppresseur de tumeur de TIF1γ, *via* **(1)** l'analyse de tumeurs pancréatiques humaines, ainsi que *via* **(2)** l'utilisation de souris génétiquement modifiées présentant une inactivation de TIF1γ, couplée à l'expression de l'oncogène Kras^{G12D} spécifiquement dans le pancréas (altération génétique mimant la pathologie humaine, KRAS étant muté dans plus de 90 % des tumeurs pancréatiques) (voir paragraphe II-C concernant l'implication de TIF1γ dans le développement tumoral) (Ryan et al., 2014; Vincent et al., 2009a).

A la suite de cette étude, deux questions restaient sans réponse :

- 1) Les lésions précancéreuses, observées dans notre modèle de souris délétées pour TIF1γ, pouvaient-elles évoluer en tumeurs pancréatiques, comme cela a été décrit dans la pathologie humaine (Matthaei et al., 2011) ?
- 2) Quel était l'implication de la voie de signalisation du TGFβ dans les fonctions oncosuppresseuses de TIF1γ ?

B. Résultats publiés

Afin d'adresser ces questions, nous avons suivi par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) la progression des lésions précancéreuses pancréatiques des souris délétées pour TIF1 γ et exprimant l'oncogène Kras^{G12D} spécifiquement dans le pancréas. Cette expression conditionnelle intervient grâce à l'expression de l'enzyme Cre recombinase sous le contrôle du promoteur du gène *Pdx1* (*Pancreatic and duodenal homeobox 1*), marqueur de différenciation pancréatique exprimé au cours du développement embryonnaire (E8,5) dans toutes les cellules progénitrices du tissu pancréatique (Jonsson et al., 1994). Nous avons ainsi pu mettre en évidence le développement de tumeurs pancréatiques chez ces animaux, après l'âge de 250 jours.

Les tumeurs développées chez les individus présentant une inactivation de TIF1 γ se caractérisent par un phénotype sarcomatoïde associé à la délocalisation de la Cadhérine-E au niveau cytoplasmique, protéine membranaire impliquée dans l'adhésion cellulaire, et à l'expression ectopique du marqueur mésenchymateux Vimentine dans les cellules pancréatiques. Ce phénotype suggère un rôle de TIF1 γ dans l'EMT médiée par le TGF β , processus de dédifférenciation classiquement associé à l'agressivité des cellules tumorales, exerçant un rôle particulièrement important dans la tumorigenèse pancréatique (Rhim et al., 2012; Yilmaz and Christofori, 2009). Nous avons alors généré des animaux présentant une double inactivation de TIF1 γ et SMAD4, afin de déterminer l'implication de l'axe TGF β -SMAD4 dans les fonctions oncosuppressives de TIF1 γ . La délétion combinée de ces deux gènes dans un contexte oncogénique médié par KRAS^{G12D} entraîne l'apparition de tumeurs dès l'âge de 46 jours, indiquant une coopération entre les deux suppresseurs de tumeur dans la carcinogenèse pancréatique. En effet, la délétion seule de TIF1 γ ou SMAD4 entraîne le développement d'ADKP respectivement à l'âge de 250 et 100 jours (Bardeesy et al., 2006). Les tumeurs issues de cette double inactivation, bien qu'apparaissant beaucoup plus rapidement, se caractérisent par un phénotype épithélial différencié : la Cadhérine-E est localisée au niveau membranaire et la Vimentine n'est pas exprimée.

C. Résultats complémentaires non publiés

Plusieurs expériences *in vitro* ont permis de valider et de mieux comprendre les résultats obtenus dans les modèles murins transgéniques décrits dans la précédente étude. Parallèlement à nos travaux, la publication de ces mêmes données *in vitro* par un autre groupe de recherche (Hesling et al., 2011) a compromis la publication de ces résultats en tant que tels, nos travaux *in vitro* pourront néanmoins être inclus dans un prochain article puisque les modèles cellulaires utilisés sont différents.

Comme précédemment décrit *in vivo*, les tumeurs délétées pour TIF1 γ présentent un phénotype sarcomatoïde associé à la délocalisation cytoplasmique de la Cadhérine-E et l'expression ectopique de la Vimentine. De plus, l'inactivation de SMAD4 restaure un phénotype différencié en permettant la localisation membranaire de la Cadhérine-E, ainsi que l'absence d'expression de la Vimentine. Ce phénotype suggère un rôle de TIF1 γ

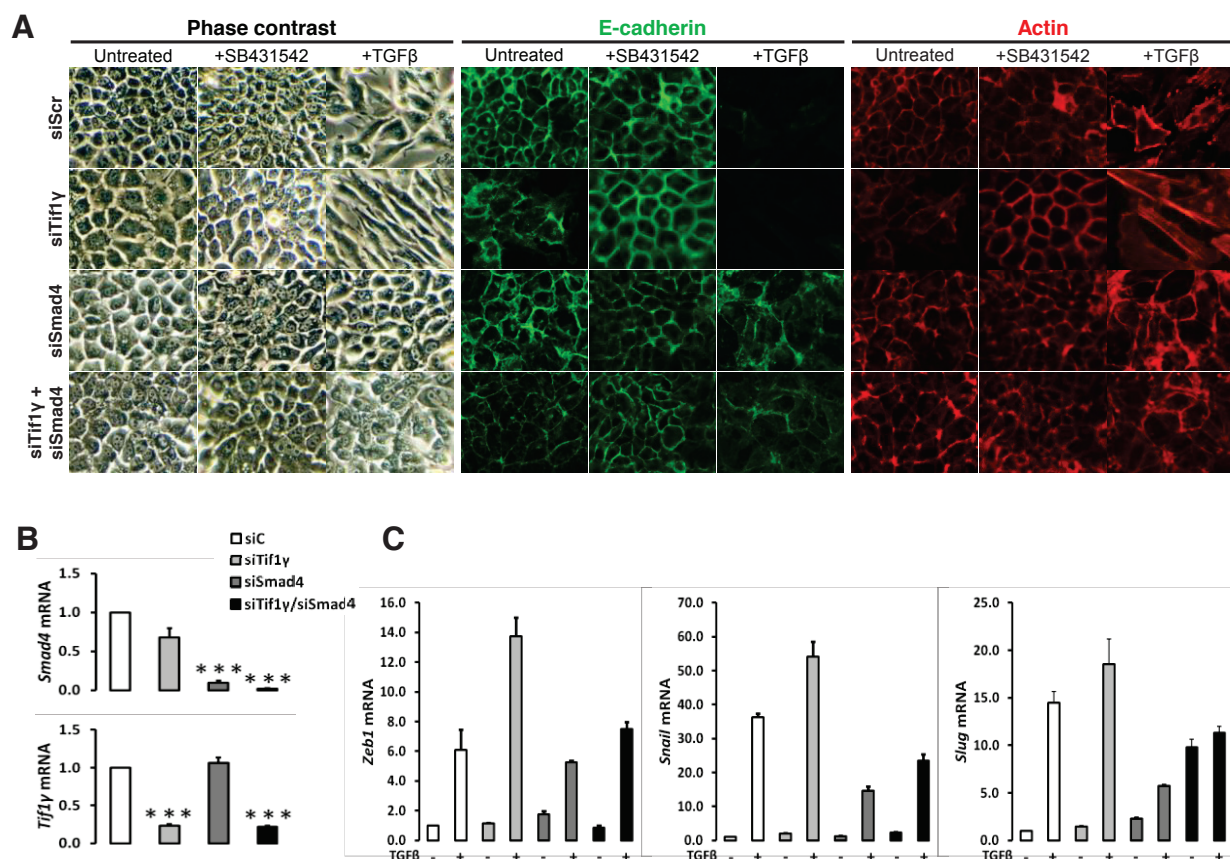


Figure 34 : TIF1 γ inhibe l'EMT médiée par l'axe TGF β -SMAD4.

Cellules NMuMG transfectées de façon transitoire (siRNA) pour *Tif1 γ* et/ou *Smad4* et traitées ou non par du TGF β (5 ng/mL) ou l'inhibiteur SB431542 (10 mM) pendant 36 heures. **A**) Observation en contraste de phase et marquages fluorescents de la CADHERINE-E (vert) et de l'ACTINE (rouge). **B**) Analyses RT-qPCR de l'expression de *Tif1 γ* et *SMAD4*. **C**) Analyses RT-qPCR de l'expression des gènes inducteurs d'EMT : *Zeb1*, *Snail* et *Slug*.

dans l'EMT médiée par le TGF β . Afin de valider cette hypothèse, nous avons effectué des expériences *in vitro* en utilisant la lignée cellulaire NMuMG (*Normal Murine Mammary Gland*). Cette lignée immortalisée mais non transformée est issue de glandes mammaires de souris Namru et est particulièrement sensible à l'EMT induite par le TGF β (**Figure 34**) (Van den Broecke et al., 1996; Owens, 1974; Owens et al., 1974; Termén et al., 2013; Valcourt et al., 2005).

Comme décrit dans de nombreuses études, le TGF β induit une EMT dans cette lignée cellulaire, attestée par la présence de fibres de stress cytoplasmiques issues des microfilaments d'actine et par la délocalisation, voire la perte d'expression, du marqueur épithélial Cadhérine-E (**Figure 34A**). Comme attendu, la délétion de SMAD4 par interférence à l'ARN entraîne une EMT beaucoup moins accentuée après traitement par le TGF β (présence de Cadhérine-E membranaire et d'un réseau d'actine corticale) (**Figure 34A-B**). L'inactivation de TIF1 γ entraîne, quant à elle, un phénotype moins épithélial même en absence de traitement (délocalisation de la Cadhérine-E), accentué en présence de TGF β et aboli par l'inhibiteur du récepteur T β RI SB431542 (**Figure 34A-B**). Enfin, les cellules délétées pour SMAD4 et TIF1 γ présentent un phénotype épithélial similaire à celui observé lors de la délétion de SMAD4 seule (**Figure 34A-B**). Ces résultats d'immunofluorescence sont confortés par l'expression des marqueurs embryonnaires *Zeb1*, *Snail* et *Slug*, dont la transcription est décrite pour être induite lors de la transition épithélio-mésenchymateuse (**Figure 34C**) (Hanahan and Weinberg, 2011). Ainsi, TIF1 γ inhibe l'EMT induite par le TGF β et dépendante de SMAD4. Ces résultats valident le phénotype observé *in vivo* et sont en accord avec l'étude d'Hesling *et al.*, démontrant *in vitro* le rôle antagoniste de TIF1 γ et SMAD4 dans l'EMT médiée par le TGF β , dans les cellules mammaires humaines (Hesling et al., 2011).

Nous avons ensuite généré des lignées stablement inactivées pour TIF1 γ , grâce à l'utilisation d'un vecteur permettant l'expression d'un shARN dirigé contre TIF1 γ . Dans un premier temps, nous avons validé que la délétion stable de TIF1 γ permettait aux cellules d'acquérir un phénotype moins épithélial, comme attesté par la faible expression et la localisation cytoplasmique de la Cadhérine-E dans les cellules non traitées (**Figure 35**). De plus, après traitement par le TGF β , les cellules TIF1 γ -KnockDown (TIF1 γ ^{KD}) présentent des fibres de stress plus marquées que les cellules contrôles, illustrant une plus forte sensibilité à l'EMT médiée par le TGF β (**Figure 35**).

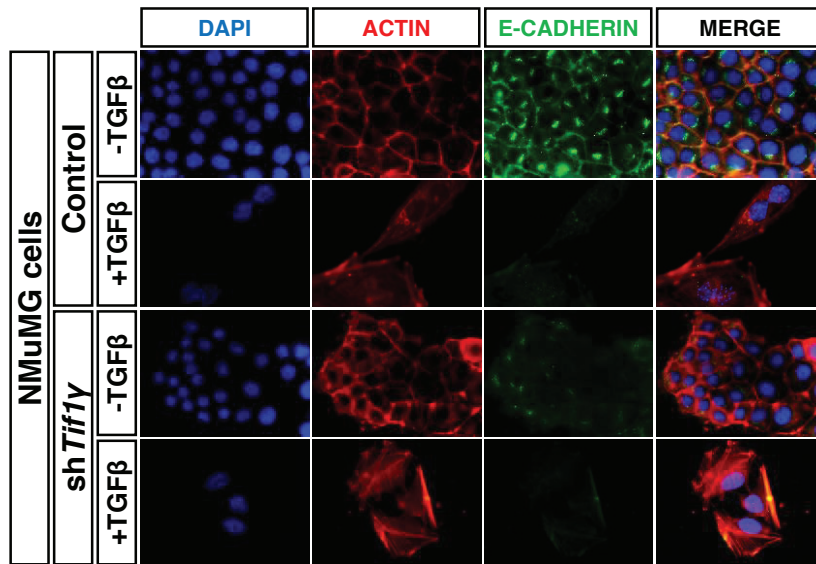


Figure 35 : L'inactivation stable de TIF1γ dans les cellules NMuMG entraîne une sensibilité accrue à l'EMT induite par le TGFβ.

Marquages fluorescents de la CADHERINE-E (vert) et de l'ACTINE (rouge) de cellules NMuMG inactivées ou non pour *Tif1γ* de façon stable (shARN) et traitées ou non au TGFβ (5 ng/mL) pendant 72 heures. Les noyaux sont contre-colorés au DAPI.

La transition épithélio-mésenchymateuse permet aux cellules d'acquérir des capacités invasives et migratoires, facilitant ainsi la dissémination métastatique (Kang and Massagué, 2004). En accord avec le rôle négatif de TIF1γ dans l'induction de l'EMT, nous avons pu mettre en évidence, grâce à des expériences de migration en chambres de Boyden, que l'inactivation stable de TIF1γ par interférence à l'ARN entraînait une forte augmentation des capacités migratoires des cellules NMuMG (Figure 36).

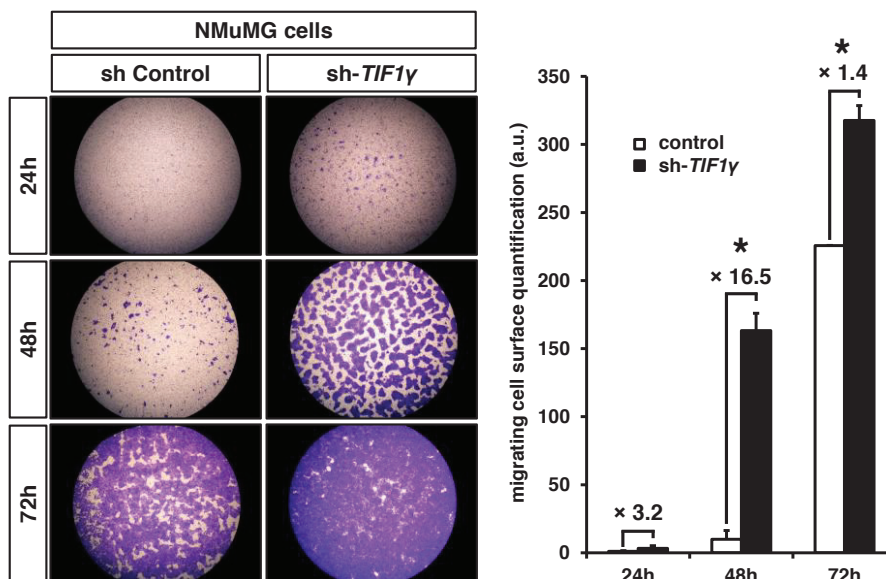


Figure 36 : L'inactivation stable de TIF1γ entraîne une augmentation des propriétés migratoires des cellules NMuMG.

Observation de chambres de Boyden ensemencées avec des cellules NMuMG inactivées ou non pour *Tif1γ* de façon stable (shARN) et incubées pendant 24, 48 ou 72 heures à 37°C.

Enfin, afin de tester les capacités clonogéniques des cellules NMuMG inactivées pour TIF1 γ , nous les avons transformées en les transduisant avec un vecteur permettant l'expression de l'oncogène HRAS^{V12}. De plus, afin de déterminer l'implication de l'EMT induite par SMAD4 sur les capacités clonogéniques de TIF1 γ , nous avons également inactivé SMAD4, de façon stable grâce à une stratégie d'interférence à l'ARN. Puis, ces cellules ont été cultivées en agar mou, afin de tester leur capacité à croître en absence d'ancrage. Les cellules NMuMG non transformées par l'oncogène HRAS^{V12} ne possèdent pas la capacité de croître en agar mou (données non montrées), tandis que les cellules exprimant cet oncogène forment de nombreuses colonies (> 250 par puits) après 26 jours de culture (**Figure 37**).

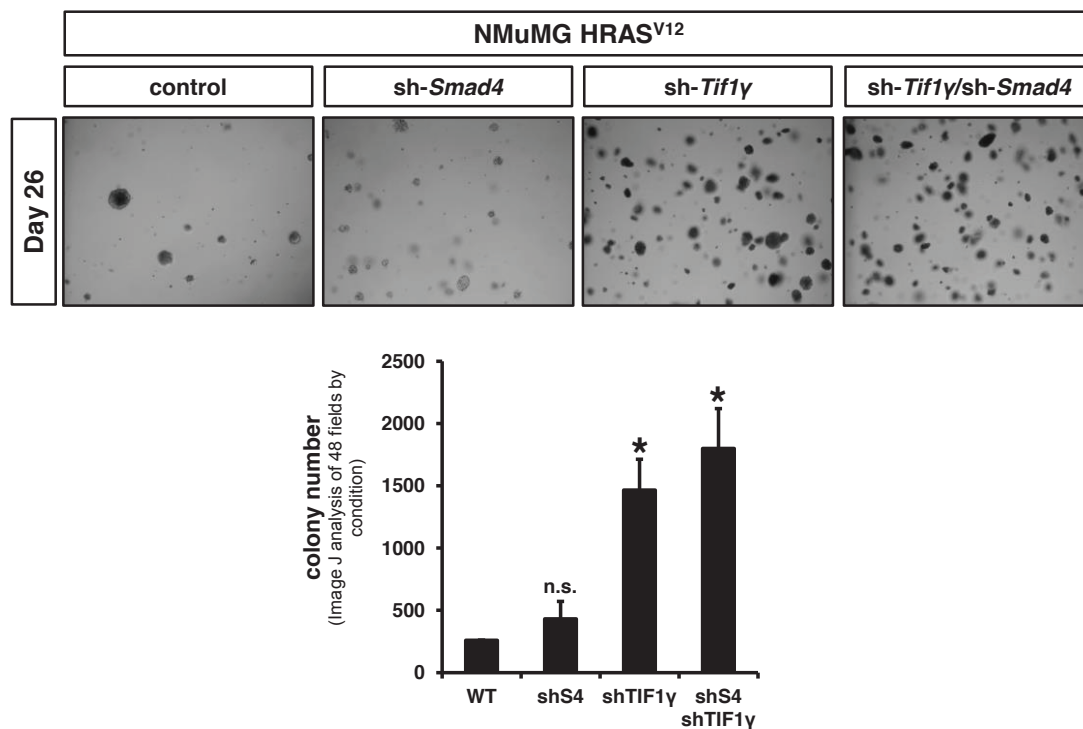


Figure 37 : TIF1 γ et SMAD4 exercent des effets suppresseurs de tumeurs indépendants dans les NMuMG transformées par Hras^{V12}.

Les cellules NMuMG transformées par Hras^{V12} et inactivées ou non pour *Tif1 γ* et/ou *Smad4* de façon stable (shARN) ont été cultivées en agar mou pendant 26 jours à 37°C. Les quantifications ont été réalisées grâce au logiciel ImageJ.

De façon surprenante, les cellules transformées et délétées uniquement pour SMAD4 présentent les mêmes capacités clonogéniques que les cellules contrôles, indiquant que l'inactivation de SMAD4, dans ce type cellulaire, n'est pas suffisante pour permettre à ces cellules de croître efficacement en absence d'ancrage. En revanche, la délétion de TIF1 γ

entraîne une augmentation de cinq fois du nombre de colonies émergeant après 26 jours de culture, en comparaison avec la condition contrôle, témoignant de l'importance de TIF1 γ dans les processus de transformation. Enfin, en accord avec les résultats obtenus dans nos modèles murins double KnockOut, la délétion combinée de TIF1 γ et SMAD4 n'entraîne non pas une diminution mais, au contraire, la formation de six fois plus de colonies que dans la condition contrôle, démontrant que les effets suppresseurs de tumeur de TIF1 γ sont, au moins en partie, indépendants de SMAD4 (**Figure 37**).

D. Discussion

TIF1 γ est un acteur majeur de la transformation tumorale, dont l'expression est dérégulée dans un grand nombre de pathologies cancéreuses de diverses origines tissulaires (Aucagne et al., 2011a; Ding et al., 2014; Jain et al., 2011; Kantarjian et al., 2007; Kasuya et al., 2013; Vincent et al., 2009a; Wang et al., 2013a). Néanmoins, les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les fonctions anti-tumorales de TIF1 γ restent peu décrits.

Cette étude a permis de mettre en évidence le développement de tumeurs pancréatiques chez les individus [*Pdx1-Cre ; Kras^{G12D/+} ; Tif1 γ ^{Lox/Lox}*] à l'âge de 250 jours attestant *in vivo* du rôle suppresseur de tumeur de TIF1 γ dans la tumorigenèse pancréatique.

De plus, nous avons démontré que l'inactivation homozygote de TIF1 γ entraînait le développement de tumeurs pancréatiques présentant des caractéristiques de dédifférenciation cellulaire. Ce phénotype sarcomatoïde, ainsi que l'implication de TIF1 γ dans la voie de signalisation du TGF β , suggère qu'il puisse agir comme un inhibiteur de la transition épithélio-mésenchymateuse induite par l'axe TGF β -SMAD4. La génération de souris double mutantes pour TIF1 γ et SMAD4 renforce cette hypothèse : ces dernières développent des tumeurs pancréatiques aux caractéristiques différenciées semblables à celles présentées par les individus [*Pdx1-Cre ; Kras^{G12D/+} ; Smad4^{Lox/Lox}*], indiquant une réversion du phénotype induit par la perte de TIF1 γ seule (Bardeesy et al., 2006). De plus, différentes expériences *in vitro* (données non publiées) démontrent le rôle antagoniste de TIF1 γ et SMAD4 dans l'agressivité et les capacités migratoires des cellules tumorales *via* la modulation de l'EMT. Ces données ont été confirmées par d'autres groupes dans des modèles de cellules mammaires humaines et murines dans lesquels TIF1 γ inhibe l'EMT induite par le TGF β *via* (1) sa SUMOylation « activatrice » par la protéine UBC9 ainsi que *via* (2) sa propre activité de SUMO-ligase activant le facteur transcriptionnel SnoN, un inhibiteur de l'EMT médiée par le TGF β (Fattet et al., 2013; Hesling et al., 2011; Ikeuchi et al., 2014). De plus, d'autres études *in vivo* ont, depuis, décrit l'implication de la voie du TGF β dans les fonctions oncosuppressives de TIF1 γ au niveau des tumeurs du foie et du sein (Ding et al., 2014; Xue et al., 2014).

Les fonctions oncosuppressives de TIF1 γ semblent ainsi être, en partie, dépendante de la protéine SMAD4 : la perte de TIF1 γ potentialise l'acquisition de propriétés invasives *via* son rôle dans la voie du TGF β .

Néanmoins, la survenue précoce (dès 46 jours) de tumeurs pancréatiques chez les animaux présentant une double inactivation de TIF1 γ et SMAD4 illustre la coopération de ces deux suppresseurs de tumeur dans l'initiation tumorale et suggère que les fonctions oncosuppressives de TIF1 γ , notamment dans les phases précoces de la tumorigenèse, sont indépendantes de l'axe TGF β -SMAD4. Cette hypothèse est confortée par les expériences de croissance en agar mou, dans lesquelles l'inactivation combinée de TIF1 γ et SMAD4 augmente fortement les capacités clonogéniques des cellules NMuMG, entraînant la formation de plus de colonies que l'inactivation seule de TIF1 γ ou SMAD4.

Ces résultats mettent ainsi en évidence une coopération entre ces deux suppresseurs de tumeur inhibant l'initiation tumorale en partie *via* des **mécanismes oncosuppresseurs indépendants**. Il est donc essentiel d'identifier de **nouvelles fonctions** cellulaires et moléculaires impliquées dans les effets suppresseurs de tumeur de TIF1 γ , afin de mieux comprendre son rôle en cancérogenèse.

E. Publication originale

Tify Suppresses Murine Pancreatic Tumoral Transformation by a Smad4-Independent Pathway.

David F. Vincent*, Johann Gout*, Nicolas Chuvin, Vanessa Arfi, Roxane M. Pommier, Philippe Bertolino, Nicolas Jonckheere, Doriane Ripoché, Bastien Kaniewski, Sylvie Martel, Jean-Baptiste Langlois, Sophie Goddard-Léon, Amélie Colombe, Marc Janier, Isabelle Van Seuningen, Régine Losson, Ulrich Valcourt, Isabelle Treilleux, Pierre Dubus, Nabeel Bardeesy, Laurent Bartholin.

Am. J. Pathol. (2012). *180*, 2214–2221.

** co-premiers auteurs*

Short Communication

Tif1 γ Suppresses Murine Pancreatic Tumoral Transformation by a Smad4-Independent Pathway

David F. Vincent,^{*†‡§¶} Johann Gout,^{*†‡§¶}
Nicolas Chuvin,^{*†‡§¶||} Vanessa Arfi,^{*†‡§¶}
Roxane M. Pommier,^{*†‡§¶} Philippe Bertolino,^{*†‡§¶}
Nicolas Jonckheere,^{**} Doriane Ripoche,^{*†‡§¶}
Bastien Kaniewski,^{*†‡§¶} Sylvie Martel,^{*†‡§¶}
Jean-Baptiste Langlois,^{††} Sophie Goddard-Léon,[¶]
Amélie Colombe,[¶] Marc Janier,^{‡§¶‡§§}
Isabelle Van Seuninghen,^{**} Régine Losson,^{¶¶}
Ulrich Valcourt,^{*†‡§¶} Isabelle Treilleux,^{*†‡§¶}
Pierre Dubus,^{|||} Nabeel Bardeesy,^{***} and
Laurent Bartholin^{*†‡§¶}

From INSERM U1052* and CNRS UMR5286,[†] Cancer Research Center of Lyon (CRCL), Lyon, France; the University of Lyon,[‡] Lyon, France; the University of Lyon 1,[§] Lyon, France; the Léon Bérard Center,[¶] Lyon, France; Ecole Normale Supérieure de Lyon,^{||} Lyon, France; INSERM UMR837,^{**} Jean-Pierre Aubert Research Center, Lille, France; CERMEP,^{††} Imagerie du Vivant, Bron, France; the Nuclear Medicine Service,^{‡‡} Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils Lyon, Lyon, France; the Laboratory of Physical Chemistry of Luminescent Materials,^{§§} Villeurbanne, France; Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC),^{¶¶} Strasbourg, Illkirch, France; EA 2406,^{|||} University of Bordeaux, Bordeaux, France; and the Massachusetts General Hospital Cancer Center,^{***} Harvard Medical School, Boston, Massachusetts

Transcriptional intermediary factor 1 γ (TIF1 γ ; alias, TRIM33/RFG7/PTC7/ectodermin) belongs to an evolutionarily conserved family of nuclear factors that have been implicated in stem cell pluripotency, embryonic development, and tumor suppression. TIF1 γ expression is markedly down-regulated in human pancreatic tumors, and Pdx1-driven Tif1 γ inactivation cooperates with the *Kras*^{G12D} oncogene in the mouse pancreas to induce intraductal papillary mucinous neoplasms. In this study, we report that aged *Pdx1-Cre*; *LSL-Kras*^{G12D}; Tif1 γ ^{lox/lox} mice develop pancreatic ductal adenocarcinomas (PDACs), an aggressive and always fatal neoplasm, demonstrating a Tif1 γ tumor-suppressive function in the development of pancreatic carcinogenesis. Deletion of *SMAD4/DPC4* (deleted in pancreatic car-

cinoma locus 4) occurs in approximately 50% of human cases of PDAC. We, therefore, assessed the genetic relationship between Tif1 γ and Smad4 signaling in pancreatic tumors and found that *Pdx1-Cre*; *LSL-Kras*^{G12D}; *Smad4*^{lox/lox}; Tif1 γ ^{lox/lox} (alias, KSSTT) mutant mice exhibit accelerated tumor progression. Consequently, Tif1 γ tumor-suppressor effects during progression from a premalignant to a malignant state in our mouse model of pancreatic cancer are independent of Smad4. These findings establish, for the first time to our knowledge, that Tif1 γ and Smad4 both regulate an intraductal papillary mucinous neoplasm-to-PDAC sequence through distinct tumor-suppressor programs. (Am J Pathol 2012, 180:2214–2221; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.02.006>)

Transcriptional intermediary factor 1 γ (TIF1 γ ; alias, TRIM33/RFG7/PTC7/ectodermin) belongs to an evolutionarily conserved family of nuclear factors that have been implicated in stem cell pluripotency, embryonic development, and tumor suppression.¹ These proteins are characterized by the presence of a RING domain with E3 ubiquitin-ligase activity and multiple chromatin interaction domains, including B-boxes, coiled-coil domains, plant homeo domains, and bromodomains, suggesting functions in both protein degradation and modulation of

Supported by INSERM (Avenir program), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche of France (D.F.V., R.M.P., and D.R.) and the Association pour la Recherche sur le Cancer (D.F.V.), fellowships from the Ligue Nationale Contre le Cancer (J.G., V.A., and N.J.), and a grant from the NIH (R01 CA133557-01 to N.B.).

Accepted for publication February 7, 2012.

D.F.V. and J.G. contributed equally to this work.

The author R.L. is deceased.

This article is dedicated to the memory of our dear colleague, Régine Losson, who discovered the TIF1 family and passed away 2 years ago after a courageous fight against cancer.

Supplemental material for this article can be found at <http://ajp.amjpathol.org> or at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.02.006>.

Address reprint requests to Laurent Bartholin, Ph.D., Centre Léon Bérard, 28 Rue Laennec, Lyon, France. E-mail: laurent.bartholin@lyon.unicancer.fr.

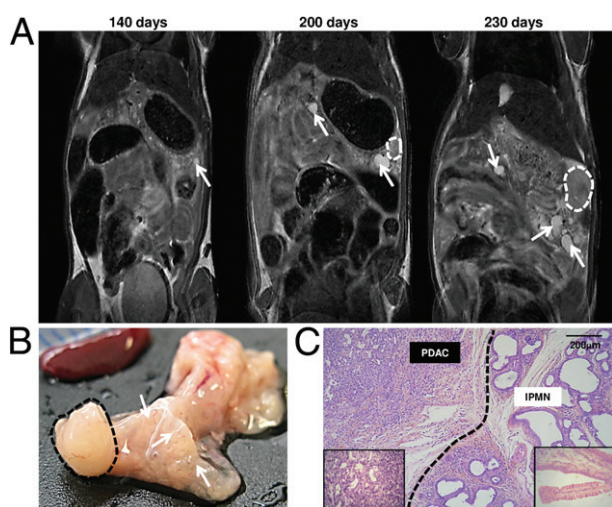


Figure 1. *Tif1 γ* deficiency cooperates with *Kras*^{G12D} to drive an IPMN-PDAC sequence. **A:** Longitudinal magnetic resonance imaging study (from 140 to 230 days) of a KTT mouse. Cystic lesions (hypersignal, **arrow**) and a firm mass (isosignal, **dotted line**) are indicated. **B:** Macroscopic analysis of the KTT pancreas after dissection at 230 days. **Dotted line**, PDAC; **arrows**, IPMN lesions. **C:** Histological section of the KTT pancreas stained with hematoxylin-phloxin-saffron. The **dotted line** separates PDAC from the IPMN environment.

transcription. TIF1 γ interacts with transforming growth factor β (TGF- β) signaling SMAD transcription factors.²⁻⁵ Overall, the potential role of TIF1 γ in the TGF- β -SMAD signaling pathway is of high significance given the importance of this pathway in tumor suppression. TGF- β is a secreted polypeptide belonging to a wide family of cytokines and growth factors, including TGF- β s, bone morphogenetic proteins, and activins. TGF- β signaling involves two serine-threonine kinase receptors, type I and II TGF- β receptors. After binding to its receptors, TGF- β induces the phosphorylation of the type I TGF- β receptor, whose serine-threonine enzymatic activity is activated to allow the phosphorylation of receptor-regulated SMAD2 and SMAD3 (R-SMADs). Phosphorylated R-SMADs then interact with SMAD4. The R-SMADs-SMAD4 complex accumulates within the nucleus, binds to DNA, and activates the transcription of target genes. TGF- β also activates noncanonical pathways that are independent of SMAD proteins.

Pancreatic cancer is a particularly relevant context for exploring the interplay of TIF1 γ and TGF- β -SMAD function because this malignancy is characterized by a high rate of inactivating genetic alterations in the TGF- β -SMAD4 pathway. Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is an aggressive neoplasm; it is always fatal and is the fifth most common cause of death by cancer in the Western world. The median age of patients diagnosed as having PDAC is 65 to 70 years. PDAC, which affects the exocrine pancreas, accounts for >80% of pancreatic cancers. PDAC arises from precursor lesions with ductal differentiated features. The precursors of the disease are divided into three groups: pancreatic intraepithelial neoplasm, intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN), and mucinous cystic neoplasm. Both human patients and mouse models with these types of lesions have an increased risk of developing a PDAC.

We previously developed a genetically engineered mouse model and showed that targeted pancreatic conditional inactivation of *Tif1 γ* cooperated with activated *Kras* to induce IPMNs.⁶ Indeed, *Pdx1-Cre; LSL-Kras*^{G12D}; *Tif1 γ* ^{lox/lox} mice (KTT) develop IPMNs with a short latency and a full penetrance ($n = 12$; age range, 19 to 189 days). However, none of these KTT mice presented obvious signs of malignant transformation reminiscent of PDAC.

In the present study, we explored the susceptibility of KTT aging mice (aged >200 days) to develop PDAC. We also investigated the impact of *Smad4* deletion, which occurs in approximately 50% of human PDACs, in the IPMN-PDAC sequence resulting from combined *Kras* activation and *Tif1 γ* deficiency in the murine pancreas.

Materials and Methods

Mice

Tif1 γ ^{lox/lox},⁷ *LSL-Kras*^{G12D},⁸ *Smad4*^{lox/lox},⁹ and *Pdx1-Cre*¹⁰ alleles, provided by other groups, were previously described. Mice were maintained in a specific pathogen-free animal facility at the AniCan Platform, Centre Léon Bérard (Lyon, France), and handled in compliance with the institutional guidelines. All procedures were approved by an ethics committee under governmental regulatory authority (Comité d'Evaluation Commun au Centre Léon Bérard, à l'Animalerie de transit de l'ENS, au PBES et au laboratoire P4).

Histological Data

Histological experiments were performed as previously described.⁶ The primary antibodies used are: mouse monoclonal antibodies against *Tif1 γ* (1:500; Euromedex, Souffelweyersheim, France), Mucin-5ac (clone 45M1, 1:100; Thermo Scientific, Illkirch, France), chymotrypsin (1:1000; AbD Serotec, Colmar, France), E-cadherin (1:700; BD Biosciences, Le Pont-De-Claix, France), and proliferating cell nuclear antigen (1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); rat monoclonal antibodies against cytokeratin-19 (1:50; Troma-III-s; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Iowa City, IA) and F4/80 (1:100; Acris Antibodies, Herford, Germany); goat polyclonal antibodies against vimentin (1:100; Santa Cruz Biotechnology); and guinea pig polyclonal antibodies against α -smooth muscle actin (α -SMA, 1:100; DakoCytomation, Trappes, France). For immunofluorescence, histological section cells were incubated with rabbit polyclonal anti-Glut2 antibody (1:100; Millipore, Molsheim, France) and, finally, with secondary-labeled antibody (goat anti-rabbit-IgG Alexa Fluor 488 nm, 1:200; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Alcian blue staining was performed in acidic pH conditions.

Magnetic Resonance Imaging

The magnetic resonance imaging experiments were performed as previously described.⁶

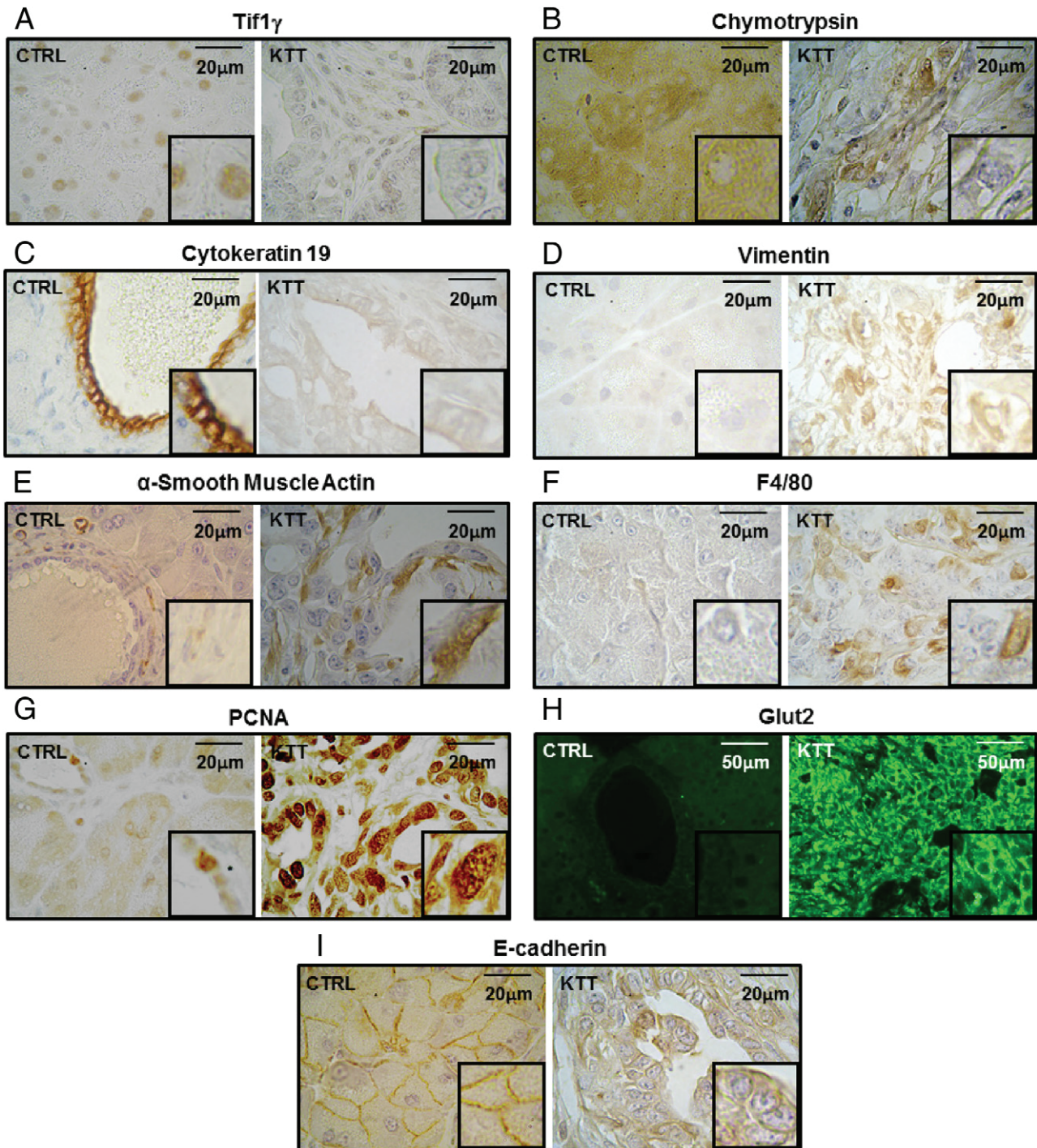


Figure 2. Histological characterization of KTT pancreatic tumors. IHC analysis reveals a complete loss of Tif1 γ expression in the epithelial compartment (A). KTT tumors exhibit an altered differentiation status both in the acinar (chymotrypsin, B) and ductal (cytokeratin-19, C) compartments. Markers of activated fibroblasts and/or myofibroblasts [vimentin (D) and α -SMA (E)] can be detected in the stroma of KTT tumors. Interestingly, some vimentin-positive, but α -SMA-negative, cells were seen lining the lumen, suggesting that some tumor cells express the vimentin marker. Tumor-associated macrophages are also seen in KTT tumors (F4/80, F). Proliferative index [proliferating cell nuclear antigen (PCNA), G] and metabolic activity (Glut2, H) markers are both highly overexpressed in KTT tumors. These PDACs present a dedifferentiated phenotype, generally associated with disorganization of E-cadherin (I) from membrane toward the inside cellular compartment. CTRL, control.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the Fisher exact test. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

We generated aging KTT mice that were euthanized between the age of 200 days and 1 year ($n = 3$). As described later, two of three of these mice presented with

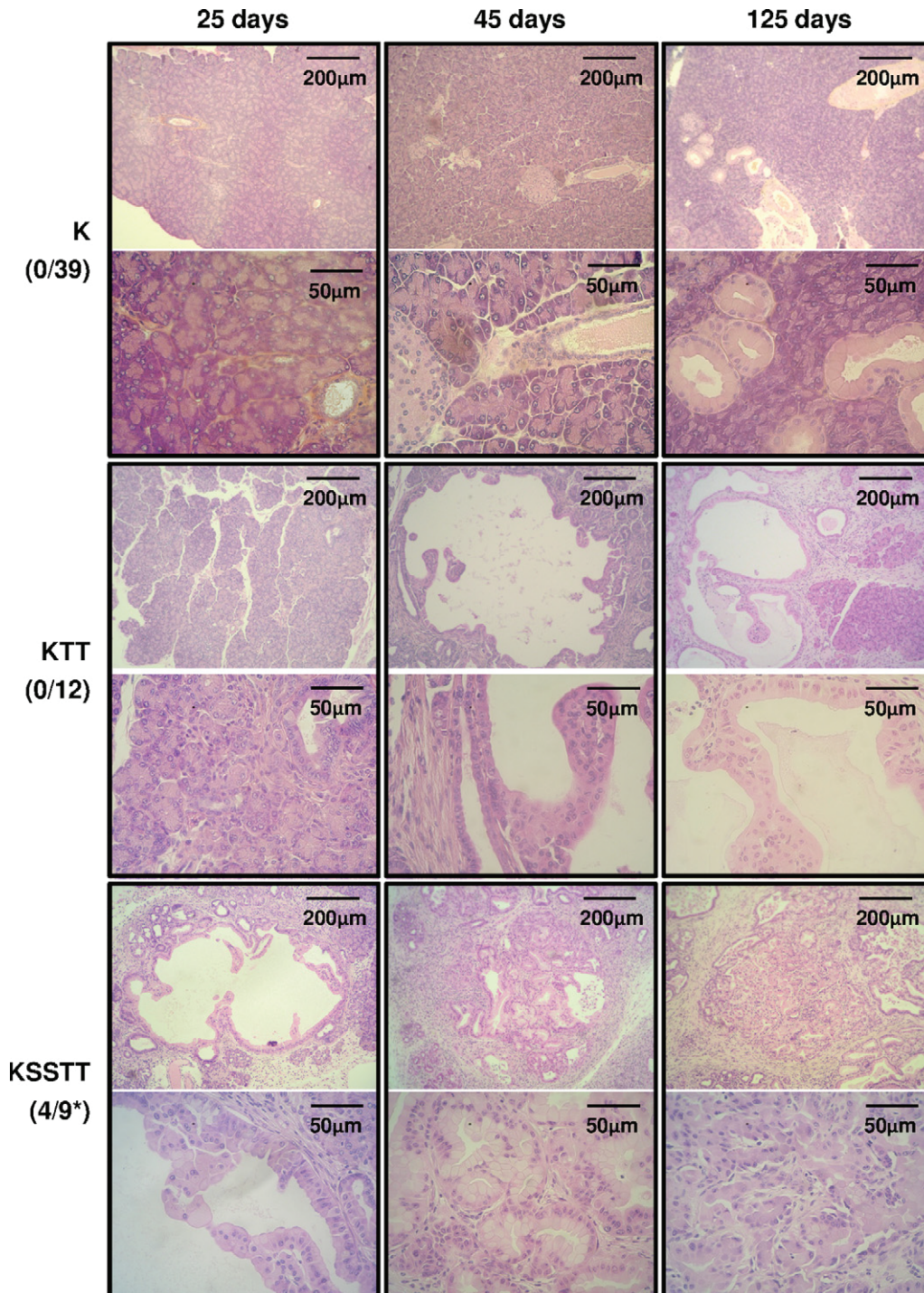


Figure 3. Deletion of *Smad4* in KTT mice accelerates PDAC development. Histological sections of K, KTT, and KSSTT mutant mouse pancreas were stained with hematoxylin-phloxinsaffron from 25 to 125 days. For each panel pair, low (**upper**) and high (**lower**) magnifications are shown. For each genotype, the number of mice developing PDACs before the age of 200 days is represented as a fraction number (in parentheses). The *P* value was determined by the exact Fisher test. **P* < 0.05.

PDAC, whereas none of the *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}* (K; *n* = 9) or *Pdx1-Cre; Tif1 $\gamma^{lox/lox}$* (TT; *n* = 6) control mice developed PDAC during this time frame (see Supplemental Table S1 at <http://ajp.amjpathol.org>). The longitudinal analysis of one KTT mouse by magnetic resonance imaging showed gradual growth of cystic lesions (hyper-signal), with the onset at 200 days of age of a firm and solid mass (isignal) that developed into the tail of the

pancreas (Figure 1A). Thirty days later (at the age of 230 days), the size of this solid lump had dramatically increased, prompting us to euthanize the animal. Macroscopic analysis of the pancreas from this animal confirmed the presence of multifocal cystic lesions (smooth texture), colonizing the entire organ, and the presence of a voluminous and firm tumor (tough texture), which had invaded the tail of the pancreas (Figure 1B). Microscopic

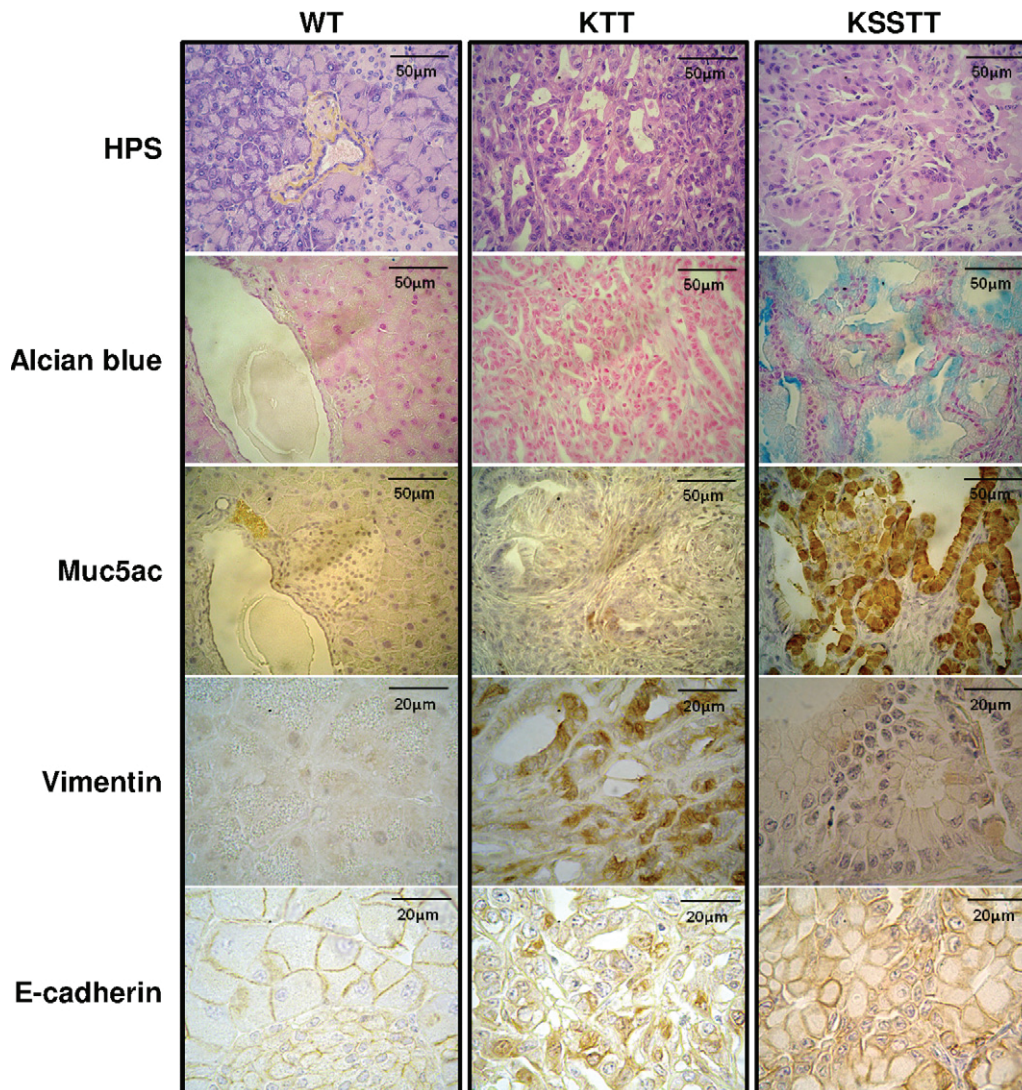


Figure 4. KTT and KSSTT pancreatic tumors display different histological features. Histological sections of 365-day-old control [wild type (WT)], 231-day-old KTT, and 126-day-old KSSTT pancreas samples stained with hematoxylin-phloxinsaffron or Alcian blue (mucin specific) or subjected to IHC for Mucin-5ac (Muc5ac), vimentin, or E-cadherin.

analysis of the pancreatic nodule that developed in this KTT mouse revealed a poorly differentiated carcinoma (Figure 1C), found adjacent to epithelial cysts reminiscent to human IPMNs. We observed focal destruction of the pancreatic parenchyma by a malignant epithelial proliferation made of irregular glands and cellular cords. Tumor cells are irregular in size and shape, with abundant basophilic cytoplasm and irregular nuclei. Mitotic features are common. The tumoral stroma presents with multiple inflammatory cells but only a low level of collagen between tumor cells. Histological analysis of the two other KTT mice sacrificed at the ages of 256 and 342 days revealed the presence of a small focus with PDAC and the presence of multiple large high-grade IPMNs with some papillary protrusions (data not shown). Altogether, these data indicate that KTT mice develop IPMNs with short latency and revealed that these tumors have high malignant potential.

To carefully characterize the pathological features of PDAC arising in KTT mice, we performed immunohistochemistry (IHC) and immunofluorescence experiments, which allowed us to underline the hallmarks of PDAC (Figure 2). In accordance with the expression pattern of the *Pdx1-Cre* transgene (in all pancreatic epithelial lineages¹⁰), we observed a complete loss of Tif1 γ expression in the epithelial compartment of KTT tumors, whereas residual expression could be detected in the microenvironment surrounding the cancer cells (mesenchymal cells and immune infiltrates) (Figure 2A). KTT tumors have lost their acinar differentiation (chymotrypsin negative) (Figure 2B). Cytokeratin 19, a marker that is normally only expressed at the membrane of the cells lining the duct in wild-type pancreas, presents a faint, but diffuse, cytoplasmic localization in KTT tumors, attesting to the altered ductal differentiation of these tumors (Figure 2C). We next explored the tumor-associated stroma.

Indeed, it is well documented that PDAC is characterized by an abundant stroma (desmoplastic stroma), the epithelial cancer cells eventually representing <10% of the tumor. Positive staining for vimentin (Figure 2D) and α -SMA (Figure 2E) confirmed the presence of a fibroblastic/myofibroblastic stromal compartment in KTT tumors. Interestingly, some vimentin-positive cells (but α -SMA negative) were seen lining the lumen, suggesting that some tumoral cells express the vimentin marker. We also detected tumor-associated macrophages (F4/80-positive cells) in KTT tumors (Figure 2F). To assess the proliferative index and the metabolic status of KTT tumors, we examined the expression of proliferating cell nuclear antigen (Figure 2G) and glut2 (Figure 2H) markers, which are both highly expressed in KTT tumors. The poorly differentiated state is generally associated with disorganization of E-cadherin, a membrane protein ensuring the maintenance of proper cell-cell contact. IHC against E-cadherin in KTT PDACs revealed a severe disorganization of the epithelial architecture, with a clear delocalization of E-cadherin from the membrane to the intracellular compartment (Figure 2I).

SMAD4 (alias, *DPC4*, deleted in pancreatic carcinoma, locus 4) is involved in TGF- β signaling and is a major tumor suppressor deleted in approximately 50% of PDACs. TIF1 γ has been implicated as a modulator of TGF- β signaling, potentially either augmenting or compromising SMAD protein function. To examine the genetic interactions between *Tif1 γ* and *Smad4*, we generated conditional null mice for both *Smad4* and *Tif1 γ* in a *Kras*-driven mouse model of pancreatic cancer. We observed that *Pdx1-Cre; Smad4^{lox/lox}; Tif1 γ ^{lox/lox}* (SSTT; $n = 18$) double-null mice do not develop pancreatic lesions (all ages, $n = 18$; aged >125 days, $n = 8$) (see Supplemental Table S1 at <http://ajp.amjpathol.org>). We next generated *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Smad4^{lox/lox}; Tif1 γ ^{lox/lox}* mice harboring pancreatic inactivation for both *Smad4* and *Tif1 γ* in a *Kras^{G12D}* background (KSSTT; $n = 9$) (see Supplemental Table S1 at <http://ajp.amjpathol.org>). Interestingly, the two KSSTT mice that we euthanized at the age of 25 days presented high-grade IPMN lesions. Moreover, 44% (4/9) of KSSTT mice that we euthanized before the age of 200 days had developed a PDAC (Figure 3). More important, PDAC developing as soon as the age of 46 days has never been reported in K or KTT mice. Thus, double-null homozygous inactivation of *Tif1 γ* and *Smad4*, in a *Kras^{G12D}* background, induces the formation of PDACs at a higher frequency and a shorter latency than any other combined mutations. We have also generated *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Smad4^{lox/+}; Tif1 γ ^{lox/lox}* mice (KSTT; $n = 7$) harboring *Tif1 γ* homozygous inactivation and a *Smad4* heterozygous inactivation. Interestingly, >50% (4/7) of the KSTT mice develop PDACs in an intermediary time frame to what is observed in KTT and KSSTT mice (see Supplemental Table S1 at <http://ajp.amjpathol.org>).

Histological analysis of these tumors revealed that KSSTT tumors retained more differentiated features compared with KTT tumors. Indeed, KSSTT showed strong Alcian blue staining and Mucin-5ac immunoreactivity, attesting a well-differentiated mucinous phenotype. In addition, KSSTT tu-

mors retained a clear epithelial differentiation, as attested by an intact E-cadherin intercellular network and the absence of vimentin expression (Figure 4).

Discussion

By using the *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Tif1 γ ^{lox/lox}* mouse model, we previously reported that the inactivation of *Tif1 γ* could cooperate with the *Kras^{G12D}* oncogene to induce IPMNs with full penetrance by the age of 189 days.⁶ Herein, we extended this study by demonstrating, in aging KTT mice (aged >200 days), that homozygous inactivation of *Tif1 γ* significantly potentiates the capacity of *Kras^{G12D}* to induce PDACs, supporting the potency of IPMNs to evolve toward aggressive lesions, as observed in humans. This observation reinforces the existence of a tumor-suppressive pathway, orchestrated by *Tif1 γ* , to prevent malignant transformation of premalignant lesions induced by activated *Kras*. However, no direct communication between the tumor itself and a pre-existing IPMN was proved by the pathological examination. Whether PDACs directly arise from existing precancerous cystic lesions remains an open question in the field.

The mechanism by which TIF1 γ exerts its tumor-suppressive effect remains elusive. TGF- β signaling is classically considered as tumor suppressive, via its anti-proliferative and pro-apoptotic functions, to prevent normal or premalignant cells to evolve toward a malignant state. This is well illustrated by the high rate of inactivating genetic alterations in the TGF- β -SMAD4 pathway¹¹ and by mouse models showing that *Smad4*-homozygous inactivation, in combination with activated *Kras*,¹²⁻¹⁴ causes the development of cystic lesions with a higher potential to progress toward PDAC, compared with mice expressing activated *Kras* alone (*Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}*).¹⁵ To address the genetic relationship between *Tif1 γ* and *Smad4* in pancreatic tumors, we generated KSSTT double-null homozygous mutant mice. We observed a pronounced genetic interaction between *Smad4* and *Tif1 γ* inactivation, demonstrating that both molecules act in separate pathways to suppress a premalignant-to-malignant *Kras*-driven pancreatic tumor. It is, however, possible that the capacity of *Tif1 γ* to constrain the premalignant-to-malignant progression depends on the modulation of TGF- β signaling arms independent of SMAD4. This could involve R-SMADs or noncanonical TGF- β pathways. Indeed, it has been proposed in other cell systems that TIF1 γ /R-SMAD complexes could positively mediate TGF- β functions,^{3,16,17} through the regulation of expression of a different set of genes by R-SMAD-TIF1 γ and R-SMAD-SMAD4 complexes.¹⁸ This hypothesis is consistent with the phenotype observed in *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; T β R11^{lox/lox}* mice,¹⁹ in which canonical and noncanonical TGF- β pathways are abrogated, with a phenotype resembling the one observed in KSSTT mice. Finally, TIF1 γ could prevent the premalignant-to-malignant progression through mechanisms totally unrelated to TGF- β signaling. Indeed, it may result from the modulation of gen-

eral programs affecting broader genomic functions. For instance, TIF1 γ and related family member TIF1 α were involved in chromatin remodeling²⁰ and transcription elongation,^{17,21} and TIF1 β was involved in DNA repair.²²

Once the malignant transformation has occurred by bypassing its anti-proliferative and pro-apoptotic effects, TGF- β acquires oncogenic properties and eventually facilitates tumor progression. Even if our results clearly argue for a role of Tif1 γ to constrain the transition between a premalignant and a malignant state through a mechanism independent of Smad4 activity, we cannot exclude that Smad4 function may facilitate tumor aggressiveness after the premalignant state is overrun and the premalignant state is achieved (in malignant tumors that retained a functional Smad4). In such cases, Smad4 may facilitate local invasion and metastatic dissemination by inducing epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). This may reflect the capacity of TIF1 γ to constrain invasiveness programs, such as EMT, as recently demonstrated *in vitro* in human mammary epithelial cells.¹⁸ Consistent with this, the *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Ink4a/Arf^{lox/lox}, Smad4^{lox/lox}* mice¹² develop well-differentiated PDAC, with attenuated invasive properties, compared with the poorly differentiated tumors observed in *Pdx1-Cre; LSL-Kras^{G12D}; Ink4a/Arf^{lox/lox}* mice. In our study, even if PDACs developing in KSSST mice arise with a shorter latency and a higher penetrance compared with KTT mice, they present a well-differentiated phenotype compared with the poorly differentiated phenotype of the PDACs we observed in KTT mice. This suggests a tumor-suppressive role of Tif1 γ to limit the aggressiveness of Smad4-positive cancer cells by compromising their capacity to undergo EMT. It may result in a lower capacity to generate metastases. The molecular mechanism occurring *in vivo* may rely on the capacity of TIF1 γ to mono-ubiquitinate SMAD4 and limit SMAD4 nuclear accumulation, as demonstrated in other systems.^{2,4}

In conclusion, we demonstrate, in this study, that *Tif1 γ* inactivation cooperates with activated *Kras* to potentiate the premalignant-to-malignant transition to promote the onset of poorly differentiated tumors. We also evidence that the tumor-suppressive role of Tif1 γ during the premalignant-to-malignant progression is independent of Smad4 activity. Finally, we noticed that the absence of Smad4 could redirect Tif1 γ -negative pancreatic tumors toward a well-differentiated phenotype, consistent with an effect of Tif1 γ to inhibit Smad4-dependent EMT. Then, Tif1 γ exerts tumor-suppressive functions independently of Smad4 in the premalignant-to-malignant transition but may also exert tumor-suppressive functions dependent on Smad4 later on during tumor progression.

Acknowledgments

We thank the specific pathogen-free animal facility at AniCan Plateform, Centre Léon Bérard and each of its members for technical assistance and animal care and Dr. David Wotton for helpful discussion.

References

1. Hatakeyama S: TRIM proteins and cancer. *Nat Rev Cancer* 2011, 11:792–804
2. Dupont S, Zacchigna L, Cordenonsi M, Soligo S, Adorno M, Rugge M, Piccolo S: Germ-layer specification and control of cell growth by Ectodermin, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell* 2005, 121:87–99
3. He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Moore MA, Massague J: Hematopoiesis controlled by distinct TIF1 γ and Smad4 branches of the TGF β pathway. *Cell* 2006, 125:929–941
4. Dupont S, Mamidi A, Cordenonsi M, Montagner M, Zacchigna L, Adorno M, Martello G, Stinchfield MJ, Soligo S, Morsut L, Inui M, Moro S, Modena N, Argenton F, Newfeld SJ, Piccolo S: FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGF β signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell* 2009, 136:123–135
5. Xi Q, Wang Z, Zaromytidou AI, Zhang XH, Chow-Tsang LF, Liu JX, Kim H, Barlas A, Manova-Todorova K, Kaartinen V, Studer L, Mark W, Patel DJ, Massague J: A poised chromatin platform for TGF- β access to master regulators. *Cell* 2011, 147:1511–1524
6. Vincent DF, Yan KP, Treilleux I, Gay F, Arfi V, Kaniewski B, Marie JC, Lepinasse F, Martel S, Goddard-Leon S, Iovanna JL, Dubus P, Garcia S, Puisieux A, Rimokh R, Bardeesy N, Scaozec JY, Losson R, Bartholin L: Inactivation of TIF1 γ cooperates with *Kras* to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genet* 2009, 5:e1000575
7. Morsut L, Yan KP, Enzo E, Aragona M, Soligo SM, Wendling O, Mark M, Khetchoumian K, Bressan G, Chambon P, Dupont S, Losson R, Piccolo S: Negative control of Smad activity by ectodermin/Tif1 γ patterns the mammalian embryo. *Development* 2010, 137:2571–2578
8. Jackson EL, Willis N, Mercer K, Bronson RT, Crowley D, Montoya R, Jacks T, Tuveson DA: Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* 2001, 15:3243–3248
9. Yang X, Li C, Herrera PL, Deng CX: Generation of Smad4/Dpc4 conditional knockout mice. *Genesis* 2002, 32:80–81
10. Gu G, Dubauskaite J, Melton DA: Direct evidence for the pancreatic lineage: nGN3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 2002, 129:2447–2457
11. Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA: Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 2006, 20:1218–1249
12. Bardeesy N, Cheng KH, Berger JH, Chu GC, Pahler J, Olson P, Hezel AF, Horner J, Lauwers GY, Hanahan D, Depinho RA: Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev* 2006, 20:3130–3146
13. Kojima K, Vickers SM, Adsay NV, Jhala NC, Kim HG, Schoeb TR, Grizzle WE, Klug CA: Inactivation of Smad4 accelerates *Kras*(G12D)-mediated pancreatic neoplasia. *Cancer Res* 2007, 67:8121–8130
14. Izeradjene K, Combs C, Best M, Gopinathan A, Wagner A, Grady WM, Deng CX, Hruban RH, Adsay NV, Tuveson DA, Hingorani SR: *Kras*(G12D) and Smad4/Dpc4 haploinsufficiency cooperate to induce mucinous cystic neoplasms and invasive adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Cell* 2007, 11:229–243
15. Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA, Kawaguchi Y, Johann D, Liotta LA, Crawford HC, Putt ME, Jacks T, Wright CV, Hruban RH, Lowy AM, Tuveson DA: Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 2003, 4:437–450
16. Doisne JM, Bartholin L, Yan KP, Garcia CN, Duarte N, Le Ludeuc JB, Vincent D, Cyprian F, Horvat B, Martel S, Rimokh R, Losson R, Benlagha K, Marie JC: iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF- β signaling. *J Exp Med* 2009, 206:1365–1378
17. Bai X, Kim J, Yang Z, Jurynech MJ, Akie TE, Lee J, LeBlanc J, Sessa A, Jiang H, DiBiase A: TIF1 γ controls erythroid cell fate by regulating transcription elongation. *Cell* 2010, 142:133–143
18. Hesling C, Fattet L, Teyre G, Jury D, Gonzalo P, Lopez J, Vanbelle C, Morel AP, Gillet G, Mikaelian I, Rimokh R: Antagonistic regulation of EMT by TIF1 γ and Smad4 in mammary epithelial cells. *EMBO Rep* 2011, 12:665–672
19. Ijichi H, Chytil A, Gorska AE, Aakre ME, Fujitani Y, Fujitani S, Wright CV, Moses HL: Aggressive pancreatic ductal adenocarcinoma in

- mice caused by pancreas-specific blockade of transforming growth factor-beta signaling in cooperation with active Kras expression. *Genes Dev* 2006, 20:3147–3160
20. Agricola E, Randall RA, Gaarenstroom T, Dupont S, Hill CS: Recruitment of TIF1 γ to chromatin via its PHD finger-bromodomain activates its ubiquitin ligase and transcriptional repressor activities. *Mol Cell* 2011, 43:85–96
21. Tsai WW, Wang Z, Yiu TT, Akdemir KC, Xia W, Winter S, Tsai CY, Shi X, Schwarzer D, Plunkett W, Aronow B, Gozani O, Fischle W, Hung MC, Patel DJ, Barton MC: TRIM24 links a non-canonical histone signature to breast cancer. *Nature* 2010, 468:927–932
22. Kepkay R, Attwood KM, Ziv Y, Shiloh Y, Dellaire G: KAP1 depletion increases PML nuclear body number in concert with ultrastructural changes in chromatin. *Cell Cycle* 2011, 10:308–322

**II. Identification de nouvelles fonctions
cellulaires régulées par TIF1 γ
(analyse transcriptomique à grande échelle)**

Dans le but d'identifier les différentes fonctions cellulaires régulées par TIF1 γ , et ainsi mieux appréhender son rôle suppresseur de tumeur, nous avons réalisé **une analyse transcriptomique à grande échelle** à partir d'ADNc issus de fibroblastes embryonnaires primaires de souris (MEF, *Mouse Embryonic Fibroblasts*) présentant une **inactivation homozygote de TIF1 γ** .

A. Génération des MEFs primaires TIF1 γ ^{Lox/Lox}

Afin de réaliser cette analyse transcriptomique à grande échelle, nous avons utilisé des fibroblastes embryonnaires issus de souris transgéniques [*Tif1 γ ^{Lox/Lox}*], prélevés au jour embryonnaire E13,5 (Xu, 2005). Ce modèle nous permet d'étudier l'expression génique de cellules n'exprimant plus TIF1 γ , suite à une recombinaison génomique au niveau des exons 2 à 4 du gène, grâce à l'action de l'enzyme Cre recombinase (après transduction adénovirale). Ainsi, cette méthode présente l'avantage théorique d'avoir une absence totale d'expression du gène cible dans les cellules recombinées, en comparaison d'une stratégie d'interférence à l'ARN dans laquelle on observe généralement une expression résiduelle. De plus, l'utilisation d'un système conditionnel Cre-Lox permet de s'affranchir du rôle de TIF1 γ dans le développement embryonnaire précoce et de la létalité observée à E9,5 pour les animaux délétés de façon constitutive pour TIF1 γ (Kim and Kaartinen, 2008). Afin de permettre une interprétation statistique de nos résultats et de prendre en compte la variabilité inter-individus, nous avons généré trois lignées de MEFs issues de trois embryons [*Tif1 γ ^{Lox/Lox}*] différents.

Dans un premier temps, nous avons validé l'inactivation de TIF1 γ dans les différentes lignées de MEFs. Pour cela nous avons déterminé le taux d'expression de TIF1 γ par RT-PCR semi-quantitative et par RT-qPCR. Ainsi, nous avons pu déterminer que le taux moyen d'inactivation de TIF1 γ était de 90 % (**Figure 38A**). De plus, nous avons effectué des marquages fluorescents afin de visualiser la présence de la protéine TIF1 γ et l'efficacité de transduction (par visualisation directe de l'eGFP fusionnée à la Cre recombinase dans les vecteurs rétroviraux utilisés) (**Figure 38B**).

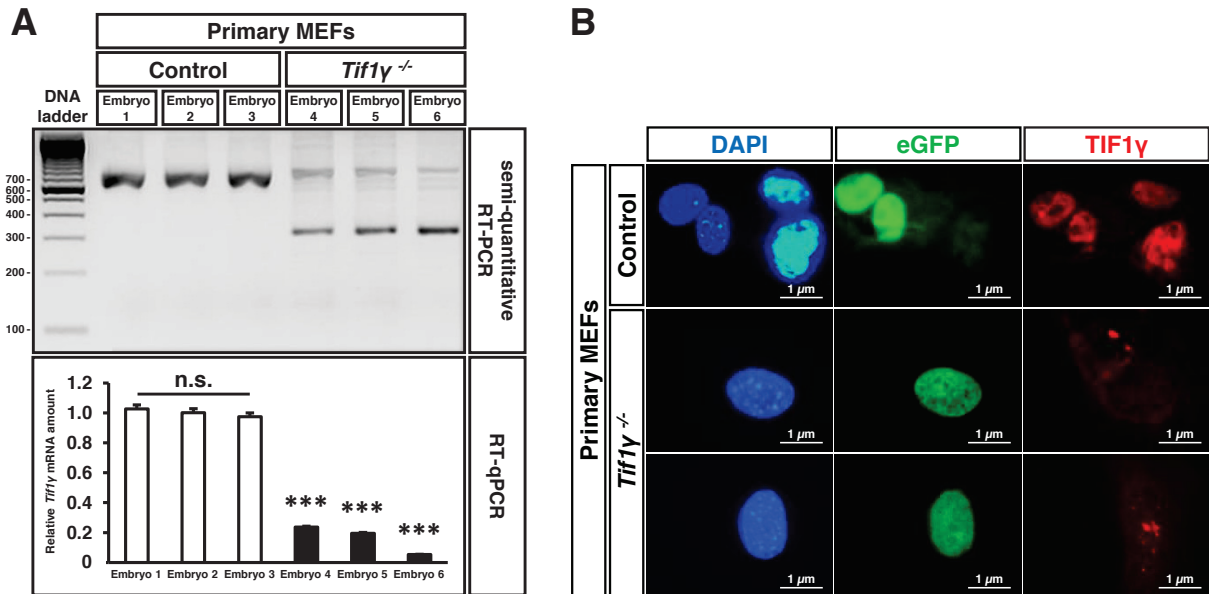


Figure 38 : Génération de MEFs primaires délétées pour *Tif1γ*.

A) Analyses RT-PCR semi-quantitatives (haut) et RT-qPCR (bas) de l'expression de *Tif1γ* dans 3 lignées de MEFs primaires contrôles et 3 lignées de MEFs primaires *Tif1γ*^{-/-}. B) Visualisation directe de l'eGFP (vert) et marquage immunofluorescent de TIF1γ dans des MEFs primaires contrôles et *Tif1γ*^{-/-}. Les noyaux sont contre-colorés au DAPI.

B. Fonctions cellulaires altérées en absence de TIF1 γ

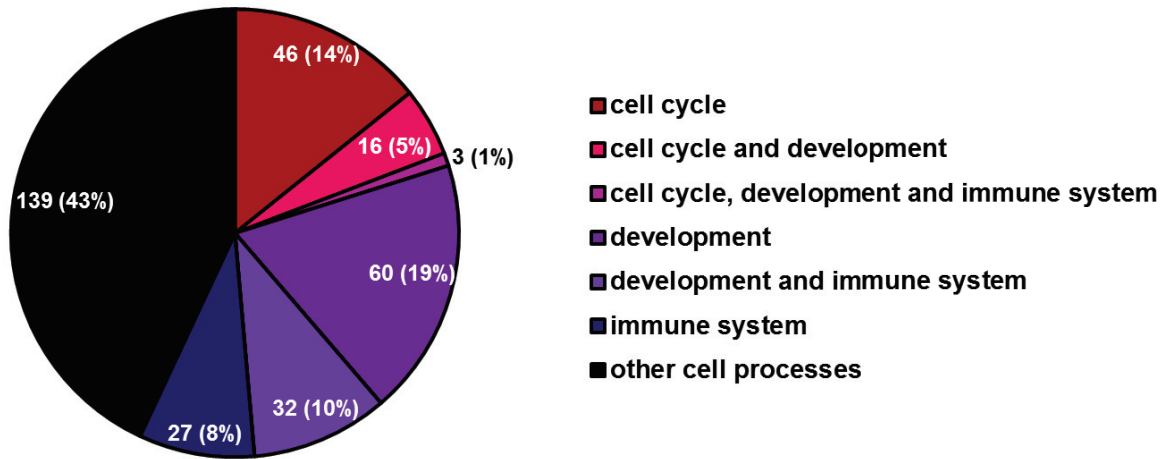
Nous avons ensuite étudié les processus cellulaires altérés en absence de TIF1 γ et avons pu mettre en évidence la dérégulation de gènes impliqués dans trois grandes fonctions biologiques : le développement, la réponse immunitaire et la régulation du cycle cellulaire (**Figure 39**).

- Parmi les gènes dérégulés (activés ou inhibés) en absence de TIF1 γ (n=323), plus d'1/3 sont impliqués dans les processus de développement (qui comprennent les mécanismes de différenciation), que ce soit parmi les gènes inhibés ou activés transcriptionnellement suite à l'inactivation de TIF1 γ . Ces résultats sont en accord avec les nombreuses études décrivant le rôle de TIF1 γ dans le développement et la différenciation cellulaire (**Figure 39**) (Dupont et al., 2005; He et al., 2006; Massagué and Xi, 2012; Morsut et al., 2010).

- Parmi les **gènes dont l'expression est inhibée en absence de TIF1 γ (n=174)** 1/3 de ces gènes sont impliqués dans la réponse immunitaire. De façon intéressante, une grande partie de ces gènes d'immunité dérégulés en absence de TIF1 γ est également impliquée dans les processus de développement. Ce résultat est en adéquation avec une étude publiée par notre équipe, en collaboration avec le groupe du Dr Julien Marie, décrivant le rôle coopératif de TIF1 γ et SMAD4 dans la différenciation des cellules immunitaires iNKT (**Figure 39**). (Doisne et al., 2009).

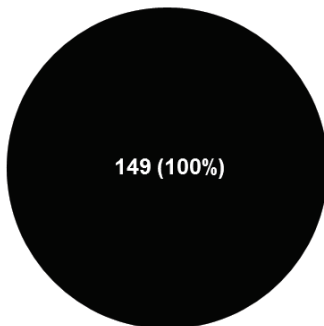
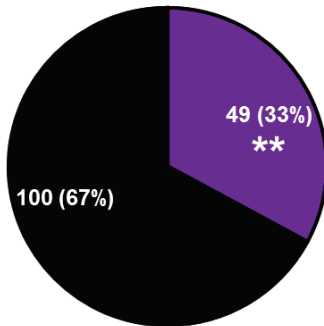
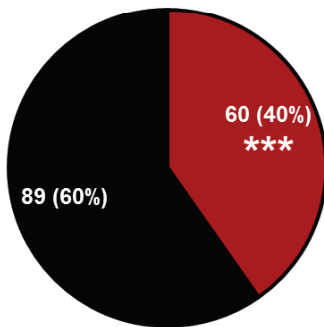
- Parmi les **gènes dont l'expression est activée en absence de TIF1 γ (n=149)**, 1/3 sont impliqué dans la régulation du cycle cellulaire (**Figure 39**). De façon intéressante, peu de publications décrivent le rôle de TIF1 γ dans la progression du cycle cellulaire. En effet, une étude met en évidence le rôle de TIF1 γ en mitose (Sedgwick et al., 2012) et quelques études décrivent le rôle contradictoire de TIF1 γ sur l'arrêt de prolifération médié par le TGF β , semblant être fortement dépendant du type cellulaire utilisé. En effet, dans les cellules hépatiques (HepG2, Huh7 et Hep3B), TIF1 γ inhibe l'arrêt de prolifération médié par le TGF β (Ding et al., 2014; Dupont et al., 2005), tandis que dans les cellules hématopoïétiques (cellules progénitrices CD34+) et dans les cellules mammaires (HMEC et MCF10A), TIF1 γ ne semble pas influencer l'effet cytostatique du TGF β (He et al., 2006; Hesling et al., 2011). Ainsi, nous avons décidé de focaliser nos travaux sur le rôle de TIF1 γ dans la progression du cycle cellulaire.

323 deregulated genes in *Tif1y*^{-/-} cells



cell cycle: 65 genes (20%)
 development : 111 genes (34%)
 immune system : 59 genes (18%)

149 upregulated genes in *Tif1y*^{-/-} cells



174 downregulated genes in *Tif1y*^{-/-} cells

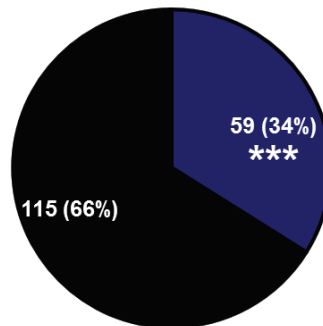
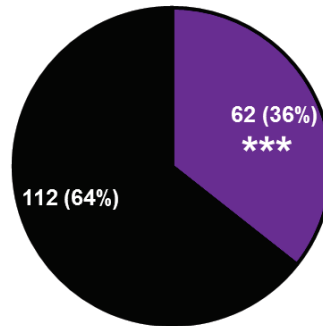
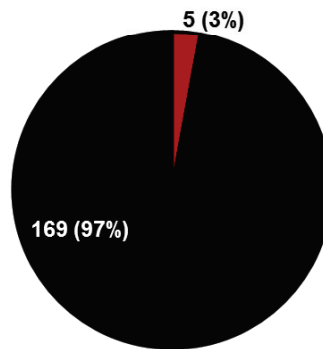


Figure 39 : Classification fonctionnelle des différents gènes dérégulés en absence de TIF1γ.

C. TIF1 γ et mitose

Nous avons alors étudié plus en détail les gènes dont l'expression était activée en absence de TIF1 γ et dont la fonction biologique était liée à la progression du cycle cellulaire. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que la majorité de ces gènes était impliquée, plus spécifiquement dans la phase de mitose et les processus de cytodivision (**Figure 40**) (liste complète disponible à la fin de ce paragraphe).

149 upregulated genes in Tif1 $\gamma^{-/-}$ cells

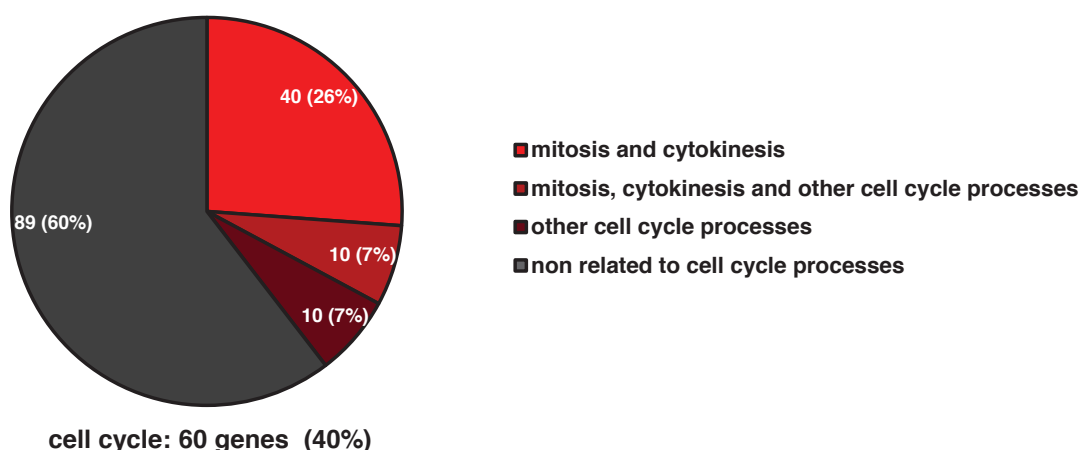


Figure 40 : Classification fonctionnelle des gènes surexprimés en absence de TIF1 γ .

L'implication de la voie de signalisation du TGF β dans la progression du cycle cellulaire est majoritairement décrite en phase G1, notamment *via* l'induction de p15 et p21, mais est beaucoup moins documentée en phase M. En effet, quelques études attribuent au TGF β un rôle dans la progression mitotique, aussi bien en tant qu'activateur qu'en tant qu'inhibiteur, néanmoins, son implication dans ce processus reste largement à élucider (Fujita and Epperly, 2008; Su et al., 2007; Zhu et al., 2007).

Comme décrit dans l'introduction bibliographique, le contrôle de la progression mitotique est un mécanisme clé dans les processus de tumorigenèse. Ainsi, nous faisons l'hypothèse que le rôle potentiel de TIF1 γ dans la progression mitotique pourrait médier ses fonctions oncosuppressives dans les phases précoces de tumorigenèse de façon indépendante à son implication dans la voie du TGF β .

De plus, parallèlement à notre analyse transcriptomique, une étude de Sedgwick *et al.* a également mis en évidence l'implication de TIF1 γ dans la mitose (voir paragraphe II-B-2-

ii concernant le rôle de TIF1 γ dans le contrôle de la prolifération) (Sedgwick et al., 2012). Cette étude décrit TIF1 γ comme un régulateur de l'activité E3-Ubiquitine ligase du complexe APC/C-Cdc20 et met en évidence l'arrêt du cycle cellulaire induit par la délétion transitoire de TIF1 γ par interférence à l'ARN. Cette observation conforte nos résultats d'analyse transcriptomique sur l'implication de TIF1 γ dans la régulation de la progression mitotique, mais est en contradiction avec ses fonctions oncosuppressives. Nous nous sommes donc intéressés plus particulièrement au rôle de TIF1 γ dans la mitose, afin de définir si ce processus biologique est impliqué dans ses fonctions anti-tumorales.

**Liste des gènes surexprimés dans les MEFs primaires *Tif1γ*^{-/-}
(comparés aux cellules contrôles ; ratio ≥ 1,70)**

Mit, Mitosis; Cyt, Cytokinesis; Oth, Other cell cycle processes.

Gene Symbol	Gene Name	Representative Public ID	<i>Tif1γ</i> ^{-/-} vs. control MEFs	Classification
<i>Oip5</i>	<i>Opa interacting protein 5</i>	BB238604	2.49	Mit
<i>Cenpp</i>	<i>centromere protein P</i>	AK014919	2.23	Mit
<i>Kif23</i>	<i>kinesin family member 23</i>	BG082989	2.15	Cyt, Mit
<i>Ndc80</i>	<i>NDC80 homolog, kinetochore complex component (S, cerevisiae)</i>	NM_023294	2.08	Mit
<i>Spc24</i>	<i>SPC24, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S, cerevisiae)</i>	BF577722	2.00	Mit
<i>Birc5</i>	<i>baculoviral IAP repeat-containing 5</i>	BC004702	1.98	Cyt, Mit
<i>Cdca2</i>	<i>cell division cycle associated 2</i>	BG065056	1.97	Mit
<i>Pebp1</i>	<i>phosphatidylethanolamine binding protein 1</i>	AK008037	1.95	Mit
<i>Cenph</i>	<i>centromere protein H</i>	BC025084	1.95	Mit
<i>Kif2c</i>	<i>kinesin family member 2C</i>	NM_134471	1.94	Mit
<i>Cenpm</i>	<i>centromere protein M</i>	NM_025639	1.94	Mit
<i>D2Ert750e</i>	<i>DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 750, expressed</i>	AU019491	1.92	Mit
<i>Ccnb1</i>	<i>cyclin B1</i>	AU015121	1.92	Mit
<i>Anln</i>	<i>anillin, actin binding protein</i>	BI690018	1.92	Cyt, Mit
<i>Kif11</i>	<i>kinesin family member 11</i>	BM234447	1.91	Mit
<i>Prdm5</i>	<i>PR domain containing 5</i>	BM219213	1.90	Mit
<i>Nuf2</i>	<i>NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S, cerevisiae)</i>	AK010351	1.90	Mit
<i>Aurkb</i>	<i>aurora kinase B</i>	BC003261	1.89	Cyt, Mit
<i>Aspm</i>	<i>asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)</i>	NM_009791	1.89	Mit
<i>Fam64a</i>	<i>family with sequence similarity 64, member A</i>	AK011345	1.87	Mit
<i>Ube2c</i>	<i>ubiquitin-conjugating enzyme E2C</i>	AV162459	1.86	Mit
<i>Kif20a</i>	<i>kinesin family member 20A</i>	NM_009004	1.85	Cyt
<i>Pole</i>	<i>polymerase (DNA directed), epsilon</i>	NM_011132	1.85	Mit
<i>Prc1</i>	<i>protein regulator of cytokinesis 1</i>	BC005475	1.83	Cyt
<i>Ncapd2</i>	<i>non-SMC condensin I complex, subunit D2</i>	BC025460	1.80	Mit
<i>Nusap1</i>	<i>nucleolar and spindle associated protein 1</i>	BC009096	1.79	Cyt, Mit
<i>Bmp4</i>	<i>bone morphogenetic protein 4</i>	NM_007554	1.79	Mit
<i>Cep55</i>	<i>centrosomal protein 55</i>	AK004655	1.78	Cyt, Mit
<i>Ccnb2</i>	<i>cyclin B2</i>	AK013312	1.76	Mit
<i>Ccna2</i>	<i>cyclin A2</i>	X75483	1.76	Mit
<i>Cenpk</i>	<i>centromere protein K</i>	NM_021790	1.75	Mit
<i>Mad21</i>	<i>MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)</i>	NM_019499	1.75	Mit
<i>Ttk</i>	<i>Ttk protein kinase</i>	NM_009445	1.73	Mit
<i>Cdkn3</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 3</i>	AK010426	1.73	Mit
<i>Cdca8</i>	<i>cell division cycle associated 8</i>	AV307110	1.73	Mit
<i>Cenpl</i>	<i>centromere protein L</i>	BB538449	1.73	Mit
<i>Nsl1</i>	<i>NSL1, MIND kinetochore complex component, homolog (S, cerevisiae)</i>	BM206988	1.72	Mit
<i>Cenpe</i>	<i>centromere protein E</i>	BG916502	1.72	Mit
<i>Bub1b</i>	<i>budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog, beta (S, cerevisiae)</i>	AU045529	1.71	Mit
<i>2810433K01Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 2810433K01 gene</i>	NM_025581	1.71	Mit

<i>Cenpf</i>	<i>centromere protein F</i>	BE848253	2.12	Mit, Oth
<i>Cdca5</i>	<i>cell division cycle associated 5</i>	NM_026410	1.93	Mit, Oth
<i>Spag5</i>	<i>sperm associated antigen 5</i>	BM208112	1.91	Mit, Oth
<i>Fbxo5</i>	<i>F-box protein 5</i>	AK011820	1.85	Mit, Oth
<i>Foxm1</i>	<i>forkhead box M1</i>	NM_008021	1.82	Mit, Oth
<i>Pim1</i>	<i>Proviral integration site 1</i>	BE631223	1.81	Mit, Oth
<i>Nek2</i>	<i>NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 2</i>	C77054	1.80	Mit, Oth
<i>Top2a</i>	<i>topoisomerase (DNA) II alpha</i>	BM211413	1.79	Mit, Oth
<i>Esp11</i>	<i>extra spindle poles-like 1 (S, cerevisiae)</i>	BM200578	1.76	Mit, Oth
<i>Cdkn2c</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)</i>	BC027026	1.71	Mit, Oth
<i>1500015O10Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 1500015O10 gene</i>	BB392676	3.34	Oth
<i>Esco2</i>	<i>establishment of cohesion 1 homolog 2 (S, cerevisiae)</i>	AK010391	2.08	Oth
<i>Gas2l3</i>	<i>growth arrest-specific 2 like 3</i>	BE199211	1.91	Oth
<i>Mki67</i>	<i>antigen identified by monoclonal antibody Ki 67</i>	X82786	1.82	Oth
<i>Tacc3</i>	<i>transforming, acidic coiled-coil containing protein 3</i>	BB787809	1.78	Oth
<i>Exo1</i>	<i>exonuclease 1</i>	BE986864	1.75	Oth
<i>C79407</i>	<i>expressed sequence C79407</i>	BB540053	1.74	Oth
<i>Dst</i>	<i>dystonin</i>	NM_134448	1.74	Oth
<i>Chaf1b</i>	<i>chromatin assembly factor 1, subunit B (p60)</i>	BC013532	1.72	Oth
<i>2810417H13Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 2810417H13 gene</i>	AK017673	1.72	Oth
<i>Col2a1</i>	<i>collagen, type II, alpha 1</i>	NM_031163	3.47	
<i>Coch</i>	<i>coagulation factor C homolog (Limulus polyphemus)</i>	BB731671	3.07	
<i>Cacna2d3</i>	<i>calcium channel, voltage-dependent, alpha2/delta subunit 3</i>	NM_009785	3.02	
<i>Abi3bp</i>	<i>ABI gene family, member 3 (NESH) binding protein</i>	BC026627	2.89	
<i>Sprr2k</i>	<i>small proline-rich protein 2K</i>	NM_011477	2.88	
<i>AI646023</i>	<i>expressed sequence AI646023</i>	BE910952	2.77	
<i>Fmod</i>	<i>fibromodulin</i>	NM_021355	2.71	
<i>Pcp4l1</i>	<i>Purkinje cell protein 4-like 1</i>	AV337888	2.53	
<i>Col8a2</i>	<i>collagen, type VIII, alpha 2</i>	BG229308	2.50	
<i>Anp32a</i>	<i>acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A</i>	AF022957	2.43	
<i>Cck</i>	<i>cholecystokinin</i>	NM_031161	2.41	
<i>Rspo2</i>	<i>R-spondin 2 homolog (Xenopus laevis)</i>	BG067392	2.40	
<i>Olfml2b</i>	<i>olfactomedin-like 2B</i>	BC025654	2.33	
<i>Nrn1</i>	<i>neuritin 1</i>	AK003046	2.25	
---	---	BB325257	2.22	
<i>Rcan2</i>	<i>regulator of calcineurin 2</i>	NM_030598	2.21	
<i>Fat4</i>	<i>FAT tumor suppressor homolog 4 (Drosophila)</i>	BB038914	2.14	
<i>Pcsk6</i>	<i>proprotein convertase subtilisin/kexin type 6</i>	BI157485	2.14	
<i>Slc1a3</i>	<i>solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3</i>	BB357585	2.12	
<i>Sorbs2</i>	<i>sorbin and SH3 domain containing 2</i>	BB251748	2.10	
<i>Sfrp2</i>	<i>secreted frizzled-related protein 2</i>	NM_009144	2.08	
<i>Fst</i>	<i>follistatin</i>	NM_008046	2.06	
<i>Synm</i>	<i>synemin, intermediate filament protein</i>	BB457010	2.04	
<i>Ppm1l</i>	<i>protein phosphatase 1 (formerly 2C)-like</i>	BB035578	2.03	

<i>Mmp13</i>	<i>matrix metalloproteinase 13</i>	NM_008607	2.02
<i>2610021K21Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 2610021K21 gene</i>	AK011507	2.02
<i>Tk1</i>	<i>thymidine kinase 1</i>	NM_009387	2.02
<i>C330027C09Rik</i>	<i>RIKEN cDNA C330027C09 gene</i>	AU018569	2.02
<i>Prelp</i>	<i>proline arginine-rich end leucine-rich repeat</i>	NM_054077	2.00
<i>Ramp1</i>	<i>receptor (calcitonin) activity modifying protein 1</i>	NM_016894	1.98
<i>Rad51ap1</i>	<i>RAD51 associated protein 1</i>	BC003738	1.97
<i>Tmeff2</i>	<i>transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2</i>	NM_019790	1.97
<i>Gucy1b3</i>	<i>guanylate cyclase 1, soluble, beta 3</i>	BF472806	1.96
<i>Rictor</i>	<i>RPTOR independent companion of MTOR, complex 2</i>	BG092467	1.96
<i>Plac9</i>	<i>placenta specific 9</i>	BB609699	1.94
<i>Myh11</i>	<i>myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle</i>	BC026142	1.93
<i>Zfp451</i>	<i>zinc finger protein 451</i>	BI714076	1.92
<i>Rad54b</i>	<i>RAD54 homolog B (S, cerevisiae)</i>	AW547464	1.91
<i>Ppap2b</i>	<i>phosphatidic acid phosphatase type 2B</i>	NM_080555	1.91
<i>Cbr2</i>	<i>carbonyl reductase 2</i>	BC010758	1.91
<i>9130213B05Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 9130213B05 gene</i>	AK008716	1.90
<i>Sema3a</i>	<i>sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A</i>	NM_009152	1.90
<i>Eps8l2</i>	<i>EPS8-like 2</i>	NM_133191	1.87
<i>Serpinb1a</i>	<i>serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1a</i>	AF426024	1.87
<i>Bdnf</i>	<i>brain derived neurotrophic factor</i>	AY057913	1.87
<i>Rrm2</i>	<i>ribonucleotide reductase M2</i>	NM_009104	1.87
<i>Frzb</i>	<i>frizzled-related protein</i>	U91905	1.86
<i>Pbk</i>	<i>PDZ binding kinase</i>	NM_023209	1.85
<i>Npr3</i>	<i>natriuretic peptide receptor 3</i>	BG080055	1.84
<i>Trps1</i>	<i>trichorhinophalangeal syndrome I (human)</i>	BB136803	1.84
<i>Efr3b</i>	<i>EFR3 homolog B (S, cerevisiae)</i>	BB795377	1.83
<i>Eme1</i>	<i>essential meiotic endonuclease 1 homolog 1 (S, pombe)</i>	BG064903	1.82
<i>Lhx9</i>	<i>LIM homeobox protein 9</i>	BB041180	1.82
<i>Galnt3</i>	<i>UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide acetylgalactosaminyltransferase 3</i>	N- AK019995	1.82
<i>Mtap2</i>	<i>microtubule-associated protein 2</i>	AV337593	1.82
---	---	BB291656	1.80
<i>Clec14a</i>	<i>C-type lectin domain family 14, member a</i>	NM_025809	1.80
<i>Dck</i>	<i>deoxycytidine kinase</i>	BE630687	1.79
<i>Rfc5</i>	<i>replication factor C (activator 1) 5</i>	AK011489	1.78
<i>Hipk2</i>	<i>homeodomain interacting protein kinase 2</i>	BB554636	1.78
<i>Ctnnd2</i>	<i>catenin (cadherin associated protein), delta 2</i>	BB431091	1.78
<i>9630026M06Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 9630026M06 gene</i>	BB127931	1.78
<i>Plce1</i>	<i>phospholipase C, epsilon 1</i>	AV306884	1.78
<i>Hmgb2</i>	<i>high mobility group box 2</i>	X67668	1.78
<i>2610018G03Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 2610018G03 gene</i>	AW556821	1.78
<i>Shcbp1</i>	<i>Shc SH2-domain binding protein 1</i>	NM_011369	1.77
<i>Gm12824</i>	<i>predicted gene 12824</i>	BB215381	1.77
<i>Mfap3l</i>	<i>microfibrillar-associated protein 3-like</i>	AK017269	1.77
<i>Gpc6</i>	<i>glypican 6</i>	BB493031	1.77
<i>AU044157</i>	<i>expressed sequence AU044157</i>	BG071797	1.76

<i>Smoc1</i>	<i>SPARC related modular calcium binding 1</i>	NM_022316	1.76
<i>Diap3</i>	<i>diaphanous homolog 3 (Drosophila)</i>	NM_019670	1.76
<i>C1qtnf3</i>	<i>C1q and tumor necrosis factor related protein 3</i>	NM_030888	1.76
<i>Mxd3</i>	<i>Max dimerization protein 3</i>	NM_053213	1.75
<i>Syne2</i>	<i>synaptic nuclear envelope 2</i>	BF582734	1.74
<i>Dmp1</i>	<i>dentin matrix protein 1</i>	AV020965	1.74
<i>4930547N16Rik</i>	<i>RIKEN cDNA 4930547N16 gene</i>	BM205349	1.74
<i>Osbpl6</i>	<i>oxysterol binding protein-like 6</i>	BB197141	1.73
<i>Stil</i>	<i>Scl/Tal1 interrupting locus</i>	BC004585	1.72
<i>Chst7</i>	<i>carbohydrate (N-acetylglucosamino) sulfotransferase 7</i>	AB046929	1.72
<i>Ptchd1</i>	<i>patched domain containing 1</i>	BB048525	1.72
<i>Nr4a2</i>	<i>nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2</i>	NM_013613	1.71
<i>Adamtsl3</i>	<i>ADAMTS-like 3</i>	BM235389	1.71
<i>Dcn</i>	<i>decorin</i>	NM_007833	1.71
<i>Snrnp48</i>	<i>small nuclear ribonucleoprotein 48 (U11/U12)</i>	BB703486	1.71
<i>Rnf103</i>	<i>ring finger protein 103</i>	AV337847	1.71
<i>Wdr90</i>	<i>WD repeat domain 90</i>	AK014328	1.71
<i>Rmnd5a</i>	<i>required for meiotic nuclear division 5 homolog A (S, cerevisiae)</i>	BI659732	1.70
<i>Sync</i>	<i>syncollin</i>	AK004279	1.70

**III. Implication du point de contrôle
du fuseau mitotique dans
les fonctions oncosuppressives de TIF1 γ**

A. Introduction

Notre **analyse transcriptionnelle** à grande échelle nous a permis d'identifier TIF1 γ comme un régulateur de la **progression mitotique**. Parallèlement, une **étude publiée par Sedgwick et al.** a permis de conforter cette nouvelle fonction cellulaire de TIF1 γ en décrivant son rôle dans la transition métaphase-anaphase (Sedgwick et al., 2012). En effet, dans ces travaux, les auteurs mettent en évidence que l'**inactivation transitoire de TIF1 γ** , par interférence à l'ARN dans des cellules HeLa, induit un arrêt du cycle cellulaire en métaphase, associée à **(1)** l'inhibition de l'activité E3-Ubiquitine ligase du complexe APC/C-cdc20 et **(2)** une activation prolongée du point de contrôle du fuseau mitotique en réponse à un mauvais alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique. Ainsi, la perte de TIF1 γ **inhibe la prolifération cellulaire**. Néanmoins, cet arrêt du cycle cellulaire est en **contradiction avec le rôle suppresseur de tumeur** de TIF1 γ mis en évidence dans différents modèles murins, ainsi que dans de nombreuses tumeurs humaines (Aucagne et al., 2011a; Herquel et al., 2011a; Vincent et al., 2009a, 2012). Dans cette étude, nous avons étudié l'effet d'une **inactivation prolongée de TIF1 γ** , reproduisant mieux les conditions physio-pathologiques du développement tumoral, afin de comprendre si l'implication de TIF1 γ dans la progression mitotique est responsable de ses effets oncosuppresseurs.

B. Résultats publiés (soumis)

Nous avons alors utilisé des MEFs immortalisées *Tif1 γ ^{Lox/Lox}* délétées ou non pour TIF1 γ de façon stable, grâce à l'expression de la Cre recombinase. En accord avec les travaux de Sedgwick *et al.*, la perte de TIF1 γ induit un arrêt de croissance **transitoire** des cellules *Tif1 γ ^{-/-}* (données non publiées disponibles en « résultats supplémentaires »).

Cependant, ces cellules *Tif1 γ ^{-/-}* retrouvent une prolifération comparable aux cellules contrôles après quelques jours en culture. Ces cellules, ayant échappé à l'arrêt du cycle cellulaire, présentent de nombreuses anomalies mitotiques (centrosomes multiples et cytotérière anormale) associées à une forte diminution de l'expression protéique des substrats d'APC/C-cdc20 et des protéines impliquées dans la signalisation activatrice du SAC. De plus, ces cellules deviennent résistantes à l'arrêt du cycle cellulaire médié par des agents déstabilisant le fuseau mitotique, suggérant un défaut d'activation du SAC.

Nous avons ensuite utilisé un modèle cellulaire plus adapté à l'étude des conséquences de la perte de TIF1 γ sur le développement tumoral : les cellules épithéliales immortalisées NMuMG. Nous avons inactivé stablement TIF1 γ dans ces cellules par stratégie d'interférence à l'ARN (cellules TIF1 γ ^{KD}) et les avons transformées par transduction de vecteurs permettant l'expression des oncoprotéines HRAS^{V12} et 12S E1A. Les cellules NMuMG transformées TIF1 γ ^{KD} présentent de nombreuses altérations chromosomiques et nucléaires (chromosomes mal-alignés ou retardés sur la plaque métaphasiques en anaphase, multiples noyaux, ponts chromosomiques entre les cellules interphasiques...) et sont extrêmement résistantes aux agents déstabilisant le fuseau mitotique. En effet, 70 % des cellules TIF1 γ ^{KD} deviennent aneuploïdes après seulement 24 heures de traitement par de tels agents. De plus, ces cellules expriment très faiblement différentes protéines du SAC, les substrats d'APC/C-cdc20, ainsi que la protéine p21 et sont incapables d'activer la transcription de ce CKI après traitement par la colcémide.

Ces résultats **(1)** démontrent que la perte d'expression prolongée de TIF1 γ entraîne l'inactivation du SAC et **(2)** mettent en évidence l'inefficacité du point de contrôle post-mitotique permettant ainsi l'émergence d'une population polyploïde.

L'analyse de la clonogénicité et du potentiel tumorigène des NMuMG montre un fort accroissement des propriétés agressives des cellules TIF1 γ ^{KD} transformées associé à l'enrichissement de cellules présentant des défauts mitotiques. Enfin, l'étude de différentes tumeurs humaines, nous a permis de corrélérer la faible expression de TIF1 γ à la présence d'instabilité chromosomique, ainsi qu'à une augmentation du taux de mutation de p53.

C. Résultats complémentaires non publiés

Les résultats complémentaires concernant l'arrêt transitoire du cycle cellulaire suite à la perte de TIF1 γ sont indiqués en « données non montrées » dans la publication soumise, étant en accord avec la publication de Sedgwick *et al.* Les résultats concernant la modulation transcriptionnelle des gènes mitotiques sont préliminaires et ne sont pas intégrés à la publication, mais feront l'objet d'analyses plus approfondies pouvant déboucher sur une nouvelle publication.

1. Arrêt transitoire du cycle cellulaire suite à la perte de TIF1 γ

i. MEFs primaires

Nous avons analysé l'effet de la délétion de TIF1 γ dans des fibroblastes primaires *Tif1 γ ^{Lox/Lox}*, via leur transduction par un vecteur permettant l'expression de la Cre recombinase. Nous avons pu montrer que la perte de TIF1 γ induisait un arrêt de croissance dans les jours suivants la perte d'expression de TIF1 γ , associé à une faible augmentation du nombre de cellules en phases G2/M ou possédant un contenu en ADN supérieur à 4n, après marquage à l'iodure de propidium (**Figure 41A,B**). De plus, les MEFs primaires *Tif1 γ ^{-/-}* présentent une surexpression des protéines cibles de l'activité E3-Ubiquitine ligase d'APC/C-cdc20 (Cycline A et Cycline B1), ainsi que de la protéine BUBR1, acteur clé du point de contrôle du fuseau mitotique (**Figure 41C**). Ces résultats sont ainsi concordants avec l'activation du SAC et l'inhibition de l'activité E3-Ubiquitine ligase d'APC/C-cdc20 décrits suite à la perte de TIF1 γ dans les cellules HeLa (Sedgwick *et al.*, 2012). Nous avons également pu observer une forte proportion de cellules sénescents parmi les cellules délétées pour TIF1 γ (**Figure 41D**).

De façon intéressante, une récente étude décrit la capacité des cellules non transformées à entrer en sénescence suite à l'exposition prolongée à des agents ciblant l'actine ou la myosine, et inhibant ainsi la formation de l'anneau contractile responsable du processus de cytotérière. Cette sénescence intervient dans le but de limiter l'émergence d'une population polyploïde issue d'une division mitotique abortive (Panopoulos *et al.*, 2014). Il est ainsi tentant de spéculer que les MEFs primaires délétées pour TIF1 γ entrent en sénescence suite au blocage prolongé du cycle cellulaire induit par la perte d'activité ubiquitine ligase d'APC/C-cdc20 afin de prévenir la génération de cellules polyploïdes.

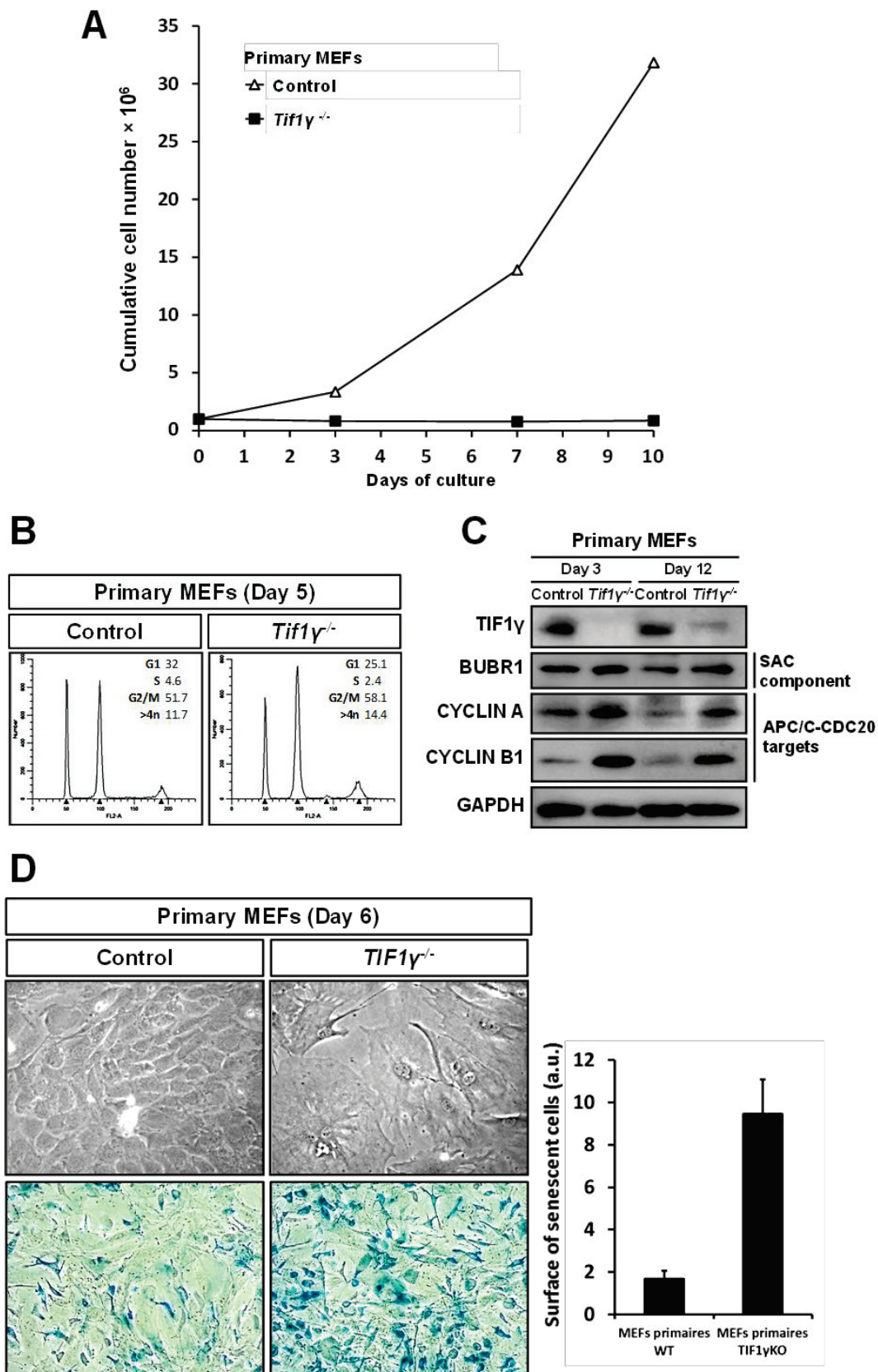


Figure 41 : La perte de TIF1γ entraîne, précocement, un blocage du cycle cellulaire en mitose associé à un arrêt de prolifération et à une augmentation de la sénescence dans les MEFs primaires.

A) Courbes de croissance de MEFs primaires contrôles et *Tif1γ*^{-/-}. B) Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium de MEFs primaires contrôles et *Tif1γ*^{-/-}. C) Analyse par western blotting de MEFs primaires contrôles et *Tif1γ*^{-/-}. D) Observation en contraste de phase et marquage β-galactosidase de MEFs primaires contrôles et *Tif1γ*^{-/-}.

ii. MEFs immortalisées

Les MEFs primaires contrôles et délétées pour TIF1 γ entrent ensuite rapidement en sénescence répllicative, comme cela est classiquement observé lors de la mise en culture de fibroblastes embryonnaires primaires (Xu, 2005). Cet arrêt du cycle cellulaire nous empêchant d'analyser l'effet à long terme de l'inactivation de TIF1 γ , nous avons immortalisé spontanément, par passages successifs (protocole 3T3), différentes lignées de MEFs primaires *Tif1 γ ^{Lox/Lox}*, afin d'obtenir plusieurs lignées immortalisées (**Figure 42**).

Divers types d'altérations génétiques (inactivation de p21, p19 et/ou p16) sont responsables de l'immortalisation (**Figure 42A**). Ceci nous permet d'analyser les conséquences à long terme de la perte de TIF1 γ dans plusieurs contextes génétiques. Les résultats suivants ont été obtenus de façon indépendante sur plusieurs lignées de MEFs.

Nous avons ensuite exprimé ou non la recombinaise Cre dans les MEFs immortalisées grâce à leur transduction par des vecteurs rétroviraux. Nous avons alors obtenu le même phénotype que celui obtenu sur les MEFs primaires : arrêt de prolifération (**Figure 42B**), blocage du cycle cellulaire en phase G2/M (**Figure 42C**), augmentation du nombre de cellules polyploïdes (**Figure 42C**), surexpression des substrats d'APC/C-cdc20 et des protéines du SAC (**Figure 42D**), et entrée en sénescence (**Figure 42E**).

Néanmoins, ce blocage du cycle cellulaire est transitoire. En effet, comme cela est décrit dans la publication précédente, après une vingtaine de jours en culture, les cellules délétées pour TIF1 γ échappent à l'arrêt de prolifération (**Figure 42B**), présentent une inhibition de l'expression des protéines du SAC associée à une diminution de leur sensibilité aux poisons du fuseau et accumulent de nombreuses altérations mitotiques telles que des centrosomes surnuméraires.

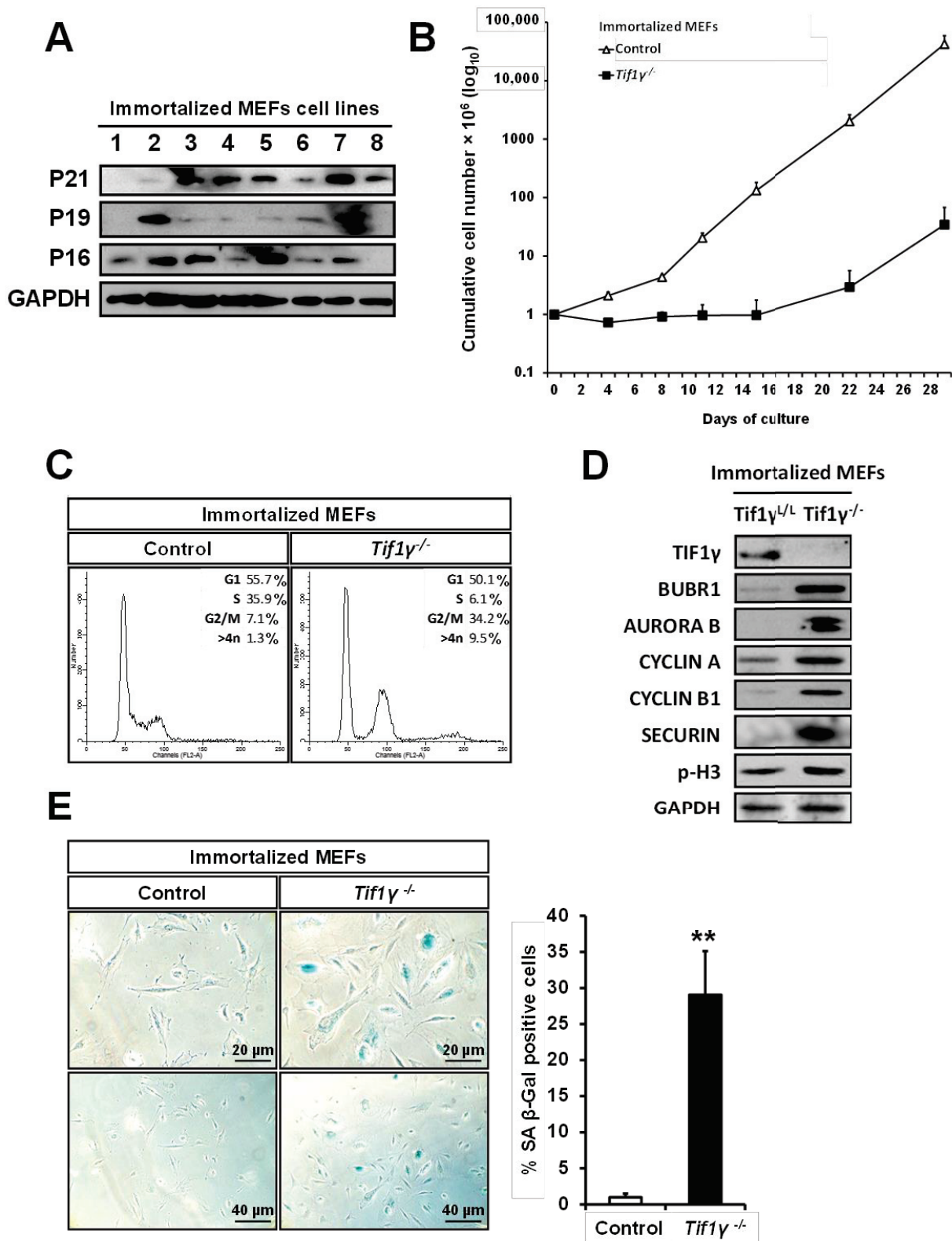


Figure 42 : La perte de TIF1 γ entraîne, précocement, un blocage du cycle cellulaire en mitose associé à un arrêt de prolifération et à une augmentation de la sénescence dans les MEFs immortalisées.

A) Analyse par western blotting de MEFs immortalisées *Tif1^{Lox/Lox}*. B) Courbes de croissance de MEFs immortalisées contrôles et *Tif1 γ ^{-/-}*. C) Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux après marquage à l'iodure de propidium de MEFs immortalisées contrôles et *Tif1 γ ^{-/-}*. D) Analyse par western blotting de MEFs immortalisées contrôles et *Tif1 γ ^{-/-}*. E) Marquage β -galactosidase de MEFs immortalisées contrôles et *Tif1 γ ^{-/-}*.

2. Modulation transcriptionnelle des gènes mitotiques

Compte tenu (1) du rôle de régulateur transcriptionnel de TIF1 γ , conservé par les différents membres de la famille TIF1 et (2) des résultats de notre analyse transcriptomique à grande échelle, nous avons décidé d'étudier dans nos différents modèles cellulaires (MEFs primaires, immortalisées et NMuMG transformées par HRAS^{V12} et 12S E1A), le niveau d'expression des gènes impliqués dans la mitose que nous avons précédemment mis en évidence *via* notre analyse à grande échelle par puce à ADN. Nous avons ainsi comparé l'expression de ces gènes mitotiques dans les cellules inactivées ou non pour TIF1 γ (**Figure 43**).

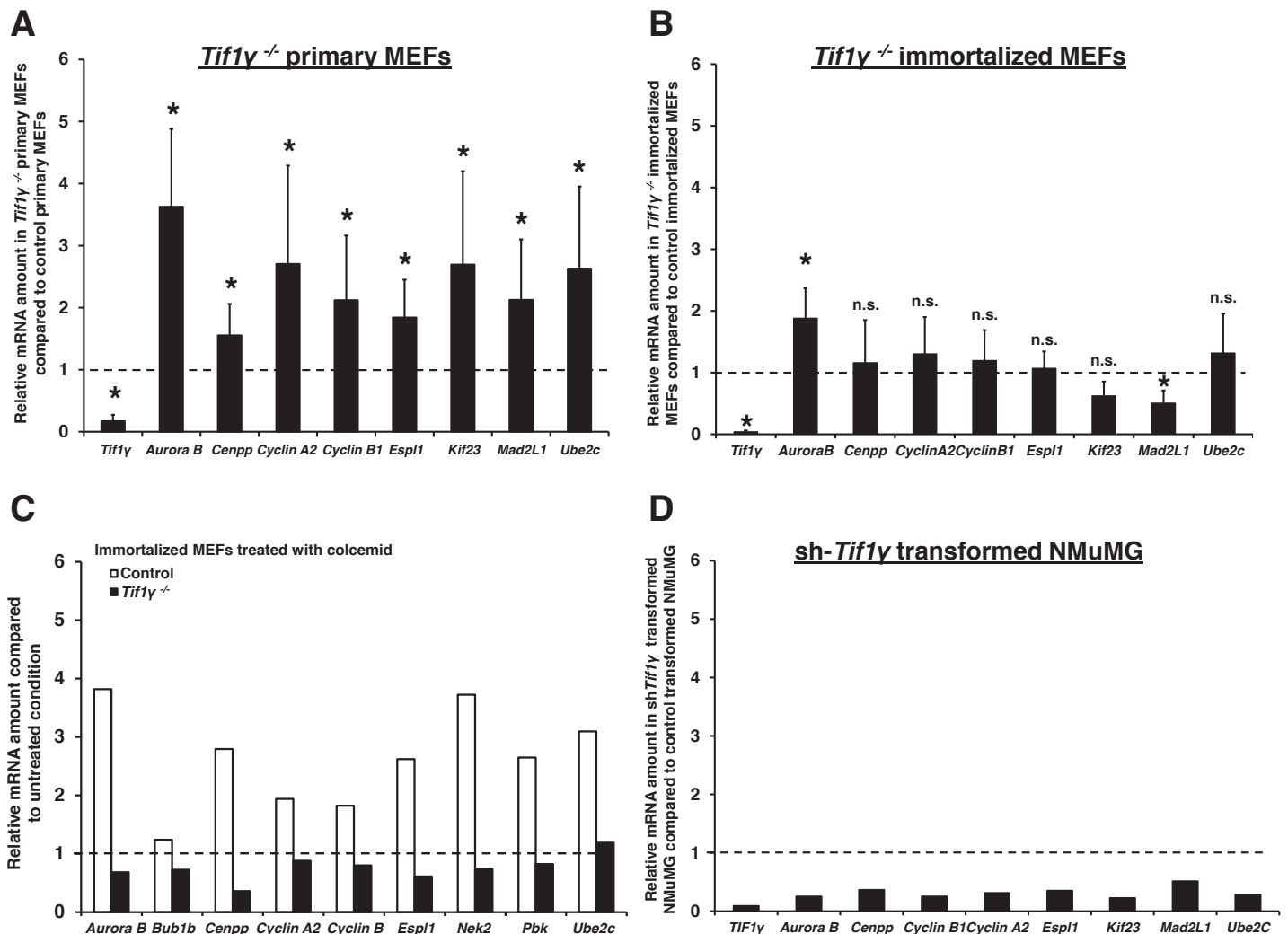


Figure 43 : Analyse transcriptionnelle par RT-qPCR de cellules inactivées pour TIF1 γ en comparaison des cellules contrôles.

A) MEFs primaires *Tif1*^{-/-}. B) MEFs immortalisées *Tif1*^{-/-}. C) MEFs immortalisées contrôles et *Tif1*^{-/-} traitées pendant 24 heures avec de la colcémide. D) NMuMG transformées *Tif1*^{KD}.

Comme attendu, les **MEFs primaires** délétées pour TIF1 γ présentent une surexpression de ces gènes, en accord avec nos résultats de puce à ADN et l'arrêt du cycle cellulaire observé dans ces cellules suite à la délétion, à court terme, de TIF1 γ (**Figure 43A**).

Les **MEFs immortalisées** ayant échappés au blocage du cycle cellulaire présentent, quant à elles, un taux de transcrits similaire à celui observé dans les cellules contrôles, en adéquation avec la reprise de la prolifération (**Figure 43B**). Après traitement par la colcémide, les cellules contrôles activent transcriptionnellement de nombreux gènes mitotiques, en accord avec le blocage efficace du cycle cellulaire en mitose que nous avons observé (**Figure 43C** et publication). Au contraire, les cellules délétées pour TIF1 γ sont incapables d'activer la transcription de ces gènes et sont moins sensibles au blocage du cycle cellulaire induit par ce traitement (**Figure 43C** et publication). Ainsi, les cellules échappant à l'arrêt du cycle cellulaire médié par la perte de TIF1 γ émergent en restaurant une expression génique « normale » en condition non traitée, mais deviennent, par conséquent, incapables d'initier l'activation transcriptionnelle associée à l'arrêt du cycle cellulaire en condition de stress mitotique.

Enfin, les cellules **NMuMG transformées** inactivées pour TIF1 γ présentent, cette fois-ci, une **inhibition de l'expression** de ces mêmes gènes mitotiques, en comparaison des cellules contrôles (**Figure 43D**).

De façon intéressante, comme illustré dans la publication originale, les NMuMG transformées TIF1 γ^{KD} présentent un cycle cellulaire identique aux cellules contrôles en condition non traitée, mais sont **très peu sensibles** aux traitements par des agents déstabilisant le fuseau mitotique (voir publication). En effet, lorsque ces cellules sont traitées par la colcémide ou le nocodazole, elles deviennent majoritairement aneuploïdes, ayant perdu toute capacité à stopper leur cycle cellulaire en réponse à des anomalies chromosomiques (voir publication). De plus, les cellules NMuMG sont décrites comme étant hétérozygotes pour le gène suppresseur de tumeur *p53* (Termén et al., 2013). Il est ainsi tentant de spéculer que l'atténuation du point de contrôle post-mitotique dans ce type cellulaire transformé permet l'émergence, suite à la perte de TIF1 γ , d'une population aux propriétés agressives présentant une inhibition transcriptionnelle constitutive de nombreux gènes mitotiques.

Pour résumer, la régulation transcriptionnelle des gènes mitotiques est directement corrélée avec le phénotype résultant de la perte de TIF1 γ (**Figure 43**) :

- 1) Dans les cellules présentant un **arrêt du cycle cellulaire** suite à l'inactivation de TIF1 γ , ces gènes sont **surexprimés** (MEFs primaires *Tif1 γ ^{-/-}*).
- 2) Dans les cellules ayant **échappé à l'arrêt du cycle cellulaire**, l'expression de ces gènes est **similaire** aux cellules contrôles (MEFs immortalisées *Tif1 γ ^{-/-}* « échappées »).
- 3) En condition de stress mitotique, ces mêmes cellules sont **moins sensibles** à l'arrêt du cycle cellulaire médié par le SAC et sont **incapables d'induire** l'expression de ces gènes (MEFs immortalisées *Tif1 γ ^{-/-}* « échappées » traitées par la colcémide).
- 4) Dans les **cellules transformées, prônes à l'instabilité chromosomique** *via* l'atténuation du point de contrôle post-mitotique, ces gènes sont **constitutivement inhibés** (NMuMG transformées TIF1 γ ^{KD}).

D. Discussion

Ces travaux ont permis de mettre en évidence une nouvelle fonction anti-tumorale de TIF1 γ *via* son rôle dans la progression mitotique. Dans cette étude, nous avons identifié les conséquences à long terme de l'inactivation de TIF1 γ , afin de mieux appréhender les évènements intervenant dans les conditions pathologiques *in vivo*. En effet, les précédents travaux de Sedgwick *et al.* s'étaient focalisés sur les effets à court terme de la délétion de TIF1 γ , ce, *via* l'utilisation d'une stratégie d'interférence à l'ARN transitoire (transfection par des siRNA).

L'inactivation à long terme de TIF1 γ nous a permis de mettre en évidence l'échappement des cellules au blocage du cycle cellulaire induit initialement par la perte de TIF1 γ . Cet échappement est associé à la diminution d'expression des gènes impliqués dans le point de contrôle du fuseau mitotique (BUBR1, BUB1, AURORA B et MAD2), ainsi que des différents substrats d'APC/C-cdc20 (Cycline A, Cycline B1 et Sécurine). Ces données suggèrent que les cellules déficientes pour TIF1 γ , à long terme, échappent au blocage du cycle cellulaire ***via* l'inactivation du point de contrôle du fuseau mitotique.**

Les cellules ayant échappé à cet arrêt du cycle cellulaire présentent de nombreuses altérations mitotiques et chromosomiques (centrosomes surnuméraires, chromosomes retardés sur la plaque métaphasique en anaphase, micronucléi...) et deviennent résistantes aux traitements par des agents déstabilisant les microtubules. Ce phénotype est cohérent avec une inactivation constitutive du point de contrôle du fuseau mitotique qui serait potentiellement à la base du processus d'échappement. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués dans celui-ci restent à élucider. L'étude de la cascade d'évènements entraînant l'inhibition du SAC permettrait de mieux appréhender le processus d'échappement mis en place par les cellules bloquées et ainsi de mieux définir les conséquences moléculaires de l'inactivation de TIF1 γ en tumorigenèse.

L'étude de Sedgwick *et al.* soutient l'hypothèse selon laquelle TIF1 γ serait un activateur d'APC/C-cdc20. Néanmoins, plusieurs arguments expérimentaux nous permettent de

considérer TIF1 γ plutôt comme un inhibiteur du SAC que comme un activateur d'APC/C-cdc20 :

- nos travaux et ceux de Sedgwick *et al.* démontrent que la perte de TIF1 γ entraîne une suractivation du SAC.
- nous avons mis en évidence que le mécanisme d'échappement au blocage du cycle cellulaire induit par la perte de TIF1 γ nécessite l'inhibition constitutive du SAC.
- nous avons également décrit la faible expression des différents substrats d'APC/C-cdc20 dans les cellules inactivées pour TIF1 γ ayant échappées à l'arrêt du cycle cellulaire, suggérant fortement la fonctionnalité de l'activité E3-Ubiquitine ligase de ce complexe.
- Sedgwick *et al.* ont pu mettre en évidence que :
 - l'interaction entre TIF1 γ et APC/C-cdc20 s'effectuait uniquement en présence d'un SAC actif.
 - APC/C-cdc20 exerçait son activité E3-Ubiquitine ligase en absence de TIF1 γ , si le SAC était satisfait ou inactivé (inhibition de BUBR1 par siRNA).

Ces différentes données indiquent **(1)** que la présence de TIF1 γ n'est pas indispensable à l'activité E3-Ubiquitine ligase du complexe APC/C-cdc20, **(2)** que la perte de TIF1 γ entraîne la suractivation du SAC et **(3)** que l'inhibition du SAC permet aux cellules inactivées pour TIF1 γ d'échapper à l'arrêt du cycle cellulaire. Nous émettons ainsi l'hypothèse selon laquelle l'inactivation d'APC-C/CDC20 en absence de TIF serait indirecte. En effet, tous les résultats obtenus convergent pour dire que TIF1 γ serait un inhibiteur du SAC dont la perte conduirait à une suractivation du point de contrôle du fuseau mitotique, un phénomène classiquement observé lors des processus de transformation tumorale, entraînant la mise en place de mécanismes d'échappement responsables de la génération de cellules aneuploïdes ([voir paragraphe I-C-2 concernant la surexpression des acteurs du SAC en carcinogénèse](#)).

L'émergence d'une population polyploïde en réponse aux agents déstabilisant le fuseau mitotique nous a également permis de mettre en évidence l'altération du point de contrôle post-mitotique. En effet, la défaillance du SAC entraîne la génération de cellules polyploïdes, classiquement éliminées par le point de contrôle post-mitotique, impliquant le gène suppresseur de tumeur *p53*. De façon intéressante, les cellules NMuMG sont

hétérozygotes pour ce gène, suggérant une forte propension à l'inhibition de ce point de contrôle. Nous avons pu mettre en évidence que les cellules NMuMG TIF1 γ ^{KD} présentaient une inhibition de l'expression protéique du CKI p21, cible transcriptionnelle directe de p53. De plus, tandis que les cellules contrôles activent la transcription de p21, en réponse à un traitement par la colcémide, les cellules TIF1 γ ^{KD} sont incapables d'induire transcriptionnellement ce CKI, suggérant une perte de fonction de p53. Il est ainsi tentant de spéculer que l'inactivation du point de contrôle post-mitotique constitue une seconde sélection dans le processus de transformation tumorale médiée par la perte de TIF1 γ , permettant ainsi l'émergence de cellules aux propriétés très agressives, caractérisées par une forte instabilité chromosomique. L'analyse de diverses tumeurs humaines appuie cette hypothèse : nous avons pu corrélérer la faible expression de TIF1 γ à une augmentation de l'instabilité chromosomique, ainsi qu'à une forte fréquence de mutation du gène *p53*. Enfin, cette instabilité chromosomique, issue de la perte de fonction de ces deux points de contrôle du cycle cellulaire, va favoriser l'apparition de nouvelles altérations génétiques pouvant affecter des gènes aux propriétés pro- ou anti-oncogéniques et ainsi, accentuer le processus de transformation tumorale.

Il est important de noter que les effets pro-tumoraux induits par l'inactivation de TIF1 γ résultent d'une sélection positive des cellules ayant la capacité d'outrepasser les effets délétères initiaux de la perte de TIF1 γ . Ceci est en adéquation avec de nombreux autres mécanismes pro-tumoraux, induisant, de façon précoce, un arrêt de prolifération tel que l'échappement à la sénescence induite par un stress oncogénique (Larsson, 2011; Murakami et al., 2007). De plus, les multiples exemples de suractivation de protéines du SAC dans les processus de transformation tumorale (voir paragraphe I-C-2 sur la surexpression des protéines du SAC en carcinogénèse) appuient l'hypothèse selon laquelle la perte de TIF1 γ pourrait médier la tumorigénèse en entraînant diverses anomalies chromosomiques malgré l'intervention initiale d'un blocage du cycle cellulaire.

Nous faisons ainsi l'hypothèse que la perte d'expression de TIF1 γ observée dans de nombreuses tumeurs humaines favoriserait, dans les **phases précoces** de la transformation tumorale, l'émergence de cellules aux propriétés agressives en

sélectionnant positivement les cellules prônes à l'**instabilité chromosomique** *via* l'inactivation des points de contrôle de la mitose (**Figure 44**).

L'expression de TIF1 γ pourrait ainsi servir de **marqueur prédictif à la réponse aux agents chimiothérapeutiques** ciblant les microtubules (taxanes, vinca-alcaloïdes...). En effet, nos résultats, ainsi que les données bibliographiques, indiquent la survenue de résistances à ces traitements pour les cellules présentant des altérations des points de contrôle mitotiques (voir paragraphe I-C-3 sur l'implication du SAC en carcinogénèse - stratégies thérapeutiques). Enfin, en remettant cette étude en perspective avec nos travaux concernant le rôle de TIF1 γ sur l'**inhibition de l'EMT** médiée par le TGF β , nous pouvons faire l'hypothèse que les cellules transformées par la perte de TIF1 γ puissent également acquérir, dans les **phases plus tardives** de tumorigénèse, des **propriétés invasives** favorisant leur **dissémination métastatique** (**Figure 44**). De façon intéressante, il a été démontré que l'induction de l'EMT par la surexpression du facteur Twist1 était associée à un fort taux d'instabilité chromosomique, et inversement, que l'instabilité chromosomique était corrélée à une forte expression des marqueurs d'EMT (Mironchik et al., 2005; Roschke et al., 2008; Zhang et al., 2008). Ainsi, ces deux processus pro-tumoraux, engendrés par la perte de TIF1 γ , peuvent coopérer afin d'accroître le potentiel tumorigène des cellules cancéreuses.

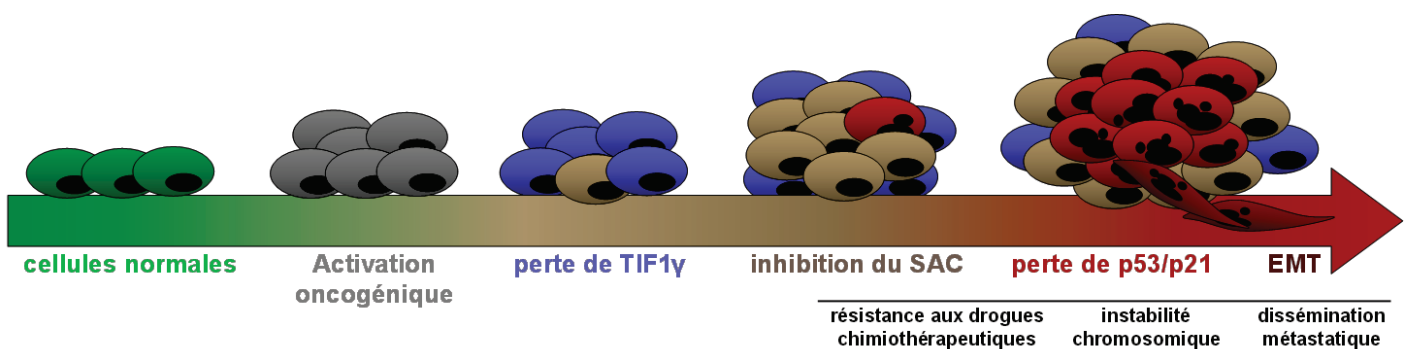


Figure 44 : Modèle intégratif du rôle de TIF1 γ au cours de la transformation et de la progression tumorale.

E. Publication originale

TIF1 γ -Deficiency Promotes Mitotic Chromosomal Instability and Tumor Progression.

Roxane M. Pommier*, Johann Gout*, David F. Vincent, Vanessa Arfi, Lindsay B. Alcaraz, Nicolas Chuvin, Sylvie Martel, Bastien Kaniewski, Guillaume Devailly, Geneviève Fourel, Pascal Bernard, Caroline Moyret-Lalle, Stéphane Ansieau, Alain Puisieux, Ulrich Valcourt, Stéphanie Sentis, Laurent Bartholin.

Soumis

* co-premiers auteurs

TIF1 γ -Deficiency Promotes Mitotic Chromosomal Instability and Tumor Progression

Roxane M. Pommier^{1,2,3,4,5,9}, Johann Gout^{1,2,3,4,5,9}, David F. Vincent^{1,2,3,4,5,6}, Vanessa Arff^{1,2,3,4,5}, Lindsay B. Alcaraz^{1,2,3,4,5}, Nicolas Chuvin^{1,2,3,4,5}, Sylvie Martel^{1,2,3,4,5}, Bastien Kaniewski^{1,2,3,4,5}, Guillaume Devailly^{1,2,3,4,5}, Geneviève Fourel^{1,2,3,4,5}, Pascal Bernard⁸, Caroline Moyret-Lalle^{1,2,3,4,5,7}, Stéphane Ansieau^{1,2,3,4,5}, Alain Puisieux^{1,2,3,4,5,7}, Ulrich Valcourt^{1,2,3,4,5}, Stéphanie Sentis^{1,2,3,4,5,7}, Laurent Bartholin^{1,2,3,4,5, ‡}

¹ Inserm U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France

² CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France

³ Université de Lyon, F-69000 Lyon, France

⁴ Université Lyon 1, F-69000 Lyon, France

⁵ Centre Léon Bérard, F-69000 Lyon, France

⁶ Current address: Beatson Institute of Cancer Research, Switchback Road, Glasgow G61 1BD, UK

⁷ Université Lyon 1, ISPB, Faculté de Pharmacie de Lyon, F-69000 Lyon, France

⁸ Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, CNRS UMR 5239, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France, F-69364

⁹ Co-first authors

‡ Corresponding author: Dr. Laurent Bartholin

email : laurent.bartholin@lyon.unicancer.fr

phone : +33 (0)4 78 78 28 63 fax : +33 (0)4 69 96 68 26

Bât Cheney A – 5ème étage UMR INSERM 1052 - CNRS 5286 Centre Léon Bérard

28, rue Laënnec 69373 LYON Cedex 08 FRANCE

RUNNING TITLE: TIF1 γ is a tumor suppressor through its role in mitosis

CHARACTERS:

ABSTRACT

Transcriptional Intermediary Factor 1 gamma (TIF1 γ) is a ubiquitous nuclear factor involved in development and differentiation processes. *TIF1 γ* is also a tumor suppressor whose mechanism of action in cancer has remained elusive. In the present study, we observed that cells with a stable inactivation of TIF1 γ accumulated nuclear defects. At the molecular level, we demonstrated that this phenotype was a consequence of both attenuated spindle activation checkpoint (SAC) and post-mitotic checkpoint in TIF1 γ -deficient cells, which can complete abnormal mitosis and enter in a new round of cell cycle division. Notably, TIF1 γ -deficient cells are less sensitive to spindle poisons. We have also evidenced *in vitro* (migration assay in Boyden chambers and growth in soft agar) and *in vivo* (xenografts injected into chicken chorioallantoic or *Nude* mice) that TIF1 γ -deficient cells displayed increased abnormal mitosis and aggressiveness properties. Finally, we reported that decreased TIF1 γ expression in human tumors was correlated with increased rate of genomic rearrangements. In conclusion, the present study sheds light on the tumor suppressive mechanism of TIF1 γ through its role in chromosomal stability maintenance.

INTRODUCTION

Transcriptional Intermediary Factor 1 gamma (TIF1 γ /TRIM33/RFG7/PTC7/Ectodermin) belongs to the evolutionarily conserved TIF1 family of nuclear factors. TIF1 proteins are involved in many biological processes such as stemness, embryonic development and tumor suppression (1). The four identified members that compose this family (TIF1 α /TRIM24, TIF1 β /TRIM28, TIF1 γ /TRIM33 and TIF1 δ /TRIM66) share the TSS (TIF1 Signature Sequence) domain (2). These proteins are also characterized by several chromatin interaction domains, including B-boxes, coiled-coil domains, Plant HomeoDomains (PHD), and bromodomains. The TIF1 proteins are also defined by the presence of a RING domain with E3 ubiquitin ligase activity and belong to the TRIM protein superfamily (TRIPartite Motif). TIF1 γ whose activity and stability can be regulated by ubiquitination (3) and sumoylation (4), has been shown to be involved in different biological functions such as embryonic development (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11), hematopoietic differentiation (12, 13, 14, 15, 16, 17), DNA repair (18), cell cycle regulation (19) and immune response (20, 21, 22). At the molecular level, TIF1 γ is involved in chromatin remodeling and subsequent transcription modulation (3, 11, 12, 18, 23, 24, 25). Depending on the cellular context, TIF1 γ has been described as a potent modulator of the Transforming Growth Factor β (TGF β), acting either as a negative regulator (7, 24, 26-28) or a positive regulator of the pathway (20, 23, 29).

TIF1 γ is a tumor suppressor gene as supported by several evidences. Indeed, chromosomal rearrangements have been observed in the 1p13 locus containing *TIF1 γ* gene in carcinomas (30-34), in hematopoietic neoplasia (35), in embryonic tumors (36), in conjunctive tissue tumors (37) and in nervous central system tumors (38, 39). Moreover, decreased TIF1 γ expression was reported in different types of tumors. Indeed, *TIF1 γ* expression is down-regulated in human pancreatic ductal adenocarcinomas (40), in human breast tumors (28), in human non-small cell lung cancers (41) and HepatoCellular Carcinomas (HCC) (42). Point mutations have not been described so far, possibly because epigenetic silencing may be responsible for *TIF1 γ* down-regulation, as described in about 35% of human Chronic MyeloMonocytic Leukemia (CMML) patients (43). In these tumors, *TIF1 γ* is

epigenetically silenced through promoter DNA methylation and treatment of patient-derived cells with a demethylating agent is sufficient to restore its expression. Additionally, mouse models demonstrated the causal role of loss of *Tif1 γ* in tumor progression. Indeed, we developed a genetically engineered mouse model which allowed us to demonstrate that conditional inactivation of *Tif1 γ* could facilitate *Kras*-induced pancreatic carcinogenesis (40). The tumor suppressive role of TIF1 γ was next confirmed by other groups in mouse models of cancers such as CMML (43) and HCC (44). Finally, the closest family members of TIF1 γ , *i.e.*, TIF1 α and TIF1 β , have also been reported to behave as tumor suppressors, their hepatocyte-specific inactivation in mice resulting in HCC formation (44, 45).

Despite recent advances in understanding the function of TIF1 γ , little is known about the biological functions that are responsible for its tumor suppressive role. We and others have proposed that the tumor suppressive function of TIF1 γ could result from its capacity to inhibit Transforming Growth Factor Beta (TGF β)-induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) ((28, 42, 46, 47). However, we have also demonstrated in a transgenic mouse model of pancreatic cancer that the regulation of EMT by TIF1 γ could not fully explain its tumor suppressive effect (46), thus indicating that TIF1 γ was able to regulate other oncosuppressive biological functions. Recently, a novel function for TIF1 γ during mitosis progression was identified (19). Mitotic progression relies on activation of the Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) associated with the CDC20 protein, which promotes the segregation of sister chromatids and the mitotic exit once chromosomes are correctly attached. This process is dependent upon the Spindle Assembly Checkpoint (SAC) inactivation. SAC is a conserved mechanism in eukaryotes, which surveys the attachment of chromosomes to the mitotic spindle during the early steps of mitosis (48, 49). This monitoring system is activated by defective kinetochore-to-microtubules attachments, and, in response, delays anaphase onset by inhibiting APC/C. This inhibitory effect is mediated by the assembly of the Mitotic Checkpoint Complex (MCC) composed of BUBR1, BUB3 and MAD2, which prevents substrate recruitment by the APC/C. When all chromosomes achieve bipolar attachment, the spindle checkpoint is silenced; the MCC is disassembled and APC/C-CDC20 triggers anaphase onset. When the SAC is satisfied, APC/C-CDC20 turn into an active ubiquitin-ligase complex that allows the segregation of sister chromatids and the mitotic exit through proteasome-mediated degradation of SECURIN, CYCLIN B1 and CYCLIN A. Sedgwick *et al.* showed that TIF1 γ was a

component of the APC/C-CDC20 (19). They reported that transient inactivation of TIF1 γ in HeLa cells lead to a blockade of cells in metaphase as a result of sustained spindle checkpoint activation. However, this study did not address a functional relationship between the role of TIF1 γ in regulating cell division and its role in tumor progression. Besides, spindle checkpoint activation and mitotic arrest after *Tif1 γ* inactivation cannot explain the tumor suppressive role of TIF1 γ that we and others have previously reported (40, 43, 44).

In the present study, we investigated the consequences on cell behavior of prolonged TIF1 γ inactivation (*Tif1 γ* ^{-/-}-immortalized MEFs and *shTif1 γ* HRAS^{V12}/E1A-transformed NMuMG), better mimicking the *in vivo* situation found in tumors. Hence, contrasting with transient *Tif1 γ* inactivation, we demonstrated *in vitro* and *in vivo*, that prolonged inactivation of TIF1 γ caused the accumulation of mitotic defects leading to chromosomal instability characterized by increased aneuploidy and chromosome rearrangements, which are associated with the acquisition of more aggressive properties. In addition, we confirmed the positive correlation between low levels of TIF1 γ and increased chromosomal instability in human tumors. In all, the present work demonstrates that loss of TIF1 γ results in increased tumor aggressiveness, by favoring chromosomal instability.

RESULTS

Prolonged inactivation of *Tifl γ* in mouse embryonic fibroblasts results in accumulation of nuclear abnormalities and inactivation of the spindle checkpoint

In an effort to understand the long-term consequences on cell proliferation resulting from *Tifl γ* inactivation, we generated immortalized Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) harboring a homozygous deletion for *Tifl γ* (6, 40). For that, we first immortalized control- and *Tifl γ ^{ΔΔ}* MEFs lines according to a classical 3T3 protocol. These cells were further transduced by a retrovirus expressing the Cre recombinase. We observed that the inactivation of *Tifl γ* in immortalized MEFs rapidly resulted in impaired cell proliferation characterized by a decreased capacity of *Tifl γ* -deficient MEFs to progress through mitosis as illustrated by their accumulation in G2/M phase of the cell cycle and the elevated amount proteins involved in mitosis arrest (data not shown). This observation is in total agreement with the aforementioned results obtained by Sedgwick *et al.* after transient inactivation of *Tifl γ* in HeLa cells (19). Interestingly, proliferation of *Tifl γ ^{-/-}*-immortalized MEFs rapidly resumes growing at the same rate as control cells (**Figure 1A**). Cell cycle analysis of control- and *Tifl γ ^{-/-}*-immortalized MEFs by flow cytometry using propidium iodide DNA staining, revealed an identical distribution of cells in G1, S, G2/M phases and >4n DNA in both cell lines (**Figure 1B**). Despite the equivalent proliferation rate and an identical distribution of the cells in the different phases of the cell cycle, cytological analyses of *Tifl γ ^{-/-}*-immortalized MEFs revealed severe mitotic abnormalities. Immunofluorescence staining of γ -TUBULIN, showed that *Tifl γ ^{-/-}*-immortalized MEFs presented an increased proportion of cells with more than 2 centrosomes compared to control cells (44.8% vs. 17.4%) (**Figure 1C**). Immunofluorescence staining of α -TUBULIN showed that this centrosome amplification was associated with multi-polar spindles along with cytokinesis defects (**Figure 1D**). We then performed western blots experiments, which revealed a clear decrease, in *Tifl γ ^{-/-}*-immortalized MEFs, of steady state levels of CYCLIN A, CYCLIN B1 and SECURIN accordingly to an increased activity of the APC/C-CDC20 complex (**Figure 1E**). BUBR1 expression, a major component of the SAC was also found down regulated in the absence of TIF1 γ , evocating an attenuated spindle checkpoint. Altogether, these results indicate that sustained inactivation of *Tifl γ* in MEFs results in the accumulation of nuclear

abnormalities associated with increased APC-C/CDC20 activity as a result of SAC inactivation. We next tested whether the increase of nuclear defects after long term ablation of *Tif1γ* did result from SAC inactivation. For that, we performed experiments using colcemid and nocodazole, two spindle microtubule-disrupting agents that both trigger the spindle checkpoint. As expected, flow cytometry analysis revealed that control MEFs accumulated in G2/M in the presence of these poisons (78.1% with colcemid; 63.8% with nocodazole) (**Figure 2A**). In contrast, *Tif1γ*^{-/-}-immortalized MEFs were significantly less sensitive to colcemid and nocodazole as illustrated by the decreased proportion of cells blocked in G2/M phase (62.4% with colcemid; 55,6% with nocodazole) (**Figure 2A**). The compromised capacity of *Tif1γ*^{-/-}-immortalized MEFs to arrest in mitosis in response to spindle poisons was confirmed by the reduced accumulation of the mitotic marker phosphorylated Serine-10 HISTONE H3 (p-H3S10) in the presence of colcemid and visualized by western blotting (**Figure 2B**) and immunofluorescence (**Figure 2C**). Toluidine blue staining and subsequent quantification of multinuclei, revealed an increased percentage of multinucleated *Tif1γ*^{-/-}-immortalized MEFs treated with colcemid or nocodazole (**Figure 2D**). Altogether, these results show nuclear defects accumulating after treatment with spindle poisons in immortalized MEFs with a stable long term inactivation of *Tif1γ* demonstrating that these mutant cells are prone to inactivate the SAC.

Inactivation of *Tif1γ* in epithelial transformed NMuMG cells results in severe ploidy defects

In order to better understand the functional consequences of long term TIF1γ inactivation in cancer, we extended our work in an amenable cellular model to address this question in tumor progression. To that end, we used Normal Murine Mammary Gland (NMuMG) epithelial cells. We next generated control-transformed NMuMG cells (stably expressing HRAS^{V12} and E1A oncogenic proteins) and sh*Tif1γ*-transformed NMuMG cells (stably expressing HRAS^{V12}, E1A and a shRNA targeting *Tif1γ*). The expression of HRAS^{V12} and E1A oncoproteins, along with the extinction of endogenous expression of TIF1γ were validated by Western blotting experiments (**Figure 3A**). Cell counting over a 6-day period revealed a similar growth rate between control- and sh*Tif1γ*-transformed NMuMG cells (**Figure 3B**). We next investigated whether the absence of Tif1γ resulted in mitotic defects as we observed in immortalized MEFs. DAPI staining revealed that the shape and the size of nuclei were very heterogeneous in sh*Tif1γ*-transformed NMuMG cells compared to control cells (**Figure 3C**). We next

sought to finely characterize the nuclear defects that accumulate in the absence of TIF1 γ . Co-staining of nuclei and cortical actin revealed a significant increase of chromosomal abnormalities in sh*Tif1 γ* -transformed NMuMG such as misaligned chromosomes (0.22% vs. 0.03%), lagging chromosomes (0.50% vs. 0.03%), chromatin bridges (4.90% vs. 0.54%), multinucleated cells (6.10% vs. 1.17%) and micronuclei (9.23% vs. 3.60%) (**Figure 3D**). Note that the proportion of cells in mitosis is similar in control- and sh*Tif1 γ* -transformed NMuMG (5.53% vs. 4.74%) (**Figure 3D**). Altogether, these results demonstrate, as we observed in immortalized MEFs that transformed NMuMG cells display many mitotic abnormalities and accumulate nuclear defects in the absence of TIF1 γ .

We next investigated whether the nuclear abnormalities described above were associated with a compromised capacity for the cells to arrest in mitosis in the presence of spindle poisons. As observed after toluidine blue staining in MEFs, a higher proportion of abnormal nuclei in sh*Tif1 γ* -transformed NMuMG was observed compared to control cells after nocodazole treatment (70.3% vs. 28.2%) (**Figure 4A**). Noteworthy that sh*Tif1 γ* -transformed NMuMG present a more elevated rate of abnormal nuclei even in absence of nocodazol treatment (20.9% vs. 5.3%) (**Figure 4A**). Flow cytometry analysis showed that untreated sh*Tif1 γ* -transformed NMuMG displayed a higher steady state number of cells with a >4n DNA content compared to control cells (10.7% vs. 5.7%) (**Figure 4B**). This result is consistent with the large nuclei observed after DAPI staining (Figure 3C), a phenotype classically associated with polyploidy (50, 51). The absence of Tif1 γ also severely compromised the capacity of these cells to arrest in G2/M phase in response to colcemid (29.6% vs. 67.9%) and nocodazole (29.2% vs. 68.5%) (**Figure 4B**). Interestingly, in the presence of spindle poisons, sh*Tif1 γ* -transformed NMuMG accumulate as a significant polyploid cell population with a >4n DNA content. In accordance with a compromised capacity to arrest in mitosis, we observed that depletion of TIF1 γ resulted in (i) a significant decreased of the steady state level of mitotic marker p-H3S10 along with decreased levels of CYCLIN A, CYCLIN B1 and SECURIN, which are targets of the APC/C-CDC20 complex; (ii) a reduced expression of SAC components such as BUBR1, BUB1 and AURORA B. (iii) that the colcemid-induced accumulation of BUBR1, BUB1 and AURORA B (SAC components), p-H3S10 (Aurora B target) and CYCLIN A, CYCLIN B1 and SECURIN (APC/C-CDC20 targets) was less pronounced in sh*Tif1 γ* -transformed NMuMG cells (**Figure 4C**). These observations are evocative of a sustained APC-C/CDC-20 activity as a result of SAC inactivation after prolonged TIF1 γ inactivation. We have also reported

that γ -TUBULIN expression was significantly increased in sh*Tif1 γ* -transformed NMuMG cells (**Figure 4C**) consistent with the supernumerary centrosomes we observed in *Tif1 γ* ^{-/-}-immortalized MEFs (Figure 1C). Finally, western blot analyses also revealed that the level of the cyclin-kinase inhibitor p21/WAF1/CIP1, at the steady state or after colcemid treatment, was reduced in the absence of TIF1 γ (**Figure 4C**). This latter point evokes an attenuated post-mitotic checkpoint (also known as tetraploid checkpoint). This failsafe program depending on the p53/p21 pathway, blocks cells in G1 phase and eliminates cells with aberrant chromosome numbers or chromosome abnormalities resulting from segregation errors, thus guaranteeing the integrity and the equal repartition of the genetic material between daughter cells (52-55). Reporter assays with a plasmid containing the luciferase gene driven by *p21* promoter transiently transfected in control-transformed NMuMG cells revealed that colcemid could increase luciferase expression (**Figure 4D**). This observation is consistent with an efficient activation of the p53/p21 post-mitotic checkpoint. Conversely, sh*Tif1 γ* -transformed NMuMG cells transiently transfected with the *p21* reporter presented a 2-fold decrease of the steady state luciferase expression and did not respond to colcemid (**Figure 4D**). This suggests that p53/p21 pathway is impaired in sh*Tif1 γ* -transformed NMuMG. Taken together, these results demonstrate that sustained *Tif1 γ* -inactivation in transformed-NMuMG favors SAC inactivation and attenuated post-mitotic checkpoint resulting in the accumulation chromosomal instability and ploidy defects.

Increased aggressiveness of *Tif1 γ* -deficient transformed NMuMG cells

Genomic instability plays an important role both in cancer development and in the response to therapies. Hence, we sought to determine whether the absence of TIF1 γ could modulate the transforming and tumorigenic properties of transformed NMuMG cells. RAS and E1A were reported to constitute an inefficient oncogenic combination and loss of p21 was shown to significantly cooperate with these two oncoproteins in promoting cell transformation (56-58). In support of our hypothesis, depletion of TIF1 γ that is associated with decreased p21 expression (Figure 4C and 4D) enhanced the transformation potential of the cell line, as exemplified by their loss of contact growth inhibition (**Figure 5A**) and the increased number and size of colonies observed in a soft agar colony assay (**Figure 5B**). Furthermore, TIF1 γ depletion was found to drastically accelerate tumor growth when transformed NMuMG cells were either injected into chicken chorioallantoic membranes (CAM) (**Figure 5C**) or subcutaneously

engrafted into *Nude* mice (**Figure 5D**). Finally, histological analysis demonstrated a significant increase in the proportion of abnormal mitosis in tumors arising from sh*Tif1γ*-transformed NMuMG cells compared to control-transformed NMuMG cells (57.7% vs. 28.6%) (**Figure 5E**), indicating that sh*Tif1γ*-transformed NMuMG-derived tumors grow faster with a higher index of chromosomal instability. Altogether, these data demonstrate that TIF1γ depletion cooperates with oncogenic HRAS^{V12} and E1A proteins in promoting tumor progression by facilitating chromosomal instability.

Down-regulation of *TIF1γ* in human tumors is correlated with increased chromosomal rearrangements

We next addressed the clinical relevance of *Tif1γ* down-regulation in human tumors, in which the chromosomal abnormalities are classically associated with quantifiable chromosomal rearrangements (deletions, insertions, duplications and complex multi-site variants) collectively termed Copy Number Variation (CNV) (59). We first examined in the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE), the CNV in cancer cell lines (n=990) from different organs according to the expression level of TIF1γ (**Figure 6A, upper panel**). Our analysis revealed that human cell lines with a “low” expression of *TIF1γ* presented an increased CNV compared with cells with an “intermediate” or a “high expression” of *TIF1γ* (**Figure 6A, lower panel**). Since the 1p13 locus, which contains *TIF1γ*, was previously reported to be deleted in some of human breast tumors (33, 34, 60), and because NMuMG cell line is of mammary origin, we decided to focus our genetic analysis on human breast tumor. We examined in The Cancer Genome Atlas (TCGA), the CNV in human primary breast tumors (n=131) according to the expression level of *TIF1γ* (**Figure 6B, upper panel**) and observed that tumors with the lowest level of *TIF1γ* were those with the highest CNV (**Figure 6B, middle panel**). Interestingly, low expression level of *TIF1γ* was found to be associated with an increased rate of *TP53* mutations (**Figure 6B, lower panel**). The correlation between low expression of *TIF1γ* and increased CNV was confirmed in a third type of cancer cell lines, *i.e.* Clear Cell Renal Cell Carcinomas (CCRCC) (n=406) (**Figure 6C**). Next, we analyzed human ColoRectal Carcinomas (CRC), which are characterized by their high rate of CNV and can be divided into two groups depending on the nature and origin of their genomic instability (61). The first group is represented by Microsatellite INstability (MIN) tumors (15% of CRC), which are characterized by microdeletions and microduplications of dinucleotide or trinucleotide repeats

(microsatellites) at specific polymorphic sites in the genome. MINs are classically considered to present a hyper-mutated phenotype due to inherited mutations in mismatch DNA repair genes (62, 63). The second group is represented by Chromosomal INstability (CIN) tumors (85% of CRC), which are characterized by large genomic deletions/amplifications, chromosomal translocations and aneuploidy. CINs are classically considered to present a hypo-mutated phenotype (compared to MINs) and occur as a consequence of conserved chromosome segregation errors (62, 64). Analysis of TCGA colorectal tumors (n=202) revealed that MIN (n=30, hyper-mutated tumors with >500 mutations) and CIN (n=172, hypo-mutated tumors with <500 mutations) respectively represented 14.8% and 85.2% of all colorectal tumors, a proportion in accordance with the literature (**Figure 6D, upper pie chart**). While a very small proportion of MIN tumors (3%) displayed a deleted *TIF1 γ* locus, this proportion significantly increased in CIN tumors (23%) (**Figure 6D, upper pie chart**). In support of this observation, a large majority of tumors with a deleted *TIF1 γ* locus (n=41) had a CIN phenotype (98%), while this percentage significantly dropped (82%) when the *TIF1 γ* locus is intact (n=161) (**Figure 6D, lower pie chart**). These data clearly indicate that genomic deletion of *TIF1 γ* in CRC is preferentially associated with the CIN phenotype. Altogether, genetic analysis of human tumors revealed that the loss of *TIF1 γ* was associated with increased rate of chromosomal rearrangements, likely resulting from segregation errors due to an impaired spindle checkpoint and an attenuated p53/p21-dependent post-mitotic checkpoint.

DISCUSSION

In the present study, we demonstrated *in vitro* and *in vivo* that stable *Tif1 γ* -deficiency resulted in sustained APC-C/CDC20 activity as a result of SAC inactivation, the accumulation of chromosomal abnormalities and increased tumor aggressiveness. This work highlights an original mechanism by which TIF1 γ behaves as a tumor suppressor through its role in the maintenance of genomic stability, a major tumor suppressive function.

Anaphase onset is triggered by the Anaphase Promoting Complex/Cyclosome (APC/C) associated with the CDC20 protein, which induces the proteasome-mediated destruction of CYCLIN A, CYCLIN B1 and SECURIN (48, 49). The proteolysis of SECURIN releases active SEPARASE, which cleaves COHESIN thereby eliminating sister-chromatid cohesion and triggering the segregation of sister chromatids to the opposite poles of the mitotic spindle. In a recent study, Sedgwick *et al.* demonstrated that TIF1 γ was important for progression of HeLa cells through mitosis by activating APC/C (19). They reported that transient inactivation of TIF1 γ could lead to extended mitotic blockade and accumulation of cells in mitosis as a result of sustained spindle assembly checkpoint activation. Supporting their findings, we have also observed that short term inactivation of TIF1 γ in different cell types (primary MEFs, HepG2 cells, HEK 293T cells) resulted also in sustained spindle checkpoint activation leading to cell cycle arrest and metaphase blockade (data not shown). However, this immediate consequence of TIF1 γ inactivation resulting in prolonged spindle checkpoint activation (associated with proliferation arrest), is hard to conciliate with the tumor suppressive effect described by us and others (40, 43, 44). Then, to further analyze the role of TIF1 γ in cell proliferation, and decipher its physio-pathological relevance, we investigated the consequences of prolonged TIF1 γ inactivation (*Tif1 γ* ^{-/-}-immortalized MEFs and *shTif1 γ* HRAS^{V12}/E1A-transformed NMuMG cells), better mimicking the *in vivo* situation found in tumors. We observed that these cells with stable long term inactivation of *Tif1 γ* proliferated at the same rate as control cells (Figures 1A and 3C), accumulated mitotic abnormalities (Figures 1C, 1D, 3D). Indeed, the sustained absence of TIF1 γ was found associated with hallmarks of SAC inactivation (i) a decreased steady state of APC/C-CDC20 targets (CYCLIN B1, SECURIN) and SAC components (BUBR1, BUB1, AURORA B) (Figures 1E and 4C) and (ii) an increased resistance to spindle poisons (colcemid or nocodazole) which normally induced G2/M arrest (Figures 2A and 4B). Contrasting with

NMuMG cells, it is interesting to underline the fact that we did not see obvious accumulation of cells with a >4n DNA content in immortalized MEFs (Figure 1B and 2A), potentially because these cells are not fully transformed and retained other active safeguard mechanisms preventing the onset of a prominent aneuploidy cells population. These *in vitro* experiments indicate that cells with a stable inactivation of TIF1 γ display a high APC-C/CDC20 activity most likely as a result of SAC inactivation, and predisposing them complete abnormal mitosis and further accumulate nuclear defects. *In vivo*, we showed that tumors arising from *Tif1 γ* -deficient transformed NMuMG cells engrafted into *Nude* mice presented an increased number of aberrant mitotic figures (Figure 5E). Altogether our findings clearly indicate that long-term inactivation of TIF1 γ results in attenuation of the spindle checkpoint, increased chromosomal instability and aggressiveness.

The mechanism by which the loss of TIF1 γ promotes chromosomal instability likely results from a step wise selection process. Indeed, it is well described that inactivation of the APC/C-CDC20 complex rapidly results in mitotic arrest (65). Since TIF1 γ was reported to interact with APC/C-CDC20 to promote its enzymatic activity, it is not surprising that loss of TIF1 γ rapidly result in a mitotic arrest ((19) and our data not shown). However, it is possible that after prolonged mitotic arrest, some cells are able to adapt and exit mitosis by inactivating the SAC by down regulating the expression of key player of the SAC. The molecular bases of this escape process resulting in inactivation of the SAC are still poorly known. This premature mitosis exit is associated with sustained faulty kinetochore-to-microtubule attachments, lagging chromosomes and maintenance of cohesiveness between sister chromatids during mitotic exit, which promotes defective karyokinesis, chromosome breakage and rejoining events (66), possibly conferring to the cells a selective growth advantage.

Sedgwick *et al.* (19) identified TIF1 γ as an APC/C-interacting protein that positively regulates the E3-ubiquitine ligase activity of TIF1 γ . In the present study, we reported that prolonged inactivation of TIF1 γ resulted in the degradation of CYCLIN A, CYCLIN B1 and SECURIN indicating that APC/C is still active. This observation indicates that TIF1 γ is dispensable for APC/C-CDC20 E3-ligase activity when the SAC is inactivated and supports the hypothesis that TIF1 γ positively regulates the activity of this complex through an indirect mechanism. Even if a direct positive effect of TIF1 γ on APC-C is

possible, we propose that TIF1 γ would mainly behave as an inhibitor of the MCC. This model would explain why stable TIF1 γ -deficient cells, which present a down regulated expression of MCC components (BUB1, BUBR1, MAD2, AURORA B) are still able to progress through the mitosis. This alternate mechanism also proposed by Sedgwick *et al.*, might explain several unexpected results reported by these authors. First, they demonstrated that TIF1 γ preferentially interacted with APC-C when the SAC is activated, strongly suggesting an active role of TIF1 γ before the SAC is satisfied. Then, they demonstrated that BUBR1 knockout could totally rescue the mitotic arrest initially caused by TIF1 γ inactivation, constituting then clear evidence that TIF1 γ is not mandatory for APC-C activity. Finally, Sedgwick *et al.* showed that TIF1 γ could interact with the APC/C-MCC in SAC-activated cells compatible with a potential role of TIF1 γ to inhibit the MCC. At the molecular level, it is possible that TIF1 γ ubiquitylates SAC components at the kinetochores or at the MCC. Also, since TIF1 γ associates with the chromatin and belongs to a family of transcriptional repressors, TIF1 γ might repress the expression of mitotic factors. This hypothesis is supported by our unpublished microarray experiments that allowed us to identify 149 genes that were up-regulated (fold ≥ 1.70) in *Tif1 γ ^{-/-}*-primary MEFs compared to control-primary MEFs (of which 60 clustered in a group of genes involved in the regulation of cell cycle, including 50 genes specifically involved in mitosis and cytokinesis).

Chromosomal instability and aneuploidy resulting from uncorrected mitotic errors due to an impaired spindle checkpoint is a common mechanism promoting tumorigenesis (67). In theory, cells with chromosomal abnormalities should arrest proliferation in the G1 phase of the next cell cycle as a result of the p53/p21-dependent post-mitotic checkpoint (54, 68). Interestingly, we observed an attenuated p53/p21-dependent post-mitotic checkpoint in transformed *Tif1 γ* -deficient cells illustrated by a reduced p21 steady state level and transcriptional response to spindle disruption by colcemid (Figure 4C and 4D), attenuated cell-contact growth inhibition and increased anchorage-independent growth (Figure 5A and 5B). Loss of p21 was shown to significantly cooperate with RAS and E1A oncoproteins to promote cell transformation (56-58). Enhanced oncogenic property of *Tif1 γ* -deficient NMuMG cells allografted into *Nude* mice would then be a consequence of attenuated post-mitotic checkpoint (Figure 5D). Furthermore, computational analyses of human tumors available in public databases reinforce this conclusion. Indeed, the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) and The Cancer Genome Atlas (TCGA)

allowed us to demonstrate that *TIF1 γ* -deficiency was correlated with accumulation of chromosomal rearrangements (increased CNV and CIN) and increased rates of *TP53* mutations, providing a clinical relevance for the loss of TIF1 γ in human tumors (**Figure 6**). An attenuated post-mitotic checkpoint in *TIF1 γ* -deficient cells most likely allows the accumulation of nuclear defects and would therefore facilitate the positive selection of cells with more aggressive properties. Indeed, it is commonly accepted that the detrimental effect resulting from chronic chromosomal instability is counterbalanced by the growth advantage resulting from the loss of tumor suppressor genes to promote the amplification of more aggressive clones (69). Interestingly, hepatic tumors arising from *TIF1 α* knockout in mice present a high rate of polyploid cells (20%), highlighting a possible conserved role of TIF1 family member in mitosis regulation (45). In all, loss of *TIF1 γ* should be seen as a triggering event for chromosomal instability that will lead to the onset of genomic alterations giving rise to more aggressive cells. It further will be of particular interest to assess the respective role during mitosis of the previously described functions of TIF1 γ such as E3 ubiquitin-ligase activity, chromatin remodeling, DNA repair and modulation of the TGF β pathway.

Microtubule disrupting agents (taxol, vincristine, colcemid, nocodazole) activate the spindle checkpoint. Cells treated with microtubule poisons arrest in mitosis and undergo apoptosis (70), explaining the extensive use of these drugs in chemotherapeutic treatments. Yet their efficiency is highly variable between cancer cells and the molecular basis of the adaptation process leading to drug resistance remains unclear (71). One explanation is that some cells are predisposed to SAC inactivation (as a result of genetic or epigenetic alterations), preventing the drugs from arresting the cells in mitosis and their elimination by apoptosis. In such a context, it is also possible that spindle poison drugs may even have the reverse effect of accelerating the onset of chromosomal defects. Indeed, cells with such abnormalities may not be eradicated, with the possible consequence of providing a deleterious positive selection pressure for cells that have acquired a growth advantage and more aggressive properties due to genomic instability. We demonstrated in the present study that long term inactivation of TIF1 γ was associated with SAC inactivation and an attenuated post-mitotic response allowing cells harboring chromosomal abnormalities to enter a new cell cycle. In this context, it is tempting to speculate that the status of TIF1 γ in human tumors may represent a predictive marker of microtubule drug resistance, as

illustrated *in vitro* in the present study with TIF1 γ -deficient cells, which are insensitive to colcemid and nocodazole. Targeting the activity of the APC-C may represent a pertinent therapeutic strategy for these tumors.

In conclusion, we propose an original model to explain the tumor suppressor role of TIF1 γ (**Figure 6E**). The loss of TIF1 γ results in sustained spindle checkpoint activation, which delays cells in mitosis and slows down their proliferation. However, this arrest is slowly bypassed through SAC inactivation. This enables the completion of an abnormal mitosis and the production of daughter cells with chromosomal defects. The post-mitotic checkpoint, that should detect and eliminate those abnormal cells, is attenuated in TIF1 γ -deficient cells. Chromosomal instability, by allowing the loss of tumor suppressor genes, would then confer to those cells a growth advantage, eventually facilitating tumor progression. This cascade of events provides an original molecular scenario to understand the tumor suppressive function of TIF1 γ .

MATERIALS AND METHODS

Details about additional procedures are provided in the **Supplemental Materials and Methods**.

Mice

Tiflγ^{L/L} mice bearing the homozygous *Tiflγ* conditional knockout allele were described previously (6, 40). Five-week-old female *Nude* mice were purchased from Charles River. Mice were housed and bred in a specific pathogen-free animal facility. All experiments were validated by the local animal ethic evaluation committee (CECCAPP) in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French laws.

Cell culture

Primary Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) were isolated from E13.5 wild-type or *Tiflγ^{L/L}* mutant embryos. *Tiflγ^{L/L}*-immortalized MEFs were obtained according to a standard 3T3 protocol (72) after 15-20 passages and were cultured in the same medium as primary MEFs without β-ME. NMuMG (Normal Murine Mammary Gland) epithelial cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) and were cultured in DMEM, supplemented with 0.03% L-glutamine and containing 10% FBS, P/S and 10 μg/mL insulin. All cells were propagated at 37°C under 5% (v/v) CO₂ atmosphere. Nocodazole was purchased from Sigma-Aldrich and was used at a 600 ng/mL final concentration. Colcemid was purchased from Invitrogen and was used at a 500 ng/mL final concentration.

Retroviral transduction

Tiflγ^{L/L}-immortalized MEFs were transduced either with an empty (pBABE-empty) or a Cre-expressing (pBABE-Cre) retroviral vector and cultured in the presence of 3 μg/mL puromycin (Invivogen) to respectively obtain stable control- and *Tiflγ^{-/-}*-immortalized MEFs. NMuMG cells were transduced either with an empty retroviral vector (pRS-empty) or a retroviral vector expressing an shRNA directed against *Tiflγ* (pRS-sh*Tiflγ*) and cultured in the presence of 10 μg/mL puromycin to respectively obtain stable control- and sh*Tiflγ*-NMuMG cells. Next, transformation of these NMuMG cell lines was performed by retroviral transduction with vectors encoding HRAS^{V12} and E1A oncoproteins to generate respectively control- and sh*Tiflγ*-transformed NMuMG cells. Stably transduced cells were selected by

culturing in the presence of 800 µg/mL G418 (Life Technologies) and 200 µg/mL hygromycin B (Life Technologies).

Analysis of human cancer cell lines and human carcinomas

Copy Number Variation (CNV) and *TIF1γ* gene expression were analyzed for 990 human cancer cell lines available in the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) (<http://www.broadinstitute.org/ccle/home>). Human breast, colorectal and kidney tumors available in The Cancer Genome Atlas (TCGA) were selected based on their tumor cells content ($\geq 60\%$). CNV, *TIF1γ* gene expression and *TP53* gene status were analyzed for 131 human breast carcinomas available in the TCGA. *TIF1γ* gene status and CIN or MIN status were analyzed for 202 human colorectal carcinomas available in the TCGA. The log₂-transformed Copy Number (CN) value was used to determine the wild-type or deleted status of *TIF1γ* (CN >0.3 or <-0.3). Human colorectal carcinomas were divided into CIN and MIN phenotype based on their whole genome hyper- or hypo-mutation status (<500 for CIN; ≥ 500 for MIN), as described previously (73). CNV and *TIF1γ* gene expression were analyzed for 406 human clear cell renal cell carcinomas available in the TCGA.

Statistical analysis

For cytology and histology quantifications, luciferase reporter assays, soft agar assays, chorioallantoic membrane assays, allografts in *Nude* mice and RT-qPCR, statistical significance were tested using Student's *t* test. Statistical significance of soft agar assay results was tested using Pearson's chi-squared test. CNV and gene expression data were represented as Tukey box plots (the central point represents the median; the bottom and top of the box represent the 25th and 75th percentile; the whiskers represent the minimum and maximum values). Statistical significance was tested using Student's *t* test. *TP53* and *TIF1γ* status data were represented as percentage of tumors presenting *TP53* mutation or *TIF1γ* deletion. Statistical significance was tested using Pearson's chi-squared test. All statistical tests were considered to be statistically significant when $P < 0.05$.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Centre Léon Bérard specific pathogen-free animal facility platform AniCan, ALECs-SPF facility, the Laboratoire des Modèles Tumoraux platform for animal care. We thank Daniel Pissaloux and Isabelle Treilleux (Pathology department, Centre Léon Bérard) and Nicolas Gadot (AniPath platform, Université Lyon I) for histological processing and their expert analyses. We thank Servane Tauszig-Delamasure and Gabriel Ichim for their help in CAM assay, Emmanuelle Ruiz for its help in the genetic analyses of human samples, Anne-Pierre Morel for the critical reading of the manuscript, Stéphanie Monod for her technical assistance and Sarah Kabani for English language editing of the manuscript. This work was supported by the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM Avenir program), by the Association pour la Recherche sur le Cancer (JG, DFV and BK salaries), by fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche of France (RMP), from the Ligue Nationale Contre le Cancer (VA and LBA) and from the Ecole Normale Supérieure of Lyon (NC and GD). The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Hatakeyama S. TRIM proteins and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:792-804.
2. Venturini L, You J, Stadler M, Galien R, Lallemand V, Koken MH, et al. TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family. *Oncogene*. 1999;18:1209-17.
3. Forrester NA, Patel RN, Speiseder T, Groitl P, Sedgwick GG, Shimwell NJ, et al. Adenovirus E4orf3 targets transcriptional intermediary factor 1gamma for proteasome-dependent degradation during infection. *J Virol*. 2012;86:3167-79.
4. Fattet L, Ay AS, Bonneau B, Jallades L, Mikaelian I, Treilleux I, et al. TIF1gamma requires sumoylation to exert its repressive activity on TGFbeta signaling. *J Cell Sci*. 2013;126:3713-23.
5. Wisotzkey RG, Quijano JC, Stinchfield MJ, Newfeld SJ. New Gene Evolution in the Bonus-TIF1-gamma/TRIM33 Family Impacted the Architecture of the Vertebrate Dorsal-Ventral Patterning Network. *Mol Biol Evol*. 2014.
6. Morsut L, Yan KP, Enzo E, Aragona M, Soligo SM, Wendling O, et al. Negative control of Smad activity by ectodermin/Tif1 {gamma} patterns the mammalian embryo. *Development*. 2010.
7. Dupont S, Mamidi A, Cordenonsi M, Montagner M, Zacchigna L, Adorno M, et al. FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell*. 2009;136:123-35.
8. Falk S, Joosten E, Kaartinen V, Sommer L. Smad4 and Trim33/Tif1gamma Redundantly Regulate Neural Stem Cells in the Developing Cortex. *Cereb Cortex*. 2013.
9. Hesling C, Lopez J, Fattet L, Gonzalo P, Treilleux I, Blanchard D, et al. Tif1gamma is essential for the terminal differentiation of mammary alveolar epithelial cells and for lactation through SMAD4 inhibition. *Development*. 2013;140:167-75.
10. Massague J, Xi Q. TGF-beta control of stem cell differentiation genes. *FEBS Lett*. 2012;586:1953-8.
11. Bai X, Kim J, Yang Z, Jurynek MJ, Akie TE, Lee J, et al. TIF1gamma controls erythroid cell fate by regulating transcription elongation. *Cell*. 2010;142:133-43.
12. Bai X, Trowbridge JJ, Riley E, Lee JA, DiBiase A, Kaartinen VM, et al. Tif1-gamma plays an essential role in murine hematopoiesis and regulates transcriptional elongation of erythroid genes. *Dev Biol*. 2013;373:422-30.
13. Kusy S, Romeo PH. [TIF1gamma is a chief conductor of the hematopoietic system]. *Med Sci (Paris)*. 2011;27:698-700.
14. Kusy S, Gault N, Ferri F, Lewandowski D, Barroca V, Jaracz-Ros A, et al. Adult Hematopoiesis is Regulated by TIF1gamma, a Repressor of TAL1 and PU.1 Transcriptional Activity. *Cell Stem Cell*. 2011;8:412-25.
15. He W, Dorn DC, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Moore MA, Massague J. Hematopoiesis controlled by distinct TIF1gamma and Smad4 branches of the TGFbeta pathway. *Cell*. 2006;125:929-41.
16. Ransom DG, Bahary N, Niss K, Traver D, Burns C, Trede NS, et al. The zebrafish moonshine gene encodes transcriptional intermediary factor 1gamma, an essential regulator of hematopoiesis. *PLoS Biol*. 2004;2:E237.
17. Quere R, Saint-Paul L, Carmignac V, Martin RZ, Chretien ML, Largeot A, et al. Tif1gamma regulates the TGF-beta1 receptor and promotes physiological aging of hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:10592-7.
18. Kulkarni A, Oza J, Yao M, Sohail H, Ginjala V, Tomas-Loba A, et al. Tripartite motif-containing 33 (TRIM33) functions in the Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP)-dependent DNA damage response through interaction with Amplified in Liver Cancer-1 (ALC1). *J Biol Chem*. 2013.
19. Sedgwick GG, Townsend K, Martin A, Shimwell NJ, Grand RJ, Stewart GS, et al. Transcriptional intermediary factor 1gamma binds to the anaphase-promoting complex/cyclosome and promotes mitosis. *Oncogene*. 2013;32:4622-33.
20. Doisne JM, Bartholin L, Yan KP, Garcia CN, Duarte N, Le Luque JB, et al. iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-beta signaling. *J Exp Med*. 2009;206:1365-78.
21. Muro Y, Ishikawa A, Sugiura K, Akiyama M. Clinical features of anti-TIF1-alpha antibody-positive dermatomyositis patients are closely associated with coexistent dermatomyositis-specific

- autoantibodies and anti-TIF1-gamma or anti-Mi-2 autoantibodies. *Rheumatology (Oxford)*. 2012;51:1508-13.
22. Labrador-Horrillo M, Martinez MA, Selva-O'Callaghan A, Trallero-Araguas E, Balada E, Vilardell-Tarres M, et al. Anti-TIF1gamma antibodies (anti-p155) in adult patients with dermatomyositis: comparison of different diagnostic assays. *Ann Rheum Dis*. 2012;71:993-6.
 23. Xi Q, Wang Z, Zaromytidou AI, Zhang XH, Chow-Tsang LF, Liu JX, et al. A Poised Chromatin Platform for TGF-beta Access to Master Regulators. *Cell*. 2011;147:1511-24.
 24. Agricola E, Randall RA, Gaarenstroom T, Dupont S, Hill CS. Recruitment of TIF1gamma to Chromatin via Its PHD Finger-Bromodomain Activates Its Ubiquitin Ligase and Transcriptional Repressor Activities. *Mol Cell*. 2011;43:85-96.
 25. Herquel B, Ouararhni K, Davidson I. The TIF1alpha-related TRIM cofactors couple chromatin modifications to transcriptional regulation, signaling and tumor suppression. *Transcription*. 2011;2:231-6.
 26. Dupont S, Zacchigna L, Cordenonsi M, Soligo S, Adorno M, Rugge M, et al. Germ-layer specification and control of cell growth by Ectodermin, a Smad4 ubiquitin ligase. *Cell*. 2005;121:87-99.
 27. Andrieux G, Fattet L, Le Borgne M, Rimokh R, Theret N. Dynamic regulation of Tgf-B signaling by Tif1gamma: a computational approach. *PLoS One*. 2012;7:e33761.
 28. Xue J, Lin X, Chiu WT, Chen YH, Yu G, Liu M, et al. Sustained activation of SMAD3/SMAD4 by FOXM1 promotes TGF-beta-dependent cancer metastasis. *J Clin Invest*. 2014;124:564-79.
 29. He W, Dorn D, Erdjumentbromage H, Tempst P, Moore M, Massague J. Hematopoiesis Controlled by Distinct TIF1γ and Smad4 Branches of the TGFβ Pathway. *Cell*. 2006;125:929-41.
 30. Johansson M, Dietrich C, Mandahl N, Hambræus G, Johansson L, Clausen PP, et al. Karyotypic characterization of bronchial large cell carcinomas. *Int J Cancer*. 1994;57:463-7.
 31. Klugbauer S, Rabes HM. The transcription coactivator HTIF1 and a related protein are fused to the RET receptor tyrosine kinase in childhood papillary thyroid carcinomas. *Oncogene*. 1999;18:4388-93.
 32. Gasparian AV, Laktionov KK, Belialova MS, Pirogova NA, Tatosyan AG, Zborovskaya IB. Allelic imbalance and instability of microsatellite loci on chromosome 1p in human non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 1998;77:1604-11.
 33. Nagai H, Negrini M, Carter SL, Gillum DR, Rosenberg AL, Schwartz GF, et al. Detection and cloning of a common region of loss of heterozygosity at chromosome 1p in breast cancer. *Cancer Res*. 1995;55:1752-7.
 34. Bieche I, Khodja A, Lidereau R. Deletion mapping of chromosomal region 1p32-pter in primary breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999;24:255-63.
 35. Ng KC, Tan AM, Chong YY, Lau LC, Lou J. Congenital acute megakaryoblastic leukemia (M7) with chromosomal t(1;22)(p13;q13) translocation in a set of identical twins. *J Pediatr Hematol Oncol*. 1999;21:428-30.
 36. Natrajan R, Williams RD, Grigoriadis A, Mackay A, Fenwick K, Ashworth A, et al. Delineation of a 1Mb breakpoint region at 1p13 in Wilms tumors by fine-tiling oligonucleotide array CGH. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007;46:607-15.
 37. Sawyer JR, Thomas EL, Lukacs JL, Swanson CM, Ding Y, Parham DM, et al. Recurring breakpoints of 1p13 approximately p22 in osteochondroma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2002;138:102-6.
 38. Sandgren J, Diaz de Stahl T, Andersson R, Menzel U, Piotrowski A, Nord H, et al. Recurrent genomic alterations in benign and malignant pheochromocytomas and paragangliomas revealed by whole-genome array comparative genomic hybridization analysis. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17:561-79.
 39. Bello MJ, de Campos JM, Vaquero J, Ruiz-Barnes P, Kusak ME, Sarasa JL, et al. hRAD54 gene and 1p high-resolution deletion-mapping analyses in oligodendrogliomas. *Cancer Genet Cytogenet*. 2000;116:142-7.
 40. Vincent DF, Yan KP, Treilleux I, Gay F, Arfi V, Kaniewski B, et al. Inactivation of TIF1gamma cooperates with Kras to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genet*. 2009;5:e1000575.
 41. Wang L, Lei Z, Liu X, Liu R, Zhang H. [Association of mutation and methylation in the promoter region of TIF1gamma with non-small cell lung cancer]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2013;16:227-32.
 42. Ding ZY, Jin GN, Wang W, Chen WX, Wu YH, Ai X, et al. Reduced expression of TIF1gamma promotes metastasis and indicates poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2014.

43. Aucagne R, Droin N, Paggetti J, Lagrange B, Largeot A, Hammann A, et al. Transcription intermediary factor 1gamma is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Invest*. 2011.
44. Herquel B, Ouararhni K, Khetchoumian K, Ignat M, Teletin M, Mark M, et al. Transcription cofactors TRIM24, TRIM28, and TRIM33 associate to form regulatory complexes that suppress murine hepatocellular carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011.
45. Khetchoumian K, Teletin M, Tisserand J, Mark M, Herquel B, Ignat M, et al. Loss of Trim24 (Tif1alpha) gene function confers oncogenic activity to retinoic acid receptor alpha. *Nat Genet*. 2007;39:1500-6.
46. Vincent DF, Gout J, Chuvin N, Arfi V, Pommier RM, Bertolino P, et al. Tif1gamma suppresses murine pancreatic tumoral transformation by a smad4-independent pathway. *Am J Pathol*. 2012;180:2214-21.
47. Hesling C, Fattet L, Teyre G, Jury D, Gonzalo P, Lopez J, et al. Antagonistic regulation of EMT by TIF1gamma and Smad4 in mammary epithelial cells. *EMBO Rep*. 2011.
48. Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:379-93.
49. Lara-Gonzalez P, Westhorpe FG, Taylor SS. The spindle assembly checkpoint. *Curr Biol*. 2012;22:R966-80.
50. Giet R, Glover DM. Drosophila aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis. *J Cell Biol*. 2001;152:669-82.
51. Zhang S, Mercado-Urbe I, Xing Z, Sun B, Kuang J, Liu J. Generation of cancer stem-like cells through the formation of polyploid giant cancer cells. *Oncogene*. 2014;33:116-28.
52. Stewart ZA, Leach SD, Pietenpol JA. p21(Waf1/Cip1) inhibition of cyclin E/Cdk2 activity prevents endoreduplication after mitotic spindle disruption. *Mol Cell Biol*. 1999;19:205-15.
53. Lanni JS, Jacks T. Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption. *Mol Cell Biol*. 1998;18:1055-64.
54. Aylon Y, Oren M. p53: guardian of ploidy. *Mol Oncol*. 2011;5:315-23.
55. Decordier I, Cundari E, Kirsch-Volders M. Mitotic checkpoints and the maintenance of the chromosome karyotype. *Mutat Res*. 2008;651:3-13.
56. Bulavin DV, Tararova ND, Aksenov ND, Pospelov VA, Pospelova TV. Deregulation of p53/p21Cip1/Waf1 pathway contributes to polyploidy and apoptosis of E1A+cHa-ras transformed cells after gamma-irradiation. *Oncogene*. 1999;18:5611-9.
57. Woo RA, Poon RY. Activated oncogenes promote and cooperate with chromosomal instability for neoplastic transformation. *Genes Dev*. 2004;18:1317-30.
58. Romanov VS, Bardin AA, Zubova SG, Bykova TV, Pospelov VA, Pospelova TV. p21Waf1 is required for complete oncogenic transformation of mouse embryo fibroblasts by E1Aad5 and c-Ha-ras oncogenes. *Biochimie*. 2011;93:1408-14.
59. Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*. 2006;444:444-54.
60. Hoggard N, Hey Y, Brintnell B, James L, Jones D, Mitchell E, et al. Identification and cloning in yeast artificial chromosomes of a region of elevated loss of heterozygosity on chromosome 1p31.1 in human breast cancer. *Genomics*. 1995;30:233-43.
61. Dunican DS, McWilliam P, Tighe O, Parle-McDermott A, Croke DT. Gene expression differences between the microsatellite instability (MIN) and chromosomal instability (CIN) phenotypes in colorectal cancer revealed by high-density cDNA array hybridization.[erratum appears in *Oncogene* 2002 Nov 7;21(51):7912]. *Oncogene*. 2002;21:3253-7.
62. Sameer AS. Colorectal cancer: molecular mutations and polymorphisms. *Front Oncol*. 2013;3:114.
63. Weaver BA, Cleveland DW. Does aneuploidy cause cancer? *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18:658-67.
64. Vitre BD, Cleveland DW. Centrosomes, chromosome instability (CIN) and aneuploidy. *Curr Opin Cell Biol*. 2012;24:809-15.
65. Rieder CL. Mitosis in vertebrates: the G2/M and M/A transitions and their associated checkpoints. *Chromosome Res*. 2011;19:291-306.
66. Hayashi MT, Karlseder J. DNA damage associated with mitosis and cytokinesis failure. *Oncogene*. 2013;32:4593-601.

67. Fang X, Zhang P. Aneuploidy and tumorigenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2011;22:595-601.
68. Khan SH, Wahl GM. p53 and pRb prevent rereplication in response to microtubule inhibitors by mediating a reversible G1 arrest. *Cancer Res.* 1998;58:396-401.
69. Schvartzman JM, Sotillo R, Benezra R. Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease. *Nat Rev Cancer.* 2010;10:102-15.
70. Gascoigne KE, Taylor SS. Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. *Cancer Cell.* 2008;14:111-22.
71. Matson DR, Stukenberg PT. Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways. *Mol Interv.* 2011;11:141-50.
72. Xu J. Preparation, culture, and immortalization of mouse embryonic fibroblasts. *Curr Protoc Mol Biol.* 2005;Chapter 28:Unit 28 1.
73. TheCancerGenomeAtlasNetwork. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012;487:330-7.

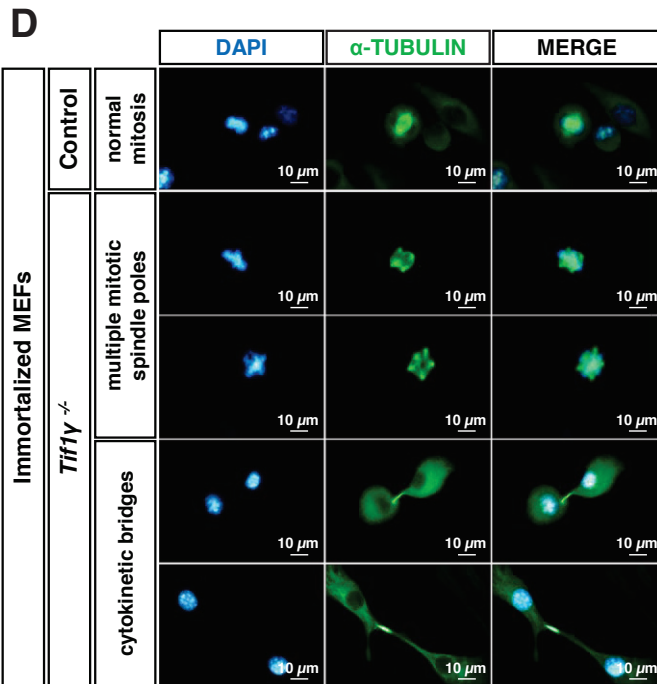
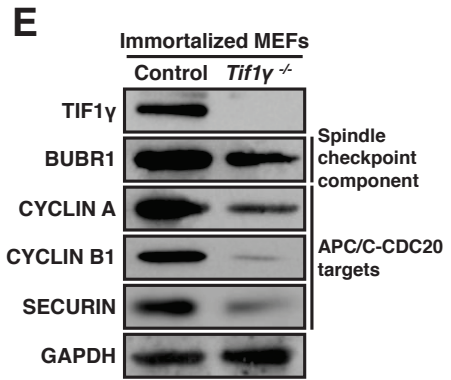
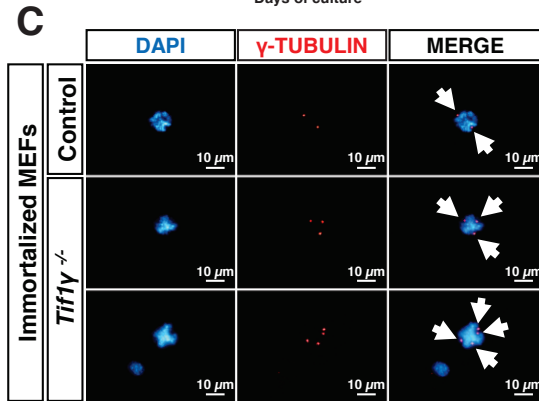
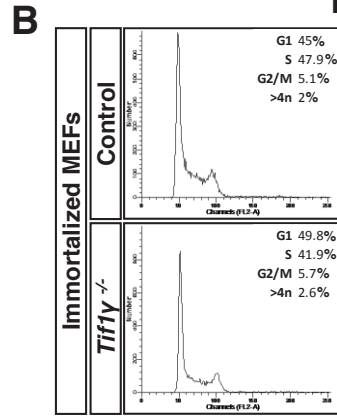
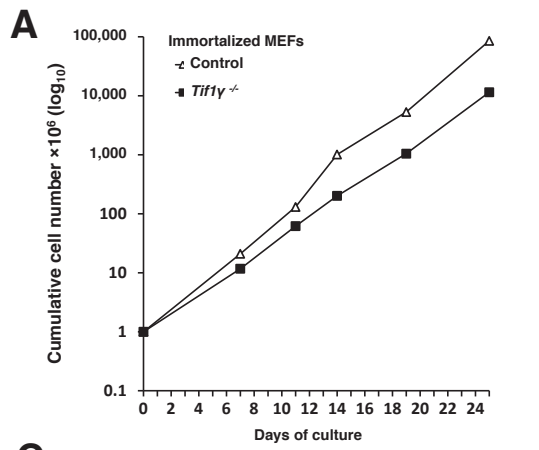


Figure 1. Prolonged inactivation of *Tiflγ* in mouse embryonic fibroblasts results in accumulation of nuclear abnormalities.

(A) Growth curve comparing control-(white triangle) and *Tiflγ*^{-/-} (black square)-immortalized MEFs over the course of 25 days. Data are representative of three independent experiments. (B) Cell cycle analysis by flow cytometry of control- and *Tiflγ*^{-/-}-immortalized MEFs. (C) Immunofluorescence staining for γ -TUBULIN (red) in control- and *Tiflγ*^{-/-}-immortalized MEFs. Cell nuclei were counterstained with DAPI (blue). The white arrows indicate centrosomes. Quantification of cells presenting multiple centrosomes is shown. Data are representative of three independent experiments performed in triplicates and are represented as mean \pm SD (***P* < 0.001). (D) Immunofluorescence staining for α -TUBULIN (green) in control- and *Tiflγ*^{-/-}-immortalized MEFs. Cell nuclei were counterstained with DAPI (blue). Quantification of cells presenting multiple mitotic spindle poles or cytokinetic bridges is shown. Data are representative of three independent experiments performed in triplicates and are represented as mean \pm SD (**P* < 0.05). (E) Western blot analysis of mitotic protein levels in control- and *Tiflγ*^{-/-}-immortalized MEFs.

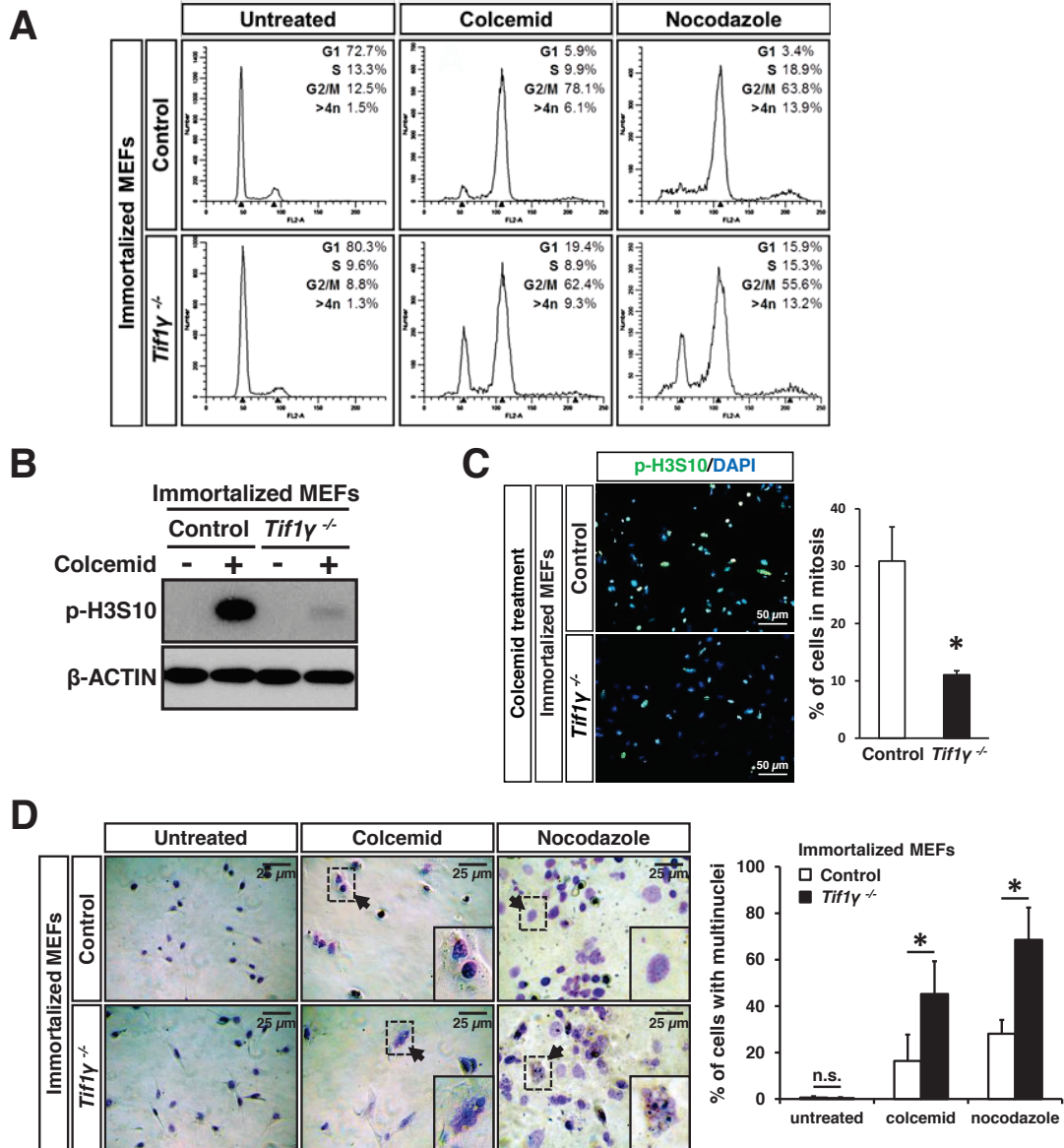
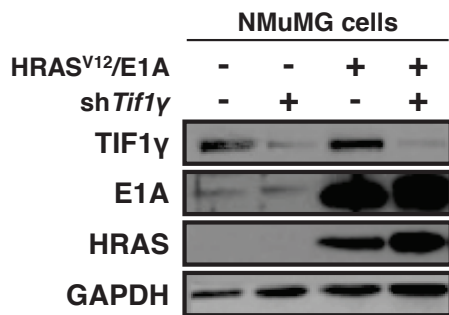


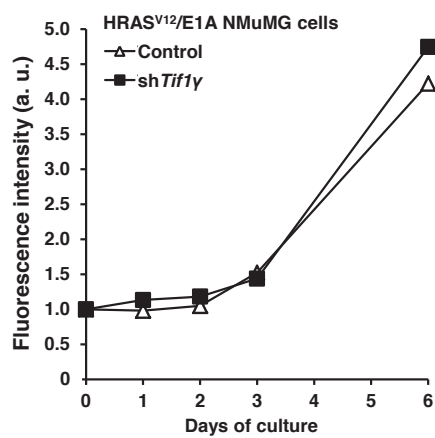
Figure 2. *Tifl* γ ^{-/-}-immortalized mouse embryonic fibroblasts present a spindle checkpoint inactivation.

(A) Cell cycle analysis by flow cytometry of control- and *Tifl* γ ^{-/-}-immortalized MEFs treated or not with colcemid or nocodazole for 24 h. (B) Western blot analysis of phosphorylated Serine-10 HISTONE H3 (p-H3S10) level in control- and *Tifl* γ ^{-/-}-immortalized MEFs treated or not with colcemid for 24 h. (C) Immunofluorescence staining for p-H3S10 (green) in control- and *Tifl* γ ^{-/-}-immortalized MEFs treated with colcemid for 24 h. Cell nuclei were counterstained with DAPI (blue). Quantification of mitotic index is shown. Data are represented as mean \pm SEM of four independent experiments (**P* < 0.05). (D) Toluidine blue staining in control- and *Tifl* γ ^{-/-}-immortalized MEFs treated or not with colcemid or nocodazole for 24 h. The black arrows encompass a representative nucleus that is magnified in the lower right corner of each image. Quantification of multinucleated cells is shown. Data are representative of three independent experiments performed in triplicates and are represented as mean \pm SD (**P* < 0.05).

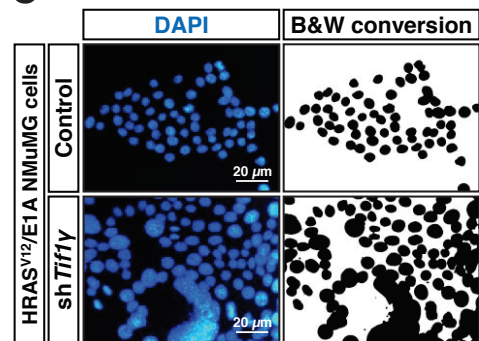
A



B



C



D

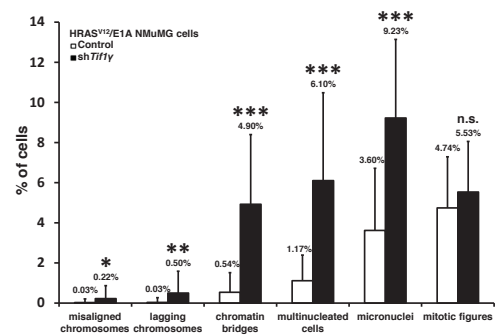
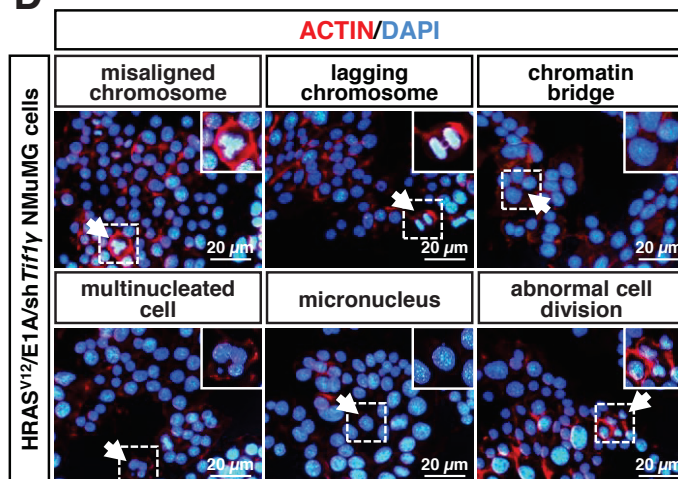


Figure 3. Inactivation of *Tiflγ* in epithelial transformed NMuMG cells results in nuclear defects.

(A) Western blot analysis in NMuMG cells transduced with the indicated retroviral vectors. (B) Growth curve comparing control- (white triangle) and sh*Tiflγ*-transformed NMuMG cells (black square) over the course of 6 days based on detection of metabolic activity (Uptibblue). Data are representative of three independent experiments. (C) Direct fluorescence staining of DNA by DAPI (blue) in control- and sh*Tiflγ*-transformed NMuMG cells and representation after Black-and-White (B&W) conversion of the images. (D) Direct fluorescence staining of DNA by DAPI (blue) and of cortical ACTIN cytoskeleton by phalloidin-TRITC (red) in sh*Tiflγ*-transformed NMuMG cells. The white arrows indicate nuclear abnormalities. The white dotted squares encompass a representative nuclear defect that is magnified in the upper right corner of each image. Quantification of nuclear abnormalities and mitotic figures is shown. Data are representative of three independent experiments performed in triplicates and are represented as mean \pm SD (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001; n.s.: not significant).

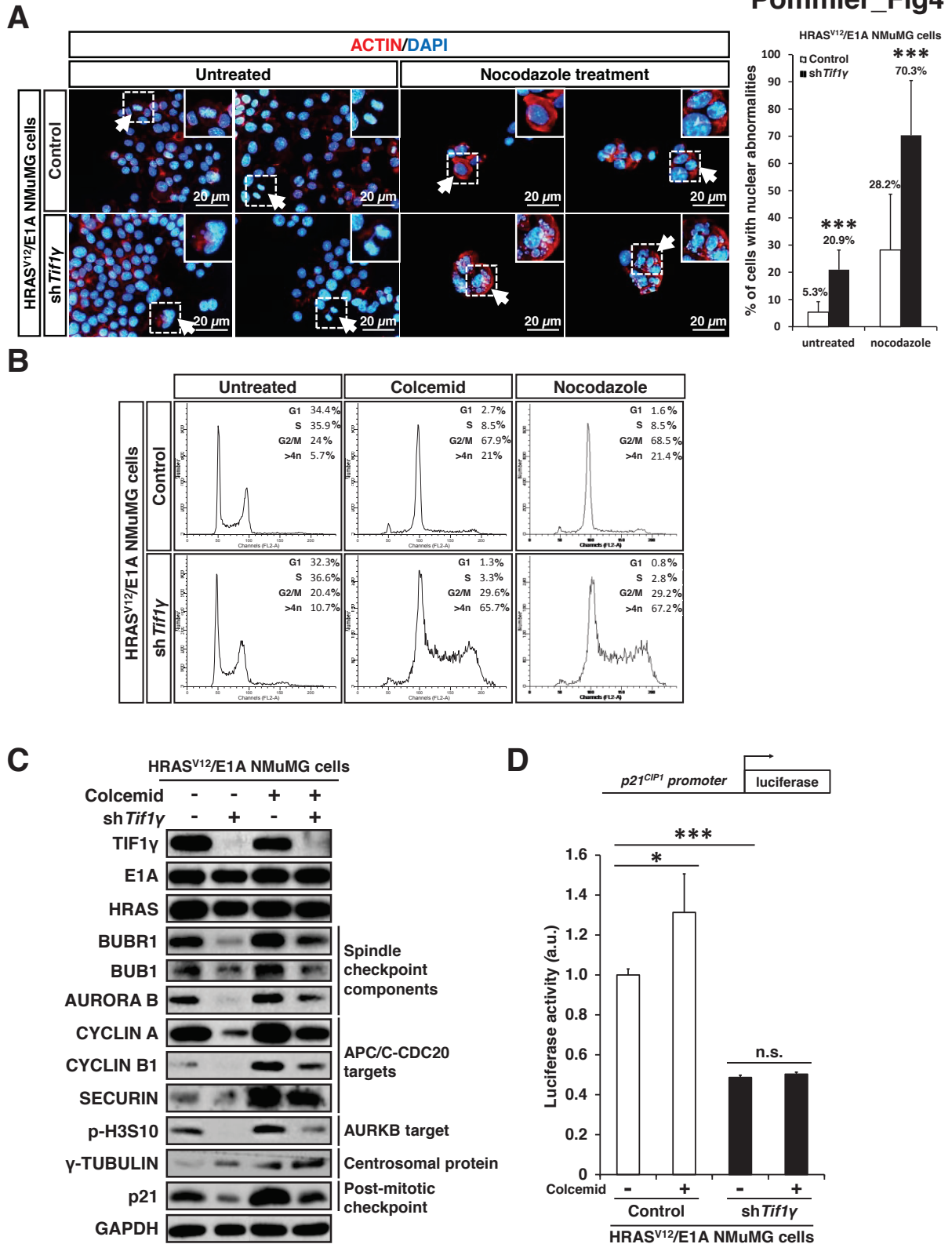


Figure 4. Spindle checkpoint and post-mitotic inactivation in *Tiflγ*-deficient transformed NMuMG cells.

(A) Direct fluorescence staining of DNA by DAPI (blue) and of cortical ACTIN cytoskeleton by phalloidin-TRITC (red) in control- and sh*Tiflγ*-transformed NMuMG cells treated or not with nocodazole for 24 h. The white arrows indicate mitotic figures. The white dotted squares encompass a representative mitotic figure that is magnified in the upper right corner of each image. Quantification of nuclear abnormalities is shown. Data are representative of three independent experiments performed in triplicates and are represented as mean \pm SD (*** $P < 0.001$). (B) Cell cycle analysis by flow cytometry of control- and sh*Tiflγ*-transformed NMuMG cells treated or not with colcemid or nocodazol for 24 h. (C) Western blot analysis in control- and sh*Tiflγ*-transformed NMuMG cells treated or not with colcemid for 24 h. (D) Luciferase reporter assay performed in control- and sh*Tiflγ*-transformed NMuMG cells transfected with the pGL3-*p21*-Luc plasmid and treated or not with colcemid for 24 h. Data are representative of three independent experiments performed in triplicates and are represented as mean \pm SD (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; n.s.: not significant).

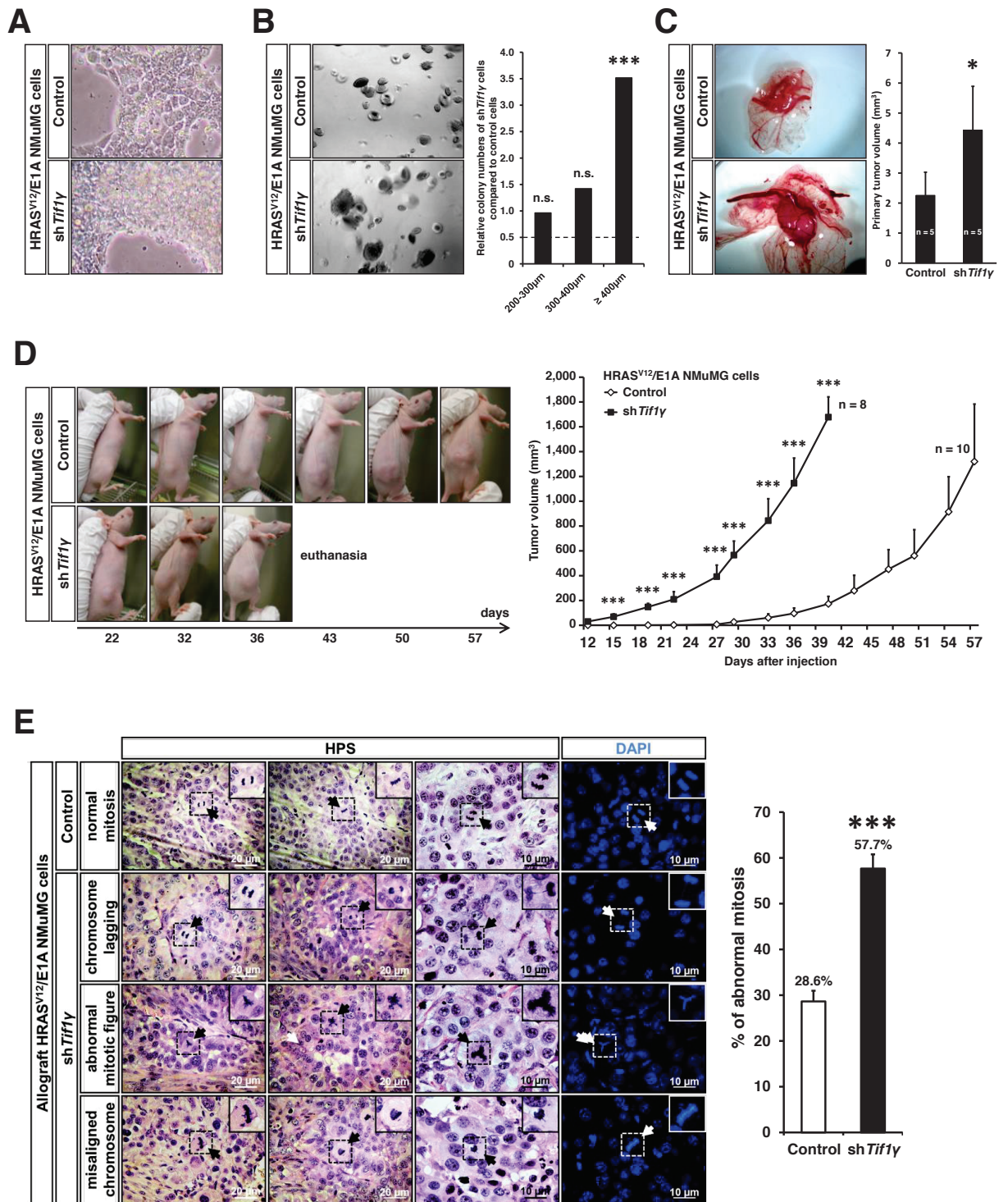
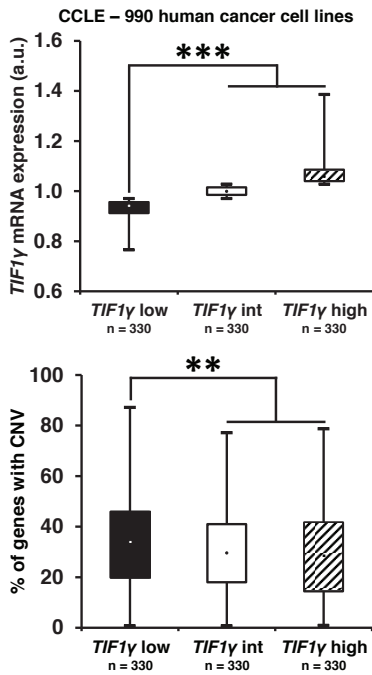


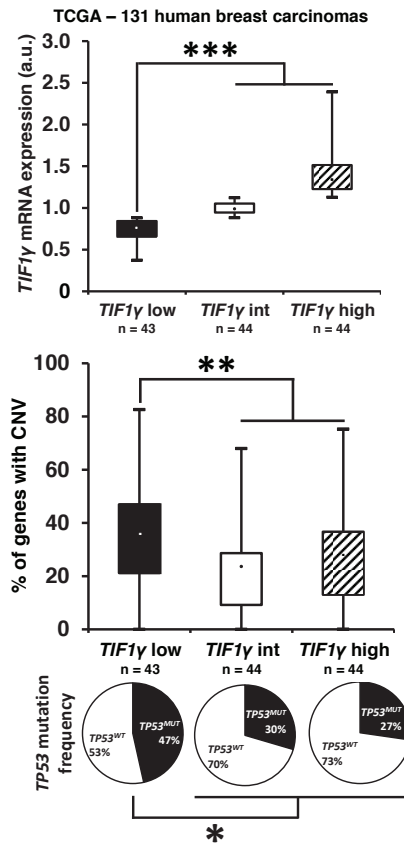
Figure 5. Increased tumorigenicity of *Tiflγ*-deficient transformed NMuMG cells

(A) Phase contrast microscopy of control- and sh*Tiflγ*-transformed NMuMG cells grown on plastic culture dishes. (B) Phase contrast microscopy of control- and sh*Tiflγ*-transformed NMuMG cells grown as anchorage-independent colonies in a soft agar medium. Quantification of colonies depending of their size is shown. Data are representative of three independent experiments ($***P < 0.001$; n.s.: not significant). (C) Representative macroscopic images of resected tumors from chicken chorioallantoic membrane assay performed with control- and sh*Tiflγ*-transformed NMuMG cells. Quantification of tumor volume is shown. Data are represented as mean \pm SEM ($*P < 0.05$). (D) Representative macroscopic images and time-dependent development (over the course of 57 days) of tumors arising either from control- and sh*Tiflγ*-transformed NMuMG cells subcutaneously engrafted in *Nude* mice. Quantification of tumor volume over this period is shown. Data are represented as mean \pm SEM ($***P < 0.001$). (E) Histological sections of allografts from control- and sh*Tiflγ*-transformed NMuMG cells stained by Hematoxylin-Phloxine-Saffron (HPS) and DAPI (blue). The black and white arrows indicate mitotic figures. The black and white dotted squares encompass a representative mitotic figure that is magnified in the upper right corner of each image. Quantification of abnormal mitotic figures is shown. Data are represented as mean \pm SEM ($***P < 0.001$).

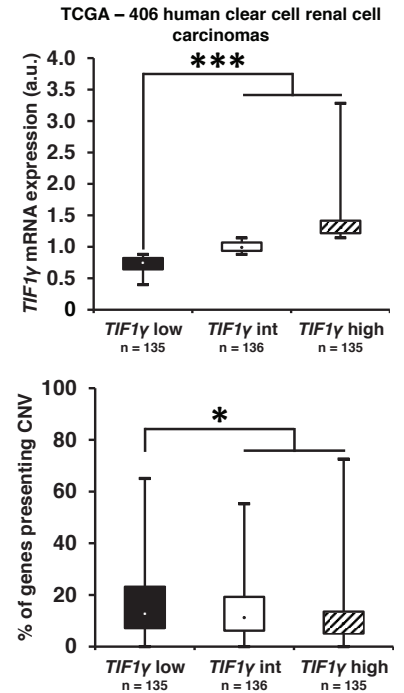
A



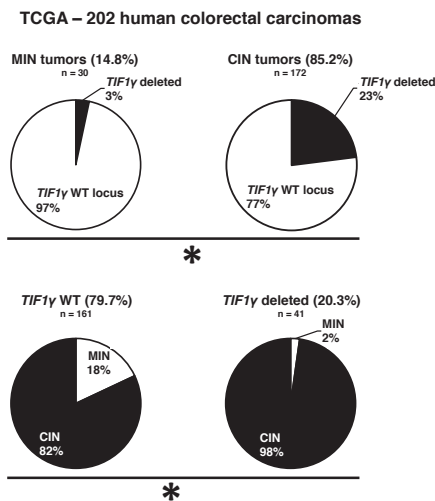
B



C



D



E

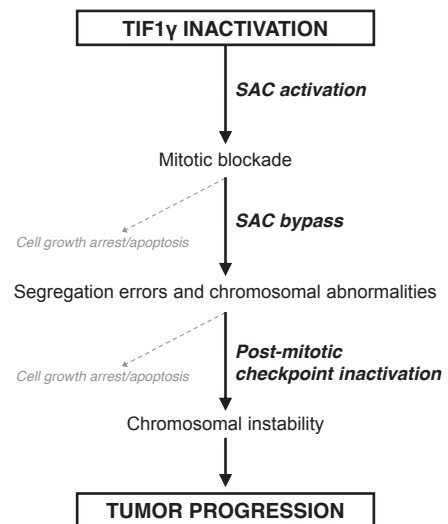


Figure 6. Down-regulation of *TIF1 γ* in human cancer cell lines and carcinomas correlates with chromosomal instability and *TP53* mutations.

(A) Classification of human cancer cell lines (n=990; isolated from different organs (distribution): thyroid (1%), endocrine glands (5%), breast (5%), autonomic nervous system (7%), skin and soft tissue (8%), kidney and urogenital tract (14%), digestive tract (19%), bone, hematopoietic and lymphoid tissue (20%) and respiratory tract (21%)) according to *TIF1 γ* expression (low, intermediate (int) and high expression groups) and analysis of Copy Number Variation (CNV) regarding the repartition of these human cancer cell lines in *TIF1 γ* low, intermediate (int) or high expression groups. Data are represented as Tukey box plot (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). CCLE, Cancer Cell Line Encyclopedia.

(B) Classification of human breast carcinomas according to *TIF1 γ* expression (low, intermediate (int) and high expression groups) (upper panel) and analysis of CNV (middle panel) and of *TP53* status (WT, wild-type; MUT, mutated) (lower panel) regarding the repartition of these tumors in *TIF1 γ* low, int or high expression groups. Data are respectively represented as Tukey box plot and percentages (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). TCGA, The Cancer Genome Atlas.

(C) Classification of human clear cell renal cells carcinomas according to *TIF1 γ* expression (low, intermediate (int) and high expression groups) and analysis of CNV regarding the repartition of these tumors in *TIF1 γ* low, int or high expression groups. Data are represented as Tukey box plot (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$). TCGA, The Cancer Genome Atlas.

(D) Analyses of the 1p13.2 locus (containing *TIF1 γ* gene) status regarding Microsatellite INstability (MIN) or Chromosomal INstability (CIN) phenotype and of MIN/CIN phenotype regarding the status of 1p13.2 locus, in human colorectal carcinomas. Data are represented as percentages (* $P < 0.05$). TCGA, The Cancer Genome Atlas.

(E) Integrative model showing the effect of *TIF1 γ* inactivation in mitosis and further consequences on tumor progression. *TIF1 γ* inactivation results in a prolonged mitotic blockade through Spindle Assembly Checkpoint (SAC) sustained activation. SAC inactivation occurs after prolonged inactivation of *TIF1 γ* , promotes mitosis exit and the onset of chromosomal abnormalities. Post-mitotic checkpoint attenuation prevents the eradication of cells with chromosomal segregation errors. Resulting genomic instability facilitates the emergence of cells with a growth advantage to actively fuel tumor progression.

SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS

Retroviruses production

Retroviruses were produced from Platinum-E cells (Cell Biolabs) transfected with retroviral vectors by CalPhos Mammalian Transfection kit (Clontech). Cells were incubated with retroviruses for 4 h, in the presence of 5 µg/mL polybrene (Sigma-Aldrich). pBABE-Cre was kindly provided by Dr. Cyril Berthet (National Cancer Institute, Frederick, MD, USA) and corresponding pBABE-empty vectors was kindly provided by Dr. Anne-Pierre Morel (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France). pRS-empty vector was kindly provided by Dr. Peter ten Dijke (Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands) and pRS-sh*Tif1*γ vector (#15728) was purchased from Addgene. pWZL-12SE1A vector (#18748) was obtained from Addgene and pBABE-HRAS^{V12} was previously described (1).

Cell proliferation and flow cytometry

For cumulative growth curve (3T3 assay), cells were plated in a T175 flask (1×10^6 cells) and were trypsinized, counted, and replated at the same density, twice a week for 25 days. Cells stained with trypan blue were counted using a Malassez cell counting chamber.

For cumulative growth curve based on detection of metabolic activity (Uptiblu), The first day of experiment, cells were seeded in 48-well plates (2,000 cells per well). Each day, 20 µL of UptiBlue reagent (Interchim) was added and cells were incubated at 37°C for 4 h. Fluorescence was measured at 590 nm wavelength using a spectrofluorometer. For cell cycle analysis by flow cytometry, cells were fixed in 70% cold ethanol at 4°C for 30 min, washed with PBS and then resuspended in a solution containing RNase A (2 mg/mL) and propidium iodide (40 µg/mL). Samples were subjected to flow cytometry (1×10^4 cells were acquired) on a Becton Dickinson FACS Calibur and analyzed with ModFit LT software (Verity Software House).

Cytology and histology

Cells were grown on glass coverslips, fixed in methanol at -20°C (for γ - and α -TUBULIN staining) or in 4% formaldehyde at 4°C (for ACTIN and phosphorylated Serine-10 HISTONE H3 staining), and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 10 min before immunofluorescence experiments. The primary antibodies used were: mouse monoclonal antibodies against γ -TUBULIN (1:1,000; Sigma-Aldrich), p-S10-HISTONE H3 (1:2,000; Abcam), α -TUBULIN, FITC-conjugated (1:100; Sigma-Aldrich). Secondary labeled antibodies were goat antibodies against mouse IgG, Alexa Fluor 555 dye-conjugated or Alexa Fluor 488 dye-conjugated (1:400; Invitrogen). ACTIN was stained with phalloidin-TRITC (1:200; Sigma-Aldrich). DNA was stained with DAPI (1 μ g/mL; Sigma-Aldrich). To better visualize nuclear shapes, black and white pictures were obtained from acquired photos, using ImageJ software (National Institutes of Health).

For toluidine blue nuclear staining, cells were fixed in methanol for 10 min at -20°C. After fixation, cells were incubated with toluidine blue for 10 min.

For mitotic index, centrosomes and cytokinetic bridges quantification in MEFs, a minimum of 50 cells per condition were counted. For nuclear abnormalities quantification in MEFs and NMuMG cells, a minimum of 200 cells per condition were counted.

All histological experiments were performed as previously described (2, 3).

Western blotting

Total protein extracts (20 μ g) were prepared using RIPA lysis buffer [50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS and commercial protease and phosphatase inhibitor cocktail tablets (Roche)] and were subjected to electrophoresis on SDS/PAGE. The separated proteins were transferred onto PVDF membranes (Millipore) by electroblotting. Western blots were revealed using the ECL Western detection system (GE Healthcare). Primary and secondary antibodies are listed thereafter:

GAPDH,	Goat polyclonal, 1:1,000	(Abcam)
ACTIN,	Mouse monoclonal, 1:5,000	(Sigma-Aldrich)
BUB1,	Mouse monoclonal, 1:500	(Abcam)
BUBR1,	Mouse monoclonal, 1:1,000	(BD Biosciences)

CYCLIN A,	Mouse monoclonal, 1:1,000	(Abcam)
CYCLIN B1,	Mouse monoclonal, 1:3,000	(Millipore)
HISTONE H3 (phospho-S10),	Mouse monoclonal, 1:1,000	(Abcam)
SECURIN,	Mouse monoclonal, 1:500	(Abcam)
TIF1 γ ,	Mouse monoclonal, 1:2,000	(Euromedex)
γ -TUBULIN,	Mouse monoclonal, 1:2,000	(Sigma-Aldrich)
AURORA B,	Rabbit polyclonal, 1:1,000	(Abcam)
E1A,	Rabbit polyclonal, 1:500	(Santa Cruz Biotechnology)
HRAS,	Rabbit polyclonal, 1:500	(Santa Cruz Biotechnology)
P21,	Rabbit polyclonal, 1:1,000	(Santa Cruz Biotechnology)
Goat IgG secondary antibody,	Rabbit 1:5,000	(Dako)
Mouse IgG secondary antibody,	Rabbit, 1:5,000	(Dako)
Rabbit IgG secondary antibody,	Goat, 1:5,000	(Santa Cruz Biotechnology)

Luciferase reporter assay

NMuMG cells were seeded the day before transfection into 12-well plates (1×10^5 cells per well). Transient transfections (Lipofectamine, Invitrogen) were performed using 1 μ g pGL3-Basic luciferase reporter vector (Promega) encoding *Firefly* luciferase under the control of *p21* promoter. Fifty ng of phRL-CMV vector (Promega) encoding *Renilla* luciferase under the control of the CMV (CytoMegalovirus) ubiquitous promoter was co-transfected in order to determine the transfection efficiency and to normalize *Firefly* luciferase values. The day after transfection, cells were treated or not with colcemid. 24 h after treatment, *Firefly* and *Renilla* luciferase activities were quantified in whole-cell lysates (Passive Lysis Buffer, Promega) using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) as previously reported (4). The firefly luciferase activity was normalized against *Renilla* luciferase activity, and the ratios applied to the untreated control-NMuMG cells, arbitrarily set at 1.0. Experiments were performed in triplicates.

Soft agar assay

Control- and sh*Tifl* γ -transformed NMuMG cells were harvested by trypsinization and diluted to a density of 10,000 cells per mL. Each mL was then suspended in 1 mL of 0.90% melted agarose (Lonza) in complete culture medium containing antibiotics, and plated into 6-well plates overlaid with 0.75% agarose in the same medium. Cells were then incubated for 3 weeks at 37°C under 5% (v/v) CO₂ atmosphere. Renewal of complete culture medium was performed once a week. Thirty fields per condition/per experiment were acquired and subsequently analyzed using ImageJ software.

Chicken chorioallantoic membrane assay

On day 1 of embryonic development, fertilized chick eggs (*Gallus gallus domesticus*, EARL Morizeau) were incubated at 38°C and a relative humidity of 80%. After 3 days, a window was cut in the shell. On day 11, 5×10^6 of control- or sh*Tifl* γ -transformed NMuMG cells, resuspended in 40 μ L of complete culture medium were inoculated on chorioallantoic membrane. Finally, after 17 days of development, chicken embryos were euthanized and tumors were resected. Their surfaces were determined using AxioVision Release 4.6 software (Zeiss).

Allografts in *Nude* mice

Control- and sh*Tifl* γ -transformed NMuMG cells were implanted by subcutaneous injection of 1×10^6 cells in 100 μ L PBS into the flank of five-week-old (20-22 g body weight) female *Nude* mice. Tumor size was measured twice a week with a caliper, and the tumor volumes were determined with the following equation: $v = (l \times w^2) \times 0.5$ (where v is volume, l is length and w is width). When tumors reached a maximal volume of 2,000 mm³, mice were euthanized. Tumors were then resected and fixed in 4% formaldehyde for 24 h and embedded in paraffin for histological analysis.

Analysis of human cancer cell lines and carcinomas

For human breast carcinomas, CNV data, *TIF1* γ gene expression data and *TP53* gene status data were respectively obtained from the files “SNP and Copy Number/Level 3 Data Archives”, “RNA Expression/Data Matrix Files/BRCA.exp.547.med.txt” and “Mutations/Level 2 MAF archives containing exome-based somatic mutations”, provided by TCGA (https://tcga-data.nci.nih.gov/docs/publications/brca_2012/) (5).

For human colorectal carcinomas, *TIF1 γ* gene status data and whole genome mutation status data were respectively obtained from the files “Copy Number/GISTIC marker file” and “Mutations/Somatic mutations”, provided by TCGA (https://tcga-data.nci.nih.gov/docs/publications/coadread_2012/).(6).

For human clear cell renal cell carcinomas, CNV data and *TIF1 γ* gene expression data were respectively obtained from the files “SNP and copy Number/Supplementary Data/Copy numbers for every genes” and “Gene expression/Supplementary Data/Data Matrix Files/Gene expression tumor data set”, provided by TCGA (https://tcga-data.nci.nih.gov/docs/publications/kirc_2013/) (7).

SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. Ansieau S, Leutz A. The conserved Mynd domain of BS69 binds cellular and oncoviral proteins through a common PXLXP motif. *J Biol Chem.* 2002;277:4906-10.
2. Vincent DF, Yan KP, Treilleux I, Gay F, Arfi V, Kaniewski B, et al. Inactivation of TIF1gamma cooperates with Kras to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genet.* 2009;5:e1000575.
3. Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla JP, et al. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10:7466-74.
4. Alcaraz LB, Exposito JY, Chuvin N, Pommier RM, Cluzel C, Martel S, et al. Tenascin-X promotes epithelial-to-mesenchymal transition by activating latent TGF-beta. *J Cell Biol.* 2014;205:409-28.
5. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012;490:61-70.
6. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.* 2012;487:330-7.
7. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature.* 2013;499:43-9.

IV. MATERIEL ET METHODES
COMPLEMENTAIRES

Culture cellulaire, transfections et transductions

1. Culture cellulaire

MEFs primaires

Les MEFs primaires ont été isolés à partir d'embryons de souris à E13,5, comme précédemment décrit (Xu, 2005), et ont été cultivés en milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) supplémenté par 0,03 % de L-glutamine, 1 % d'acides aminés non-essentiels (NEAA, *Non-Essential Amino-Acids*), de 50 μ M de β -MercaptoEthanol (β -ME), de 100 UI/mL de pénicilline, de 100 μ g/mL de sulfate de streptomycine et de 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF). Ces cellules ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % (v/v) de CO₂.

MEFs immortalisées et cellules NMuMG

Les conditions de culture des lignées de MEFs immortalisées et NMuMG sont indiquées dans la publication « **TIF1 γ -Deficiency Promotes Mitotic Chromosomal Instability and Tumor Progression** ».

2. Transfections transitoires (siRNA)

Le jour précédent la transfection, les cellules NMuMG sontensemencées en plaque 24 puits à une concentration de 100 000 cellules par puits. La transfection est réalisée en utilisant de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen), selon le protocole fourni par le fabricant.

3. Transductions virales

Transductions adénovirales

Après quelques jours de culture (3 passages), les MEFs primaires ont été transduites avec un vecteur adénoviral permettant l'expression de l'enzyme Cre recombinase fusionnée à la protéine fluorescente eGFP (vecteur Ad5CMVCre-eGFP (Iowa State University) ; MOI (*Multiplicity Of Infection*) : 100).

Transductions rétrovirales

Les MEFs immortalisées et les cellules NMuMG ont été transduites par des vecteurs rétroviraux comme décrit dans la publication « **TIF1 γ -Deficiency Promotes Mitotic Chromosomal Instability and Tumor Progression** ».

RT-qPCR (Reverse-Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction)

Les ARN ont été extraits grâce au kit RNeasy mini (Qiagen), puis 250 ng de ces ARN ont été reverse-transcrits par l'enzyme SuperScript II Reverse Transcriptase en présence d'amorces aléatoires (Invitrogen).

Les RT-qPCR ont été effectuées comme précédemment décrit (Bartholin et al., 2008) grâce au kit MESA GREEN qPCR MasterMix Plus (Eurogentec) sur un thermocycleur Applied Biosystems ABI PRISM 7000 Sequence Detection (Résultats partie I et II). De plus, nous avons également utilisé la technologie d'analyse d'expression génique semi-haut débit Fluidigm BioMark System, selon le protocole fourni par le fabricant (Résultats partie III).

Les valeurs obtenues à partir des duplicats ont été moyennées et comparées en utilisant la méthode CT (*Threshold Cycle*), dans laquelle la quantité d'ADNc ($2^{-\Delta\Delta CT}$) est normalisée à l'expression endogène de la β -Actine ou de la *Gapdh* (ΔCT) (Pommier et al., 2012). L'expression du transcrit d'intérêt dans les cellules contrôles est arbitrairement fixée à 1.

Amorces oligonucléotidiques

Actine Fw 5'-TCACGCCATCCTGCGTCTGGACT-3'

Actine Rev 5'- CCGGACTCATCGTACTCCT-3'

Aurora B Fw 5'-AGATTGGGCGTCCTTTGGGCAAA-3'

Aurora B Rev 5'-GTTGGGATGTTTCAGGTGCGCC-3'

Bub1b Fw 5'-AGGAGCACGGGGTGACGATCT-3'

Bub1b Rev 5'-AGGCACATGGCTTCACTCGCC-3'

Cenpp Fw 5'-ACCTTCAGGGTTCCACGTCGGT-3'

Cenpp Rev 5'-TGATTTCCAGGCTCCGGACGC-3'

Cyclin A2 Fw 5'-GTCCTTGCTTTTGACTTGGCTGC-3'

Cyclin A2 Rev 5'-GTGCCAATGACTCAGGCCAGC-3'

Cyclin B1 Fw 5'-ACAGCTGGTCCGGTGTAAACGGC-3'

Cyclin B1 Rev 5'-CTGCTCGACGTCAACCTCTCCG-3'

Espl1 Fw 5'-GCCCAGACTCGCCTCAAGGTGA-3'

Espl1 Rev 5'-TCCCTTCCTAGTTTGGCCCCGG-3'

Gapdh Fw 5'-CCCAGCAAGGACACTGAGCAAGAG-3'

Gapdh Rev 5'-CTAGGCCCTCCTGTTATTATGGGG-3'

Hprt1 Fw/Rev SuperArray PPH01018B (SA Biosciences)

Kif23 Fw 5'-GCAGCAGGAGCTTGAGAGCCA-3'

Kif23 Rev 5'-TGCCACCCGACGCTCACATT-3'

Mad2L1 Fw 5'-AACTGCAAAAGAGGAAGGTGTTTCGT-3'

Mad2L1 Rev 5'-TGCGGTCCCGATTCTTCCCCT-3'

Nek2 Fw 5'-AGCCTTCGAAGCTGCCGGAC-3'

Nek2 Rev 5'-TCAAGTTCTGGGCCACCAGCCAG-3'

Pbk Fw 5'-AGCGTGCGAGCGTGGACCTAA-3'

Pbk Rev 5'-ACGCTGACCCAGTCCCAAAG-3'

Slug Fw 5'-AAAATTCATGTGATGGATGCAGTAA-3'

Slug Rev 5'-CAGCTCATCCAACACTACACAAGTCA-3'

Smad4 Fw/Rev SuperArray PPM04411A (SA Biosciences)

Snail Fw 5'-CCACTGCAACCGTGCTTTT-3'

Snail Rev 5'-TCTTCACATCCGAGTGGGTTT-3'

Tif1 γ Fw 5'-GAGTCTGTTGGAACATCTGGTCAGCG-3'

Tif1 γ Rev 5'-GGCCTGTGATATCATTCTGCTGCTGT-3'

Ube2c Fw 5'-AGCGTTGCCGCGGTTTCGAAAA-3'

Ube2c Rev 5'-AGTTCCTGCTGTAGCCGCTTGC-3'

Zeb1 Fw 5'-CCGCGCGCAATAACGTTACA-3'

Zeb1 Rev 5'-TACTGTCTGGTCTGCTGGCAGT-3'

Marquages immunofluorescents

Le protocole d'immunofluorescence est décrit dans la publication « **TIF1 γ -Deficiency Promotes Mitotic Chromosomal Instability and Tumor Progression** ».

Anticorps

Anti-CADHERINE-E (1/400 ; BD Biosciences)

Anti-TIF1 γ (1/500 ; Euromedex)

Test de migration en chambre de Boyden

Les cellules ont étéensemencées à une concentration de 100 000 cellules par puits, dans 300 μ L de milieu de culture sans SVF, dans le compartiment supérieur de chambres de Boyden (filtre de 8 μ m de diamètre), positionnées dans des plaques de culture de 24 puits. Puis, 700 μ L de milieu de culture complet est ajouté dans le compartiment inférieur. A la fin de l'expérience, chaque insert est rincé en PBS 1 \times puis est incubé, pendant 30 min, dans 1 mL de solution de Crystal violet 0,1 %. Après rinçage, les cellules n'ayant pas migré et étant donc situées dans le compartiment supérieur sont éliminées à l'aide d'un coton-tige. Les cellules ayant migré sont observées à l'aide d'un microscope inversé Zeiss (\times 4). Les images sont ensuite analysées à l'aide du logiciel ImageJ, afin de déterminer la surface marquée par le Crystal violet.

Croissance cellulaire en agar mou

Le protocole de croissance en agar mou est décrit dans la publication « **TIF1 γ -Deficiency Promotes Mitotic Chromosomal Instability and Tumor Progression** ».

Puce à ADN

1. Préparation des ADN complémentaires

Les ADNc ont été préparés à partir des ARN totaux extraits des différentes lignées de MEFs primaires transduites avec le vecteur Ad5CMVCre-eGFP :

- 3 lignées de MEFs primaires issus de souris sauvages C57BL/6J
- 3 lignées de MEFs primaires issus de souris (fond pur C57BL/6J) présentant une insertion de sites Lox au niveau du locus codant TIF1 γ , permettant ainsi la délétion

d'une partie de ce locus en présence de Cre recombinase (souris *Tif1 γ ^{Lox/Lox}* précédemment décrites [Vincent et al., 2009a]).

2. Puces Microarray Affymetrix

Les ADNc issus des différentes lignées de MEFs primaires ont été hybridés sur des puces microarray (GeneChip Mouse Genome MOE430A 2.0 arrays, Affymetrix) au laboratoire « Genomics Core Laboratory of the Memorial Sloan Kettering Cancer Center » (New York, NY, USA). Une puce est représentative du génome murin entier (45 000 sondes permettant l'analyse de l'expression de plus de 39 000 transcrits, issus de plus de 14 000 gènes murins caractérisés).

3. Analyse des données de microarray

Le contrôle qualité a été effectué grâce à un algorithme computationnel permettant de distinguer le signal spécifique d'hybridation par rapport au bruit de fond. Uniquement les sondes pour lesquelles le ratio Cy5/Cy3 était détectable ont été analysées (les échantillons étant marqués par le Cy5 et les ADNc de référence (témoin positif d'hybridation) par le Cy3). Les transcrits considérés comme dérégulés dans les différentes lignées présentant une inactivation de TIF1 γ ont été identifiés en fonction d'un ratio d'expression $\geq 1,70$ pour les gènes surexprimés et $\leq 0,59$ pour les gènes inhibés, par rapport au niveau d'expression de ces transcrits dans les cellules contrôles. Parmi ces gènes, ont été sélectionnés uniquement ceux dont la valeur moyenne **(1)** était statistiquement différente (Student's *t* test, $p < 0,05$) de la valeur moyenne observée dans la condition contrôle ou **(2)** différait d'au moins deux fois leur déviation standard, par rapport à la valeur moyenne observée dans la condition contrôle.

4. Classification ontologique

La classification fonctionnelle des gènes dérégulés par rapport à la condition contrôle a été réalisée en utilisant le logiciel Gene Ontology Term Finder du Lewis-Sigler Institute for Integrative Genomics (University of Princeton) (accessible *via* le site web : <http://go.princeton.edu/>). Les associations ontologiques (fonctions moléculaires et

processus biologiques) ont été vérifiées en utilisant la base de données UniProtKB (<http://www.uniprot.org/>).

Test de l'activité β -galactosidase

Le marquage β -galactosidase a été effectué comme précédemment décrit (Li et al., 2007). Brièvement, les cellules sont fixées en formaldéhyde 4 % pendant 15 min. Après lavage en PBS 1×, les cellules sont incubées pendant 1 heure à 37°C avec une solution contenant 1 mg/mL X-Gal (Merck).

Marquage par le bleu de toluidine

Le protocole de marquage par le bleu de toluidine est décrit dans la publication « **TIF1 γ -Deficiency Promotes Mitotic Chromosomal Instability and Tumor Progression** ».

Cytométrie en flux

Le protocole d'analyse par cytométrie en flux est décrit dans la publication « **TIF1 γ -Deficiency Promotes Mitotic Chromosomal Instability and Tumor Progression** ».

Western blotting

Le protocole de Western blotting, ainsi que les différents anticorps utilisés, sont décrits dans la publication « **TIF1 γ -Deficiency Promotes Mitotic Chromosomal Instability and Tumor Progression** ».

PERSPECTIVES

Les différents travaux décrits dans le chapitre précédent ont permis de mieux appréhender les fonctions oncosuppressives de TIF1 γ . Néanmoins, de nombreux points restent à élucider, notamment les mécanismes moléculaires impliqués dans la dérégulation du SAC suite à la perte de TIF1 γ , ainsi que l'implication de ses fonctions de régulateur transcriptionnel et de son activité E3-ubiquitine ligase dans les processus de transformation tumorale.

A. Causes et conséquences de la perte de TIF1 γ en carcinogenèse, via son implication dans la progression mitotique

Afin de mieux appréhender l'implication de TIF1 γ en tumorigenèse *via* son rôle dans la progression mitotique, plusieurs questions devront être adressées :

1) Quels sont les mécanismes moléculaires impliqués dans l'échappement à l'arrêt du cycle cellulaire induit par l'inactivation prolongée de TIF1 γ ?

Un acteur du point de contrôle du fuseau mitotique pourrait, aux vues des différentes données de la littérature, être une cible éventuelle pour la mise en place de l'échappement : la kinase **AURORA B**. En effet :

- cette protéine exerce ses fonctions en **amont de la signalisation** du point de contrôle du fuseau mitotique, en permettant le recrutement des différentes protéines du SAC au niveau des kinétochores. Sa dérégulation peut ainsi conduire à une inactivation globale et constitutive du SAC.
- cette kinase est également impliquée dans les mécanismes de cytodierèse, processus altéré suite à la délétion prolongée de TIF1 γ .
- les cellules inactivées pour TIF1 γ , en phase de blocage du cycle cellulaire, présentent une surexpression d'Aurora B (au niveau transcriptionnel et protéique).
- les cellules ayant échappé à ce blocage présentent une inhibition de l'expression d'Aurora B (également au niveau transcriptionnel et protéique).

Ainsi, cette kinase représente une cible potentielle dans la mise en place de l'échappement à l'arrêt du cycle cellulaire médié par la perte de TIF1 γ . Différents inhibiteurs chimiques ciblant Aurora B sont commercialisés : HOI-07 et ZM447439 (Marxer et al., 2014; Xie et al., 2013). L'utilisation de **ces inhibiteurs** sur des cellules présentant **un blocage du cycle cellulaire**, suite à l'inactivation à **court terme** de TIF1 γ , pourrait permettre de déterminer si l'inhibition d'Aurora B induit un **échappement précoce** à l'arrêt de prolifération et entraîne l'apparition d'anomalies mitotiques, comme observé après **l'inactivation prolongée** de TIF1 γ . Ainsi, nous déterminerons si le phénotype induit par l'inhibition d'Aurora B, dans un contexte de blocage du cycle cellulaire médié par la perte de TIF1 γ , mime l'effet de la délétion à long terme de TIF1 γ , indiquant qu'Aurora B est un acteur du mécanisme d'échappement. A l'inverse, des

expériences de surexpression d'Aurora B, dans des cellules délétées pour TIF1 γ et présentant un blocage du cycle cellulaire, permettraient de mettre en évidence une absence d'échappement à cet arrêt de prolifération.

Il sera particulièrement intéressant d'identifier si Aurora B peut être une cible transcriptionnelle directe de TIF1 γ , notamment par la technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP, *Chromatin ImmunoPrecipitation*) (voir paragraphe C) ou une cible de l'activité E3-ubiquitine ligase de TIF1 γ (voir paragraphe D).

2) Quelles sont les **conséquences de l'inactivation de TIF1 γ sur la tumorigénèse** via son implication dans le SAC et l'instabilité chromosomique ?

Nous avons pu mettre en évidence, dans nos modèles *in vitro*, *in vivo* et dans les tumeurs humaines, que la perte de TIF1 γ était corrélée à une augmentation de l'instabilité chromosomique. Afin de déterminer si ce processus est à la base des mécanismes de transformation tumorale, nous analyserons les informations d'instabilité chromosomique disponibles dans les bases de données publiques, telle que TCGA (*The Cancer Genome Atlas*). Nous étudierons plus particulièrement les lésions tumorales colorectales, ce type de cancer présentant une forte propension à l'instabilité chromosomique (85 % des CRC présentent une telle altération génomique). Nous avons déjà pu mettre en évidence que la perte de TIF1 γ dans ces tumeurs est fortement associé à un phénotype d'instabilité chromosomique (voir publication concernant l'implication de TIF1 γ dans le SAC). La comparaison de l'expression de TIF1 γ dans les lésions précancéreuses (adénomes) et dans les tumeurs colorectales établies pourrait permettre de lier chronologiquement la perte de TIF1 γ à l'apparition de l'instabilité chromosomique dans ce type de tumeur.

De plus, nous analyserons « qualitativement » les altérations génomiques afin de déterminer si la perte de TIF1 γ est associée à une « signature » d'instabilité chromosomique et ainsi, définir les gènes spécifiquement altérés par l'inactivation de TIF1 γ .

Ces bases de données nous permettront également de définir si les tumeurs inactivées pour TIF1 γ présentent des caractéristiques de résistance aux chimiothérapies impliquant des agents déstabilisant le fuseau mitotique, comme nous avons pu le mettre en évidence

in vitro. Ces données pourraient permettre d'identifier TIF1 γ comme un nouveau marqueur prédictif de la réponse aux traitements chimiothérapeutiques.

3) Quels sont les mécanismes moléculaires entraînant la diminution d'expression génique de TIF1 γ *in vivo* ?

Enfin, nous étudierons les données d'expressions géniques, de délétions génomiques, de mutations et de méthylations du gène codant TIF1 γ , disponibles dans ces différentes bases de données publiques. Cela nous permettra de déterminer les mécanismes moléculaires responsables de la diminution d'expression de TIF1 γ observée dans de nombreuses tumeurs humaines.

B. Rôle de TIF1 γ dans la dissémination métastatique et l'angiogenèse

Certains de nos résultats préliminaires semblent impliquer TIF1 γ dans les processus d'angiogenèse. En effet, pour notre étude concernant le rôle de TIF1 γ dans la progression mitotique et l'instabilité chromosomique, nous avons réalisé des expériences de greffes cellulaires sur la membrane chorio-allantoïde d'embryon de poulet (*chicken ChorioAllantoic Membrane (CAM) assay*). Ces expériences nous ont permis de mettre en évidence les propriétés tumorigènes des cellules NMuMG délétées pour TIF1 γ , ces dernières entraînant la formation de tumeurs de taille plus importante que celles issues des cellules contrôles.

Cette technique est classiquement utilisée afin de tester l'effet de protéines ou de molécules thérapeutiques sur la dissémination métastatique. En effet, cette technique repose sur le dépôt de cellules au niveau d'un vaisseau sanguin, préalablement lésé, sur la membrane chorio-allantoïde d'embryon de poulet. Elle permet ainsi l'intravasation de cellules pouvant potentiellement entraîner la formation de micrométastases, en particulier au niveau des poumons et du foie de l'embryon. La recherche d'ADN issu des cellules greffées (provenant d'une autre espèce que *Gallus gallus domesticus*), ainsi que les techniques d'immunohistochimie sur les organes de l'embryon permettent de conclure sur la présence de métastases.

De façon intéressante, la greffe de cellules NMuMG transformées et délétées pour TIF1 γ a non seulement engendré la formation de tumeurs de taille importante, mais a aussi entraîné une hypervascularisation significative de la tumeur (présence de nombreux vaisseaux sanguins de large diamètre) (**Figure 45**). Différents problèmes techniques nous ont malheureusement empêchés de mettre en évidence la présence de métastases dans ce modèle. Néanmoins, la mise en place de nombreux vaisseaux sanguins suggère un rôle potentiel de TIF1 γ dans les processus d'angiogenèse.

De plus, nous avons pu mettre en évidence par RT-qPCR et dans notre analyse transcriptomique, la forte expression du marqueur angiogénique *Angptl4* (*Angiopoietin-like 4*) dans les cellules déficientes pour TIF1 γ (MEFs primaires et NMuMG) (**Figure 45**). *Angptl4* augmente la perméabilité vasculaire tout en limitant les interactions cellulaires, afin de promouvoir les mécanismes d'intra- et d'extravasation, à la base de la dissémination métastatique.

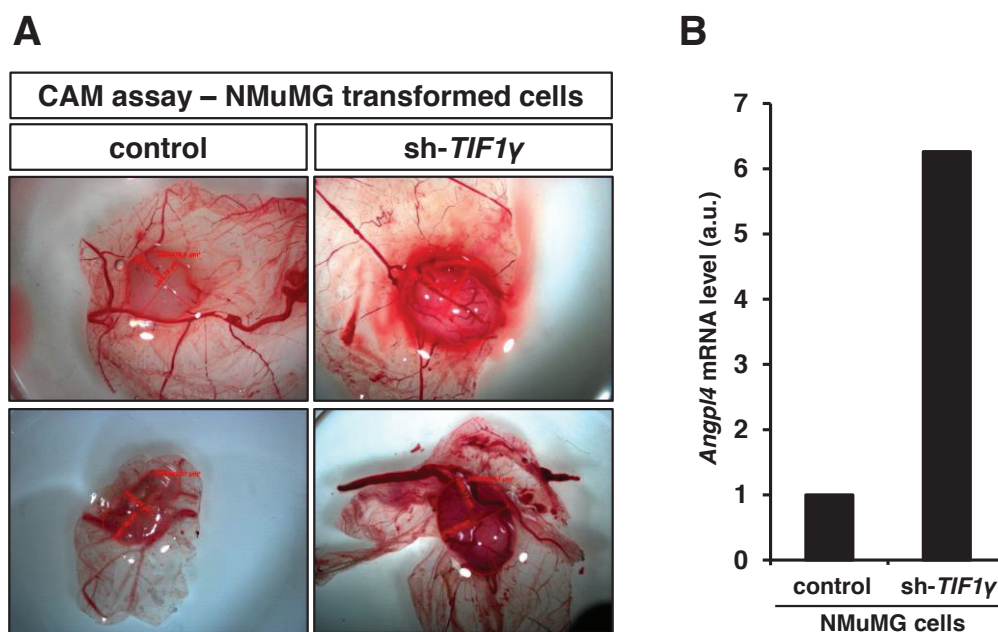


Figure 45 : La perte de TIF1 γ favorise la formation de vaisseaux sanguins péri-tumoraux et entraîne une augmentation de l'expression du facteur Angptl4.

A) Images représentatives de tumeurs issues de *CAM assay* à partir de cellules NMuMG transformées inactivées ou non pour *Tif1* γ . B) Analyse par RT-qPCR de l'expression du gène *Angptl4* dans les cellules NMuMG inactivées ou non pour *Tif1* γ .

Ce facteur a été décrit comme étant une cible transcriptionnelle du TGF β *via* la voie canonique impliquant la protéine SMAD4 (Padua et al., 2008; Valastyan and Weinberg, 2011; Welm, 2008). En effet, l'axe TGF β -SMAD4 exerce des fonctions pro-oncogéniques dans les stades avancés de transformation tumorale, notamment en stimulant l'angiogenèse et en favorisant l'EMT (Inman, 2011; Massagué, 2008; Meulmeester and Ten Dijke, 2011). TIF1 γ pourrait alors agir en tant que suppresseur de tumeur *via* l'inhibition de l'EMT et de l'angiogenèse, deux fonctions médiées par le TGF β et classiquement impliquées dans les processus métastatiques. De plus, le rôle pro-tumoral du facteur *Angptl4* a été mis en évidence dans des tumeurs du sein humaines et murines, dans lesquelles l'expression de TIF1 γ a été décrite comme diminuée au niveau des tumeurs primaires, ainsi que dans les tissus métastatiques en dérivant (Xue et al., 2014). L'étude du rôle de TIF1 γ dans la mise en place de l'angiogenèse et le développement métastatique pourrait alors apporter de nouveaux éléments permettant de mieux appréhender les fonctions anti-tumorales de TIF1 γ .

C. Détermination des cibles transcriptionnelles directes

TIF1 γ , comme tous les autres membres de la famille TIF1, exerce un rôle dans la régulation de la transcription. Notre analyse transcriptomique à grande échelle nous a permis d'identifier de nombreux gènes dont l'expression était dérégulée, aussi bien positivement que négativement en absence de TIF1 γ . Néanmoins, cette analyse ne permet pas de discriminer les cibles transcriptionnelles directes de TIF1 γ . En effet, de nombreux gènes peuvent être dérégulés par des mécanismes impliquant TIF1 γ de façon indirecte, notamment *via* son activité E3-ubiquitine ligase pouvant cibler d'autres régulateurs transcriptionnels, comme cela a été mis en évidence dans les processus de différenciation (voir paragraphe II-B-1 sur le rôle de TIF1 γ dans le développement embryonnaire et la différenciation cellulaire). Afin d'identifier les cibles directes de l'activité transcriptionnelle de TIF1 γ , nous réaliserons un criblage par CHIP-Sequencing et comparerons les résultats obtenus avec nos données d'analyse transcriptomique.

Certains résultats préliminaires (données non montrées) suggèrent que TIF1 γ serait un médiateur de la répression transcriptionnelle induite par le TGF β , et ce, en coopération avec la protéine SMAD4. Il sera alors particulièrement intéressant d'étudier les gènes modulés par SMAD4, notamment ceux impliqués dans l'EMT, afin de déterminer si ces deux protéines exercent leurs fonctions transcriptionnelles sur les mêmes régions promotrices.

La dérégulation des gènes mitotiques en absence de TIF1 γ , mise en évidence par puce à ADN et validée par les techniques de qPCR classique dans différents types cellulaires, suggèrent également l'implication de TIF1 γ dans la transcription des acteurs de la progression mitotique. Nous déterminerons si ces gènes constituent des cibles directes de TIF1 γ , afin de définir son implication dans la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans la mitose et le point de contrôle du fuseau mitotique, et ainsi mieux appréhender les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'échappement au blocage du cycle cellulaire induit par la perte de TIF1 γ .

D. Implication de l'activité E3-ubiquitine ligase

5. Expression d'une protéine TIF1 γ dépourvue d'activité E3-ubiquitine ligase

Nos travaux indiquent que TIF1 γ est à la fois un régulateur de l'EMT médiée par l'axe TGF β -SMAD4 et un régulateur de la progression mitotique. Ces deux fonctions impliquent potentiellement son activité E3-ubiquitine ligase :

- 1) TIF1 γ a été décrit comme mono-ubiquitinant SMAD4, ce qui permet sa délocalisation cytoplasmique et ainsi l'inhibition de son activité transcriptionnelle (voir paragraphe II-B-1-ii sur le rôle de TIF1 γ sur la différenciation des tissus embryonnaires).
- 2) Les mécanismes d'ubiquitination sont fondamentaux dans la régulation de la progression du cycle cellulaire, notamment l'inhibition du point de contrôle du fuseau mitotique (complexes SCF, APC/C-cdc20 et APC/C-cdh1) (voir paragraphe I-A-2 sur les bases moléculaires des différentes phases du cycle cellulaire).

Afin de déterminer l'implication de cette activité enzymatique dans la régulation de l'EMT et de la progression mitotique médiée par TIF1 γ , nous avons généré, au laboratoire, un vecteur permettant l'expression de la protéine TIF1 γ humaine inactivée pour son activité E3-ubiquitine ligase. Ce plasmide code pour une protéine mutée au niveau des cystéines 125 et 128, toutes deux remplacées par des résidus alanines (**Figure 46**). Ces mutations dans le domaine RING finger ont été précédemment décrites pour inhiber l'activité ubiquitine ligase en empêchant la formation du pont thioester permettant l'interaction de l'enzyme avec les molécules d'ubiquitine (Dupont et al., 2005; Huibregtse et al., 1995; Li et al., 1999; Xi et al., 2011).

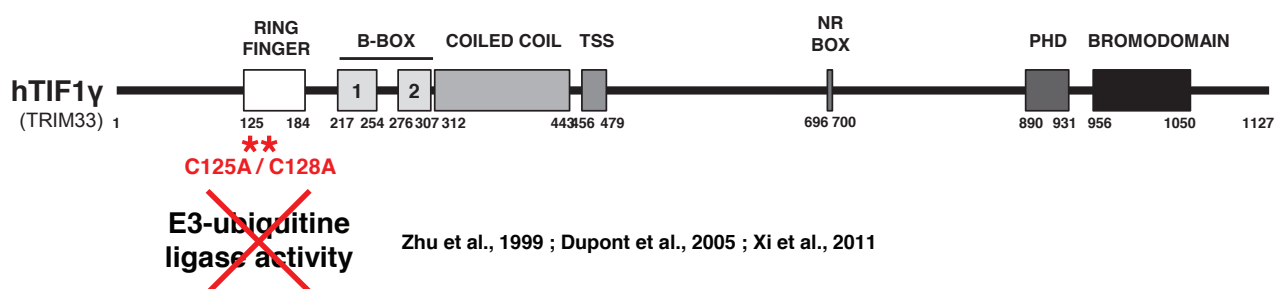


Figure 46 : Représentation de la protéine TIF1 γ mutée pour son activité E3-Ubiquitine ligase.

L'expression de cette protéine dépourvue d'activité E3-ubiquitine ligase dans des cellules déficientes pour la forme sauvage de TIF1 γ permettra de définir le rôle de cette activité ligase dans les mécanismes cellulaires régulés par TIF1 γ .

Nous étudierons si l'implication de TIF1 γ dans l'EMT médiée par le TGF β fait intervenir son activité E3-ubiquitine ligase, notamment en analysant l'ubiquitination et la relocalisation cytoplasmique de SMAD4. De plus, nous nous intéresserons au rôle de cette activité ligase dans la régulation de la progression mitotique, en analysant le phénotype et la prolifération de cellules exprimant la protéine TIF1 γ n'ayant plus d'activité E3-ubiquitine ligase. Nous étudierons également dans ces cellules l'expression des différentes protéines impliquées dans le point de contrôle du fuseau mitotique, plus particulièrement les protéines du SAC (Aurora B, MAD2, BUBR1...) et les substrats du complexe APC/C-cdc20 (Cycline A, Cycline B, Sécurine ...), afin de déterminer si ces protéines sont la cible de l'activité ligase de TIF1 γ . Enfin, nous rechercherons les cibles potentielles de cette activité enzymatique grâce à la réalisation d'un criblage protéique permettant d'isoler l'ensemble des protéines ubiquitinylées. Pour cela, les cellules seront transduites par un vecteur permettant l'expression de la protéine ubiquitine fusionnée à une étiquette poly-histidine. Les extraits protéiques issus de ces cellules seront purifiés sur colonne de nickel, avant d'être analysés par spectrométrie de masse. Ainsi, nous pourrons comparer « l'ubiquitome » des cellules exprimant la protéine TIF1 γ mutée avec celui des cellules contrôles et identifier les cibles de l'activité E3-ubiquitine ligase de TIF1 γ .

6. Modèle murin « Flex »

Ce mutant nous permettra également de définir l'implication de l'activité ligase de TIF1 γ dans ses fonctions anti-tumorales. En effet, les E3-ubiquitine ligases jouent un rôle clé en carcinogénèse compte-tenu de leur rôle primordial dans divers processus biologiques ([Lipkowitz and Weissman, 2013](#); [Nakayama and Nakayama, 2006](#)). De plus, les seules fonctions anti-tumorales de TIF1 γ , aujourd'hui décrites (régulation de l'EMT et du SAC), impliquent potentiellement son activité E3-ubiquitine ligase. Nous génèrerons donc un nouveau modèle murin transgénique exprimant conditionnellement une protéine TIF1 γ catalytiquement inactive pour son activité E3-ubiquitine ligase. Afin d'obtenir des animaux dans lesquels TIF1 γ est exprimée sous sa forme sauvage en absence de Cre

recombinase et sous sa forme mutée en présence de Cre, nous utiliserons la stratégie Flex®. Cette stratégie de recombinaison repose sur deux principes :

- 1) Les sites LoxP, cibles de l'activité enzymatique de la Cre, sont recombinaisonnés s'ils sont positionnés dans le même sens (5'-3' / 5'-3'), mais sont inversés s'ils sont positionnés de façon inverse (5'-3' / 3'-5') (**Figure 47**) (Schnütgen et al., 2003).

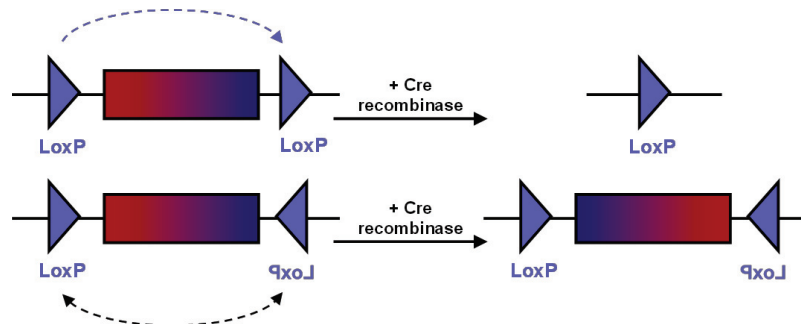


Figure 47 : Action de la Cre recombinase sur les sites LoxP en fonction de leur orientation.

- 2) Il existe des séquences de sites LoxP mutés (notamment les sites Lox511) ayant la capacité de recombinaison ensemble mais pas avec les sites LoxP sauvages. La Cre recombinase reconnaît efficacement ces deux séquences Lox et permet donc leur recombinaison de façon indépendante (Siegel et al., 2001).

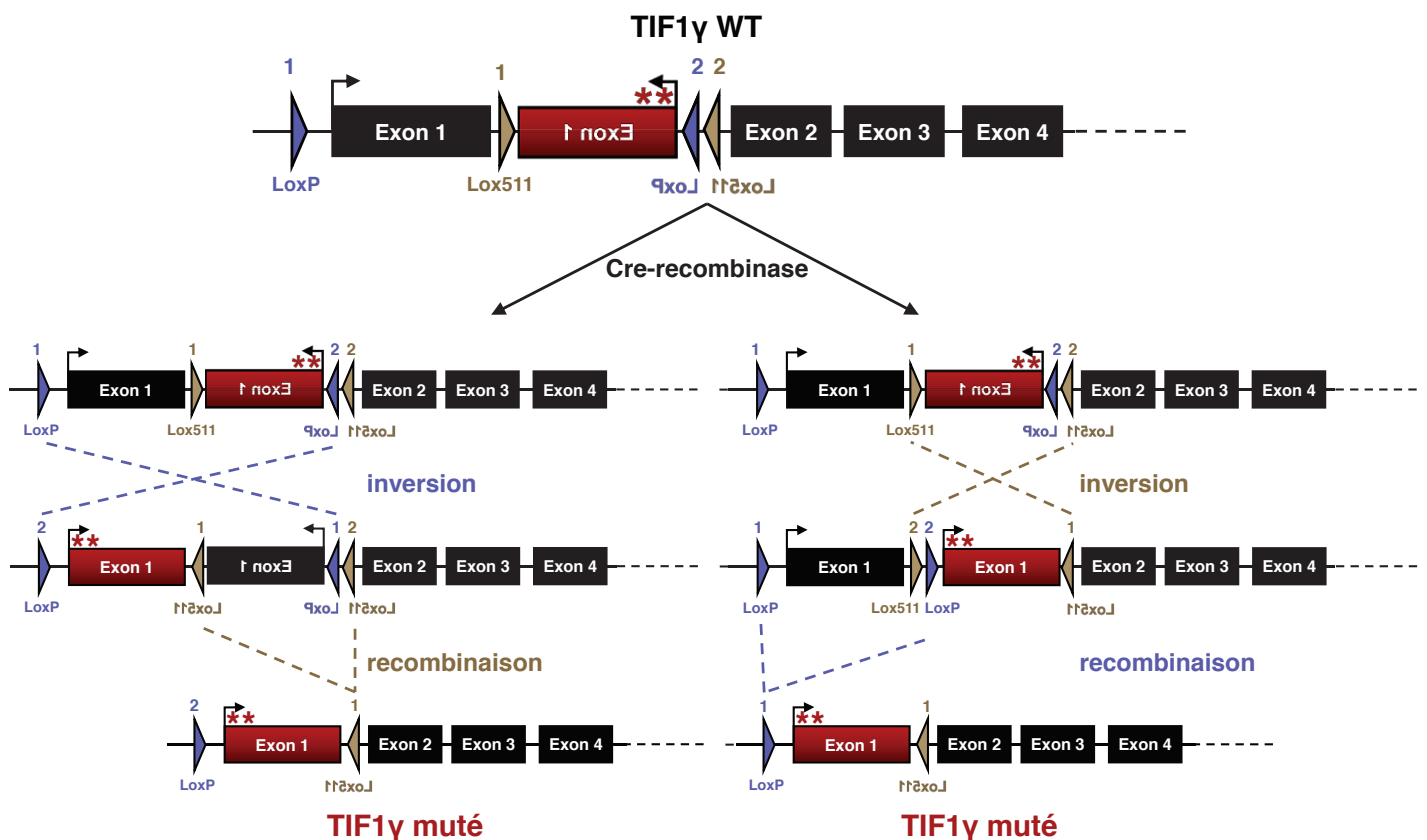


Figure 48 : Stratégie de recombinaison du modèle murin Flex.

Cette stratégie nous permettra de générer le modèle murin conditionnel *TIF1 γ ^{Flex CC/AA}*, dans lequel nous insérerons, suite à l'exon 1 sauvage, un exon 1 muté positionné dans le sens 3'-5', afin qu'il ne puisse pas être transcrit en absence de Cre recombinase, n'étant pas dans le cadre de lecture imposé par l'exon sauvage. De plus, les sites LoxP et Lox511 seront localisés de sorte que l'action de la Cre recombinase entraîne l'inversion de l'exon muté, puis la délétion de l'exon sauvage, permettant alors la transcription de la version catalytiquement inactive de TIF1 γ (**Figure 48**).

Le croisement de ces souris avec le modèle [*Pdx1-Cre*; *Kras^{G12D}*], que nous utilisons couramment au laboratoire, permettra d'analyser le développement tumoral pancréatique potentiellement médié par l'absence d'activité E3-ubiquitine ligase de TIF1 γ . Nous pourrions alors comparer le phénotype obtenu avec celui des tumeurs pancréatiques issues des animaux présentant une inactivation de la protéine TIF1 γ entière (Vincent et al., 2009a, 2012).

7. Partenaires protéiques

Enfin, dans le but de déterminer les partenaires protéiques de TIF1 γ et ainsi potentiellement identifier les cibles de son activité E3-ubiquitine-ligase, nous avons réalisé un criblage double-hybride chez la levure, en utilisant la technique originale du CytoTrap[®], en collaboration avec la plateforme de « Double-Hybride » (dirigée par le Dr. Nelson Dusetti) de l'unité INSERM U1068 (Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille). Cette méthode utilise un système rapporteur d'interaction au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique de levures protéines (système Ras/Sos), contrairement au criblage en double-hybride « classique » reposant sur un système rapporteur d'interaction nucléaire (Aronheim, 1997; Broder et al., 1998). La technique du CytoTrap[®] présente ainsi l'avantage de limiter la détection de « faux-positifs » due à l'utilisation de protéines possédant une activité transcriptionnelle intrinsèque (notamment comme TIF1 γ). Néanmoins, les résultats préliminaires obtenus jusqu'alors sur certaines cibles identifiées par ce criblage ne nous ont pas permis de mettre en évidence la corrélation fonctionnelle entre TIF1 γ et ces protéines (essai rapporteur luciférase, Western blotting et RT-qPCR), malgré la validation de leur interaction physique par immunoprécipitation.

Afin d'identifier les complexes multi-protéiques dans lesquels TIF1 γ pourrait intervenir *in vivo*, nous effectuerons une recherche de partenaires protéiques de TIF1 γ par la technique du « Tap-Tag » (**Figure 49**). Contrairement au double-hybride, permettant une analyse d'interaction uniquement entre deux protéines (TIF1 γ et une protéine cible), la technique du Tap-Tag permet l'identification de complexes multimériques au sein de lignées cellulaires *in vivo*, de façon indépendante de leur localisation subcellulaire.

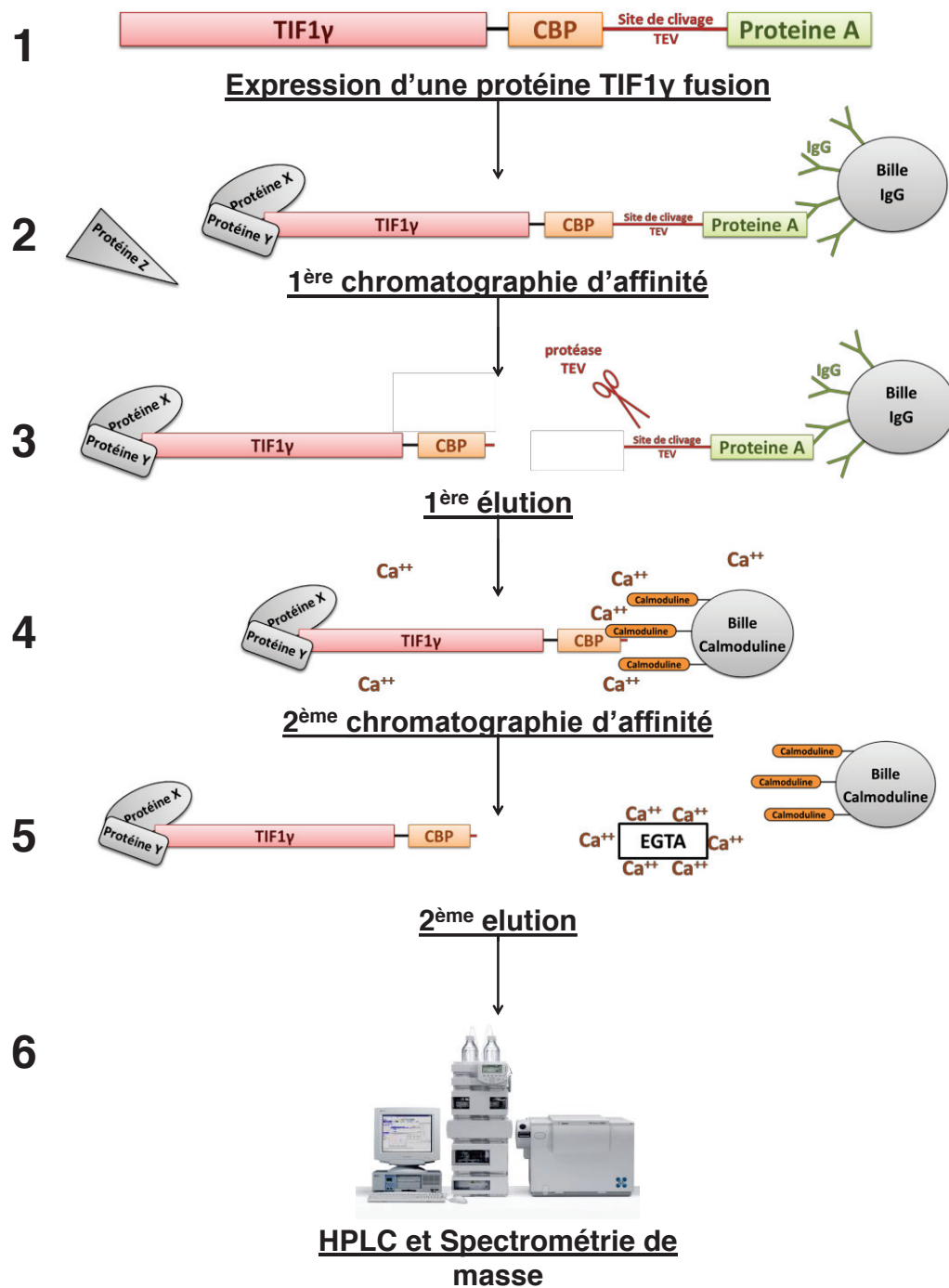


Figure 49 : Criblage d'interactants protéiques par la technique du « Tap-Tag ».

Pour cela, nous allons cloner l'ADNc de TIF1 γ fusionné à une étiquette constituée de deux domaines d'affinité : CBP (*Calmodulin Binding Peptide*) et la protéine A, séparés par un site de clivage reconnu par la protéine TEV. L'avantage de cette technique, par rapport à une simple immunoprécipitation, est l'utilisation de deux étiquettes qui permet d'effectuer une double élution, et ainsi de diminuer les interactants aspécifiques (**Figure 49**) :

- 1) Les cellules sont transfectées par le vecteur codant la protéine TIF1 γ fusion
- 2) la protéine TIF1 γ « *taguée* » associée à ses divers interactants est premièrement immunoprécipitée *via* des billes couplées à des IgG, ayant une forte affinité pour la protéine A
- 3) l'ajout de la protéase TEV permet l'élution de la fraction immunoprécipitée
- 4) la seconde chromatographie d'affinité s'effectue sur une colonne contenant des billes couplées à la Calmoduline en présence d'ions calcium, permettant la fixation de la région CBP de la protéine de fusion
- 5) l'ajout d'EGTA (Acide Ethylène Glycol Tétracétique), chélatant les ions calcium et inhibant ainsi l'interaction entre la calmoduline et le peptide CBP, permet la seconde élution
- 6) Les protéines éluées sont ensuite séparées par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC), puis identifiées par spectrométrie de masse.

La comparaison des résultats obtenus par la technique du Tap-Tag et celle du CytoTrap®, ainsi que la validation biochimique et fonctionnelle des interactants permettront d'identifier certaines cibles de l'activité E3-ubiquitine ligase de TIF1 γ et ainsi mettre en évidence de nouvelles fonctions potentiellement impliquées dans son rôle suppresseur de tumeur.

AUTRES PUBLICATIONS

I. Analyse de l'inductibilité du promoteur *hNUPR1* par le TGF β

The human *NUPR1/P8* gene is transcriptionally activated by transforming growth factor β via the SMAD signalling pathway.

Roxane M. Pommier*, Johann Gout*, David F. Vincent, Carla E. Cano, Bastien Kaniewski, Sylvie Martel, Jonathan Rodriguez, Geneviève Fourel, Ulrich Valcourt, Julien C. Marie, Juan L. Iovanna, Laurent Bartholin.

***Biochem. J.* (2012). 445, 285–293.**

* *co-premiers auteurs*

The human *NUPR1/P8* gene is transcriptionally activated by transforming growth factor β via the SMAD signalling pathway

Roxane M. POMMIER*^{†‡§||}, Johann GOUT*^{†‡§||}, David F. VINCENT*^{†‡§||}, Carla E. CANO¶, Bastien KANIEWSKI*^{†‡§||}, Sylvie MARTEL*^{†‡§||}, Jonathan RODRIGUEZ*^{†‡§||}, Geneviève FOUREL*^{†‡§||}, Ulrich VALCOURT*^{†‡§||}, Julien C. MARIE*^{†‡§||}, Juan L. IOVANNA¶ and Laurent BARTHOLIN*^{†‡§||}²

*Inserm U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69008 Lyon, France, †CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69008 Lyon, France, ‡Université de Lyon, F-69000 Lyon, France, §Université Lyon 1, F-69000 Lyon, France, ||Centre Léon Bérard, F-69000 Lyon, France, and ¶Inserm U624, Stress Cellulaire, Parc Scientifique et Technologique de Luminy, F-13228 cedex 09 Marseille, France

NUPR1 (nuclear protein 1), also called P8 (molecular mass 8 kDa) or COM1 (candidate of metastasis 1), is involved in the stress response and in cancer progression. In the present study, we investigated whether human *NUPR1* expression was regulated by TGF β (transforming growth factor β), a secreted polypeptide largely involved in tumorigenesis. We demonstrate that the expression of *NUPR1* was activated by TGF β at the transcriptional level. We show that this activation is mediated by the SMAD proteins, which are transcription factors specifically involved in the signalling of TGF β superfamily members. *NUPR1* promoter analysis reveals the presence of a

functional TGF β -response element binding the SMAD proteins located in the genomic DNA region corresponding to the 5'-UTR (5'-untranslated region). Altogether, the molecular results of the present study, which demonstrate the existence of a TGF β /SMAD/NUPR1 activation cascade, open the way to consider and investigate further a new mechanism enabling TGF β to promote tumorigenesis by inducing stress resistance.

Key words: cytokine, nuclear protein 1 (NUPR1), promoter, SMAD, stress, transforming growth factor β (TGF β).

INTRODUCTION

A cell constantly receives a multitude of signals informing it about its condition and that of its environment. When it receives signals threatening its integrity or its ability to function (exposure to toxic substances or radiation, thermal or osmotic stress, or a lack of nutrients or oxygen etc.), a cell expresses stress proteins in order to deal with these attacks [1]. This stressed state, permitting the cell to survive such hostile conditions, may be transitory (acute stress), after which there is a return to normal conditions, or permanent (chronic stress), part of a more long-term adaptive process. Whether transient or permanent, this stressed state has the aim of ensuring that the cell survives and continues to perform its functions. If the conditions of stress become incompatible with maintaining the biological functions normally carried out by the cells, these cells are 'eliminated' by fail-safe programmes such as apoptosis or senescence.

To ride out these detrimental conditions, cancer cells frequently hijack and take advantage of the survival signals provided by the stress proteins, while avoiding fail-safe programs [2]. The combined effect of these two events (survival stimulus from the stress proteins and avoiding the fail-safe programs) gives cancer cells a selective benefit, which results in uncontrolled tumour growth. During tumour progression, cancer cells must resist diverse stress factors, such as a lack of nutrients and oxygen, the presence of pro-apoptotic and cytostatic factors secreted in the tumoural microenvironment, and repeated attacks by the

immune system. To survive in such hostile conditions, cancer cells express numerous stress proteins, which are more or less specific to a given stress factor.

Among these, the protein NUPR1 (nuclear protein 1), also called P8 (molecular mass 8 kDa) or COM1 (candidate of metastasis 1), has been found to be expressed in the pancreas of rats suffering from pancreatitis as a reaction to the injection of sodium taurocholate into the main pancreatic duct in order to create severe chemical stress [3]. NUPR1 is an evolutionarily conserved protein (it is present in *Drosophila*, *Xenopus*, nematodes and mammals). It is structurally related to the HMG (high-mobility group) transcriptional regulators, which are involved in the stress response and in cancer progression through their effect on chromatin remodelling and transcription. NUPR1 has been shown to interact with the histone acetylation-regulating factor MSL1 (male-specific lethal 1 homologue), suggesting that NUPR1 may be implicated in chromatin remodelling [4]. NUPR1 also interacts with various factors controlling the cell cycle, programmed cell death and autophagy [5]. The functional relevance of these interactions remains elusive.

TGF β (transforming growth factor β) is a secreted polypeptide that is part of a large family of cytokines and growth factors, including TGF β s, BMPs (bone morphogenetic proteins) and activins [6,7]. The 'canonical' signalling pathway activated by TGF β family members is mediated by the SMAD family of transcription factors. Contrasting with its tumour suppressor role in the majority of untransformed cells, TGF β behaves like a

Abbreviations used: CHIP, chromatin immunoprecipitation; COM1, candidate of metastasis 1; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DTT, dithiothreitol; EMSA, electrophoretic mobility-shift assay; EST, expressed sequence tag; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GST, glutathione transferase; HEK, human embryonic kidney; MH2, MAD homology 2; MEF, mouse embryonic fibroblast; NUPR1, nuclear protein 1; P8, molecular mass 8 kDa; PAI-1, plasminogen activator inhibitor-1; P/S, penicillin and streptomycin mix; qPCR, quantitative PCR; RT-qPCR, reverse transcription quantitative PCR; SBE, SMAD-binding element; siRNA, small interfering RNA; TGF β , transforming growth factor β ; T β R, TGF β receptor; 5'-UTR, 5'-untranslated region.

¹ These authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed (email laurent.bartholin@lyon.unicancer.fr).

pro-oncogenic factor in most transformed tissues by stimulating EMT (epithelial-mesenchymal transition), immunosuppression and the remodelling of the extracellular matrix [8,9]. We showed that *NUPRI* was involved in TGF β -induced tumour aggressiveness, establishing for the first time a functional interaction between TGF β and a stress protein such as NUPRI [9a].

In the present study we investigate whether human *NUPRI* is a direct molecular target of TGF β . We show that the expression of the *NUPRI* is activated by TGF β at the transcriptional level through the SMAD signalling pathway. We cloned a 2340 bp *NUPRI* promoter fragment (spanning nucleotide residues -2111 to +229) and identified a functional TGF β regulatory sequence binding the SMAD proteins in a genomic region corresponding to the 5'-UTR (5'-untranslated region).

MATERIALS AND METHODS

Plasmid constructs

The *NUPRI* gene is located on the negative strand of chromosome 16 in position 16p11.2. The complete sequence of the *NUPRI* promoter is available in GenBank[®] (NC_000016). The transcription start codon is predicted by the ENSEMBL database (ENST00000324873) and the EST (expressed sequence tag) database (accession number BM751285). The nucleotide positions in the present study are relative to this predicted transcription start site (+1). We noted the existence of an alternative transcription start located upstream from the putative TATA box as suggested by the existence of another EST 42 bp upstream (accession number BP214401).

Different genomic DNA fragments corresponding to the *NUPRI* promoter were cloned into the luciferase pGL3-basic (Promega) reporter plasmid. Human genomic DNA (Promega) was used as a PCR template (PrimeSTAR[™] HS, TaKaRa) to clone the different fragments of the *NUPRI* promoter: (-2111/+229), (-2111/+208), (-2111/+152), (-2111/+117), (-2111/+105), (-2111/+86), (-2111/+71), (-2111/+1) and (+1/+229). Amplified fragments were cloned in the pGL3-basic-Luciferase vector by homologous recombination (In-Fusion HD Cloning Kit, Clontech). All of the constructs were verified by sequencing (GATC Corporation). Mammalian expression vectors pcDNA3.1-SMAD3 and pcDNA3.1-SMAD4 were provided by Peter Ten Dijke (Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands) and described in [10] and Aristidis Moustakas [11] (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden) respectively. Bacterial GST (glutathione transferase)-SMAD3 Δ C fusion protein expression vector was provided by A. Mauviel [12] (Curie Institute, Orsay, France).

Cell culture

The HepG2 (human hepatocellular carcinoma) and HEK (human embryonic kidney)-293T cancer cell lines were obtained from the A.T.C.C. and cultured in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), supplemented with 0.03% L-glutamine and containing 10% FBS (fetal bovine serum) and P/S (a mix of 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin sulfate). Colo 357 cells (human pancreatic adenocarcinoma) (a gift from Dr Caroline Hill, Cancer Research UK, London Research Institute, London, U.K.) were cultured in RPMI medium supplemented with 0.03% L-glutamine and containing 10% FBS and P/S. Immortalized MEFs (mouse embryonic fibroblasts) prepared from *Smad4*^{lox/lox} embryos [13] were generated in our laboratory. Briefly, *Smad4*^{lox/lox} MEFs were isolated from E12.5 (embryonic

day 12.5) mouse embryos and spontaneously immortalized through successive passages. MEFs were cultured in DMEM supplemented with 0.03% L-glutamine and containing 10% FBS, 1% non-essential amino-acids and P/S. MEFs were infected either with an empty retroviral vector (pBABE-wt) or a Cre-expressing retroviral vector (pBABE-Cre). After infection, MEFs were cultured in the presence of 3 μ g/ml puromycin (Invivogen) to select stably infected cells. All cell lines were propagated at 37°C under 5% (v/v) CO₂ atmosphere. Recombinant human TGF β 1 was purchased from Peprotech and was used at a 10 ng/ml final concentration. Actinomycin D was purchased from Sigma-Aldrich and was used at a 5 μ g/ml final concentration.

RNA interference experiments

Colo 357 cells were seeded and reverse-transfected in 24-well plates (10⁵ cells per well), with Lipofectamine[™] 2000 (Invitrogen) and 20 pmol of control siRNA (small interfering RNA) or siRNA directed against *SMAD4* (Invitrogen). Culture medium was changed 6 h after transfection and, 2 days after transfection, cells were treated with TGF β for 24 h.

Reporter assays

Cells were seeded the day before transfection into 12-well plates (10⁵ cells per well for HEK-293T cells and 1.5 \times 10⁵ cells per well for HepG2 cells). Transient transfections (Exgen 500, Euromedex) were performed using luciferase pGL3-basic reporter plasmids (Promega) encoding firefly luciferase under the control of different fragments of the *NUPRI* promoter. phRL-CMV vector (Promega) encoding *Renilla* luciferase under the control of the CMV (cytomegalovirus) ubiquitous promoter was co-transfected in order to determine the transfection efficiency and to normalize firefly luciferase values. Where indicated, expression vectors encoding SMAD3 and SMAD4 proteins were also co-transfected. The total amount of transfected material was kept constant (750 ng) using pcDNA3.1 empty vector (Invitrogen). The day after transfection, cells were treated with TGF β . At 24 h after TGF β treatment, firefly and *Renilla* luciferase activities were quantified in whole-cell lysates (Passive Lysis Buffer, Promega) using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). The firefly luciferase activity was normalized with regard to the *Renilla* luciferase activity, and the ratios were related to the basal condition (untreated cells) arbitrarily set at 1.0. Experiments were performed in triplicate.

RT-qPCR (reverse transcription quantitative PCR)

As described previously [14], total RNAs were extracted from the different cell lines (HEK-293T, Colo 357, HepG2 and MEFs) using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). First-strand cDNAs were prepared using 250 ng of RNA and SuperScriptII Reverse Transcriptase in the presence of random primers (Invitrogen), after incubation with DNase I (Invitrogen). qPCR (quantitative PCR) was performed using an Applied Biosystems ABI PRISM 7000 Sequence Detection thermocycler (annealing temperature 60°C) and iTaq SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories). Primers (Sigma-Aldrich) used for qPCR are presented in Supplementary Table S1 (at <http://www.BiochemJ.org/bj/445/bj4450285add.htm>). As described previously [15], all of the real-time values were averaged and compared using the threshold cycle (C_T) method, where the amount of target RNA ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) is normalized to the endogenous *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) or *HPRT* (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) expression

reference (ΔC_T). The amount of target in untreated cells was set as the calibrator at 1.0. Experiments were performed in duplicate.

Western blotting

Total protein extracts (20 μ g) were prepared using RIPA lysis buffer [50 μ M Tris, pH 7.5, 150 μ M NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS and commercial protease and phosphatase inhibitor cocktail tablets (Roche)] from Colo 357 cells and MEFs, and were subjected to electrophoresis on SDS/PAGE (10% gels). The separated proteins were transferred on to PVDF membranes (Millipore) by electroblotting. Rabbit monoclonal anti-SMAD4 (1:1000 dilution, Epitomics) and mouse monoclonal anti- β -actin (1:5000 dilution, Sigma-Aldrich) were used as primary antibodies. Goat anti-rabbit IgG (1:10 000 dilution, Dako) and rabbit anti-mouse IgG (1:10 000 dilution, Dako) were used as secondary antibodies. Western blots were revealed using the ECL Western detection system (GE Healthcare).

EMSA (electrophoretic mobility-shift assay)

The genomic DNA region corresponding to the 5'-UTR of *NUPR1* (+1/+229), used as a probe for EMSAs, was amplified by PCR (see Supplementary Table S1 for primer sequences) using the pGL3-*hNUPR1* (+1/+229)-Luc vector as a template. After enzymatic digestion by KpnI and NheI, probes were labelled at their 3' extremity by biotinylation (Biotin 3' End DNA Labelling kit, Thermo Scientific). The nuclear extracts were prepared from 8×10^7 HepG2 cells treated or not with TGF β for 45 min. Cells were washed with PBS and further lysed in a hypotonic buffer [10 mM Hepes, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.1% Nonidet P40, 1 mM DTT (dithiothreitol), 2 mM NaVO₃, 10 mM NaF and commercial protease inhibitor cocktail tablets (Roche)]. After 15 min of incubation on ice, nuclei were centrifuged and washed twice with the above-described buffer. Then, chromatin proteins were extracted using a hypertonic buffer (20 mM Hepes, pH 7.9, 25% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF in DMSO and 0.5 mM DTT). Protein concentrations in cleared lysates were then measured using a commercial kit (Bio-Rad Protein Assay). A 1 μ g portion of recombinant proteins, e.g. GST (wild-type, Santa Cruz Biotechnology) or GST-SMAD3 Δ C [16], were incubated with the 3'-labelled probes (20 fmol) for 20 min at room temperature (23 °C) in the presence of 50 ng/ml poly(dI-dC) in 1 \times binding buffer (LightShift Chemiluminescent EMSA kit, Thermo Scientific) as described previously [17]. For competition assays with antibodies, 0.25 μ g of nuclear extracts were pre-incubated for 20 min at room temperature with antibodies directed against SMAD4 (rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology), SMAD7 (goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology) or GAPDH (goat polyclonal IgG, Abcam), followed by 20 min of incubation at room temperature of the labelled probes (20 fmol) in the presence of 50 ng/ml poly(dI-dC) in 1 \times binding buffer. Protein-DNA complexes were resolved on a non-denaturing 4% polyacrylamide gel (pre-run for 30 min at 100 V) in 0.5 \times TBE for 60 min at 100 V and transferred on to Hybond N+ membrane in 0.5 \times TBE for 45 min at 100 V. DNAs were cross-linked to the membrane for 10 min (312 nm irradiation) and revealed using a horseradish peroxidase-conjugated streptavidin system (LightShift Chemiluminescent EMSA kit, Thermo Scientific).

ChIP (chromatin immunoprecipitation)

Colo 357 cells (10^7) were treated with or without TGF β for 45 min and ChIP assay was performed following the

manufacturer's protocol (ChIP assay kit, Millipore) [18]. Briefly, chromatin was cross-linked with formaldehyde and subjected to immunoprecipitation using either anti-SMAD4 (rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology) or control rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology) antibodies. Following reversal of the cross-links, DNA was extracted according the standard phenol/chloroform procedure and analysed by qPCR performed using specific primers presented in Supplementary Table S1. All the results obtained are represented as percentage of input values and normalized to the values observed in untreated conditions, arbitrarily set at 1.0.

Statistics

Results were represented as means \pm S.E.M. or S.D. Statistical significance was tested using Student's *t* test ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$). Means, S.E.M. or S.D. and Student's *t* test were representative of three independent experiments.

RESULTS

TGF β activates the transcription of the *NUPR1* gene

To investigate *NUPR1* activation by TGF β , we studied the accumulation of *NUPR1* transcripts in response to TGF β in diverse cell types known for their sensitivity to this cytokine. HepG2 cells, Colo 357 cells, MEFs and HEK-293T cells were used (Figure 1A). The amount of *NUPR1* mRNA was significantly increased in HEK-293T (2-fold), HepG2 (3-fold), MEFs (4-fold) and Colo 357 (7-fold) cell lines in the presence of TGF β as compared with untreated cells.

We subsequently studied the kinetic accumulation of *NUPR1* mRNA in response to TGF β . We used the Colo 357 cells, which exhibited the highest up-regulation of *NUPR1* gene expression in response to TGF β . Colo 357 cells were therefore treated with TGF β for a range of periods (from 0.5 h to 24 h) and the expression of *NUPR1* mRNA was analysed. RT-qPCR results (Figure 1B) showed that increasing amounts of *NUPR1* transcripts were detectable as early as 1 h after the beginning of TGF β treatment. This rapid accumulation of *NUPR1* mRNA is suggestive of a TGF β direct effect.

Next, we explored whether the accumulation of *NUPR1* transcripts in response to TGF β treatment was due to a transcriptional activation. For this, we tested whether the transcription inhibitor actinomycin D could compromise *NUPR1* activation by TGF β . Colo 357 cells were treated with TGF β and actinomycin D, alone or in combination, for 12 h or 24 h. As shown in Figure 1(C), the TGF β -mediated up-regulated expression of *NUPR1* is totally inhibited by the presence of actinomycin D. This result demonstrates that the *NUPR1* mRNA level is transcriptionally modified by TGF β .

SMAD-dependent transcriptional activation of human *NUPR1* by TGF β

The TGF β signalling pathway involves two kinase receptors, T β RI (TGF β receptor type I) and T β RII. The SMAD proteins mediate the 'canonical' signalling pathway in response to TGF β . After binding to its receptors, TGF β induces the phosphorylation of T β RI, which in turn phosphorylates SMAD2 and SMAD3 proteins (R-SMADs). Phosphorylated SMAD2 and SMAD3 proteins then interact with the common SMAD4 (Co-SMAD) protein. The SMAD2-SMAD3-SMAD4 complex accumulates within the nucleus, binds to DNA and activates

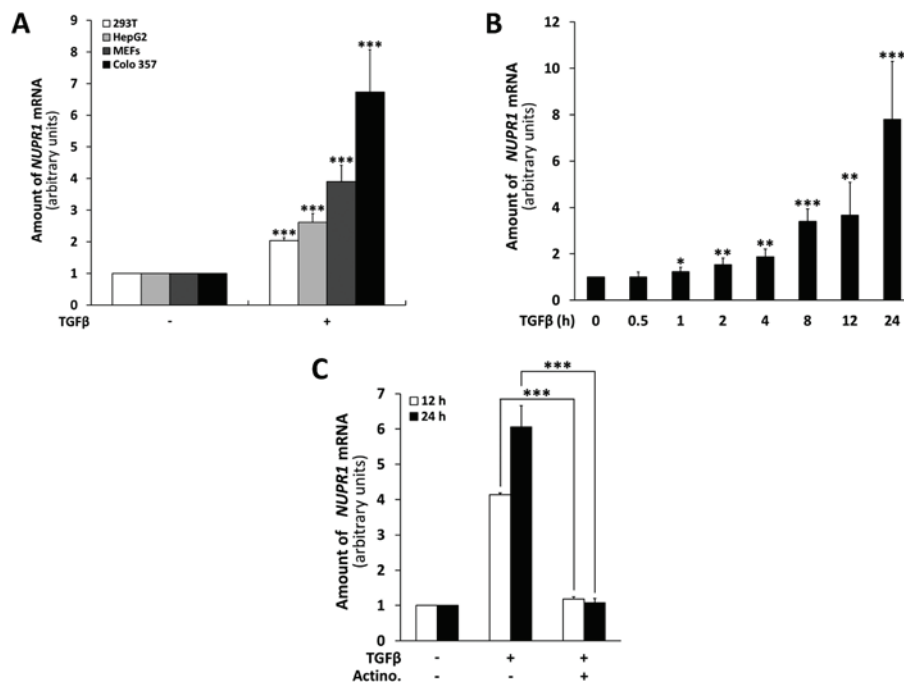


Figure 1 TGF β activates the transcription of *NUPR1* via the SMAD signalling pathway

(A) RT-qPCR analysis of *NUPR1* expression in HEK-293T, HepG2, MEFs and Colo 357 cells treated or not with TGF β for 24 h. (B) Time-course analysis for the *NUPR1* gene expression in Colo 357 cells in the presence of TGF β assessed by RT-qPCR. (C) Effect of actinomycin D (Actino.) treatment on *NUPR1* mRNA accumulation in Colo 357 cells after TGF β treatment, evaluated by RT-qPCR.

the transcription of target genes. In order to inhibit the SMAD pathway, we inactivated *SMAD4* by RNA interference. We transiently transfected Colo 357 cells either with a control siRNA or a siRNA directed against *SMAD4*. The cells were then treated with TGF β for 24 h and *NUPR1* expression was quantified further. Western blotting and RT-qPCR analyses revealed an effective (>70%) reduction of *SMAD4* expression (Figure 2A), which is correlated with a significant reduction of *NUPR1* mRNA accumulation in response to TGF β (Figure 2B). This result was confirmed by taking advantage of genetically engineered mice available in our laboratory and bearing a conditional knockout *Smad4* floxed allele [13,19]. We prepared *Smad4*^{lox/lox} MEFs and infected them with either a Cre-expressing retroviral vector or a control retroviral vector. Western blotting analysis and RT-qPCR revealed a major decrease (>80%) in *Smad4* expression in the presence of the Cre recombinase (Figure 2C). As expected, Cre-mediated *Smad4* inactivation was found to be correlated with a significant diminution of murine *Nupr1* mRNA accumulation after TGF β treatment (Figure 2D). Taken together, these results demonstrate that the SMAD signalling pathway is crucial for enabling optimal activation of *NUPR1* by TGF β .

Identification of TGF β -response elements in the *NUPR1* promoter

The results presented above show that TGF β activates *NUPR1* gene expression at the transcriptional level via the SMAD signalling pathway. We then analysed further the promoter region of *NUPR1*. We generated the pGL3-*hNUPR1*(-2111/+229)-Luc reporter, which contains a genomic DNA region extending from -2111 to +229 nucleotides relative to the *NUPR1* transcription start. We carried out transient transfections of HepG2 or HEK-293T cells with this reporter vector, as well as with plasmids encoding SMAD3 and SMAD4 proteins, before treating cells with TGF β for 24 h. The co-transfection of vectors expressing SMAD3 and SMAD4 was aimed at optimizing

the response to TGF β . In the two cell lines, we observed a 2-fold increase in transcriptional activity in the presence of TGF β and a 5-fold increase in the combined presence of TGF β and exogenous SMAD3 and SMAD4 proteins (Figure 3A). We also observed in HEK-293T cells that SMAD3 and SMAD4, in the absence of exogenous TGF β , could almost activate transcription up to the level observed with the combined use of TGF β and overexpressed SMAD3/SMAD4 (Supplementary Figure S1 at <http://www.BiochemJ.org/bj/445/bj4450285add.htm>). These results thus showed that this genomic DNA region of the *NUPR1* gene that extends from position -2111 to +229 is sensitive to TGF β .

TGF β -activated SMAD complexes accumulate in the nucleus [6] and regulate target gene expression by binding to DNA sequences called SBEs (SMAD-binding elements) containing the 5'-AGnC-3' (where n is any nucleotide) minimal motif [20]. The extended 5'-CAGACA-3' sequence binds SMAD proteins with higher affinity, and was identified in the promoter of several TGF β -target genes, such as human *PAI-1* (plasminogen activator inhibitor-1) [21]. *In silico* analysis of the -2111/+229 *NUPR1* promoter allowed us to identify fourteen putative SBEs (5'-CAGAC-3' and 5'-AGACA-3') (Figure 3B and Supplementary Figure S2 at <http://www.BiochemJ.org/bj/445/bj4450285add.htm>). Interestingly, these sites are not distributed evenly along this genomic DNA sequence. Indeed, putative SBE concentration is higher in the region corresponding to the 5'-UTR (+1/+229) of *NUPR1*, and more precisely in a 170 bp (+60/+229) sequence, which contains six SBEs (out of 14 putative SBEs present in the analysed -2111/+229 promoter). Interestingly, this 170-bp long SBE-enriched region is the only *NUPR1* promoter region that is conserved between humans and mice (75% nucleotide homology) (Supplementary Figure S2). This conservation suggests that the region corresponding to the 5'-UTR of *NUPR1* might be of special importance in the *NUPR1* gene

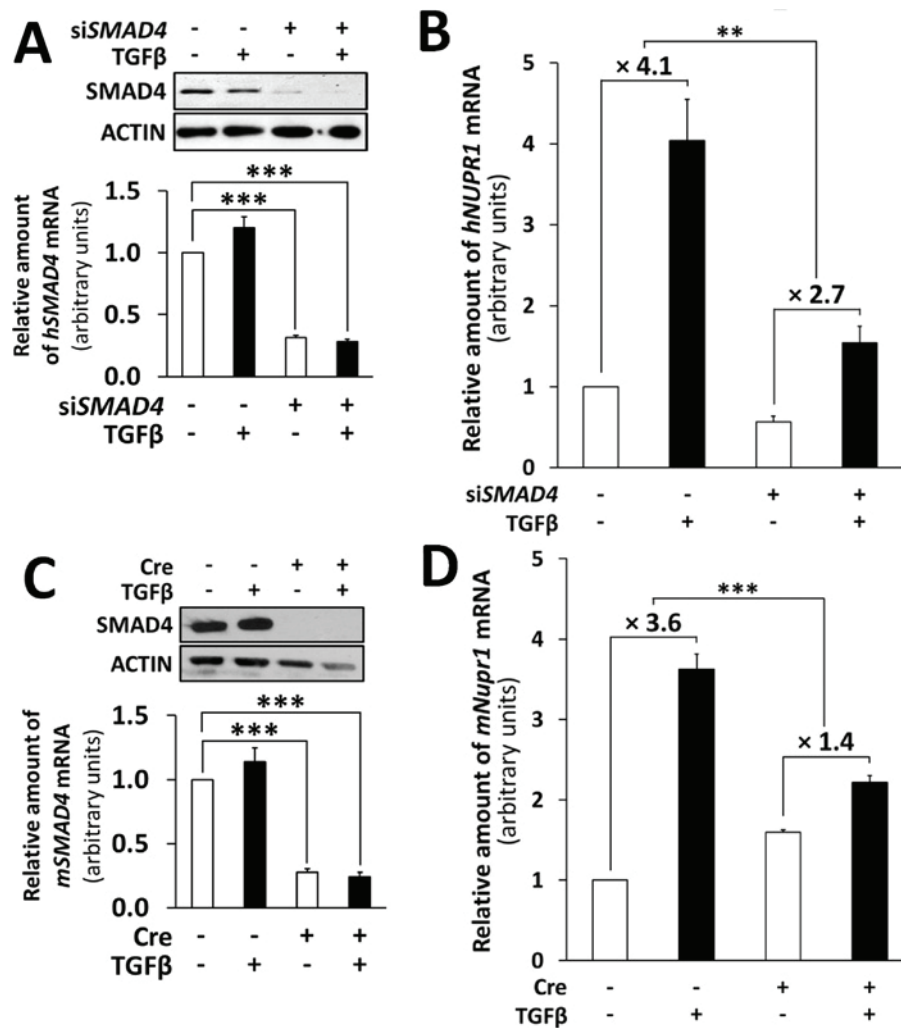


Figure 2 SMAD-dependent transcriptional activation of *NUPR1* by *TGFβ*

(A) SMAD4 protein (Western blotting, top panel) and mRNA (RT-qPCR, bottom panel) expression in Colo 357 cells transiently transfected either with a control siRNA or *SMAD4*-specific siRNA (siSMAD4). (B) *NUPR1* mRNA accumulation after *TGFβ* treatment (24 h) in Colo 357 cells transiently transfected either with a control siRNA or *SMAD4*-specific siRNA was evaluated by RT-qPCR. (C) SMAD4 (Western blotting, top panel) and mRNA (RT-qPCR, bottom panel) expression in *Smad4^{lox/lox}* MEFs stably infected either with an empty retroviral vector or retroviral vector expressing Cre recombinase (Cre). (D) Murine *Nupr1* transcript accumulation after *TGFβ* treatment (24 h) in *Smad4^{lox/lox}* MEFs stably infected either with an empty retroviral vector or retroviral vector expressing Cre recombinase was evaluated by RT-qPCR.

response to *TGFβ*. In this context, to precisely map the *TGFβ*-responsive elements, we cloned reporter plasmids containing different *NUPR1* promoter fragments presenting serial deletions at the 3' extremity of the 5'-UTR. Six fragments were designed to sequentially remove one by one the different putative SBEs present in the 5'-UTR. These reporters were transfected into HEK-293T cells. Cells were then treated with *TGFβ* in the presence of overexpressed SMAD3 and SMAD4 proteins (Figure 4). Deletions from position +229 to +152 do not significantly affect the induction of the *NUPR1* promoter by *TGFβ*. By contrast, the deletion of nucleotides +152 to +117 significantly reduces activation by *TGFβ*, consistent with the existence of a major *TGFβ*-responsive element in this region. Thus the *TGFβ*-mediated transcriptional regulation is mainly dependent on a 35 bp-length sequence located between +152 and +117 positions and containing a SBE (5'-AGACA-3'). In order to definitively demonstrate the importance of the 5'-UTR region in the *TGFβ*-dependent transcriptional activation of *NUPR1* gene, we cloned the pGL3-*hNUPR1*(+1/+229)-Luc construct. Results obtained with this reporter plasmid showed that *NUPR1* 5'-UTR was

sufficient to induce the activation of the reporter gene by *TGFβ* and exogenous SMAD proteins (Figure 4). In conclusion, the promoter region corresponding to the 5'-UTR (+1/+229) of *NUPR1* is necessary and sufficient to allow the transcriptional activation of this gene in response to *TGFβ*.

SMAD proteins bind to the *NUPR1* promoter

We next investigated whether SMAD proteins could directly interact with the *NUPR1* promoter. For this, we tested whether the 5'-UTR of *NUPR1* could physically and directly interact with the SMAD proteins. We therefore carried out EMSAs using a GST-SMAD3ΔC recombinant protein. GST-SMAD3ΔC is a truncated SMAD3 protein, which no longer contains its MH2 (MAD homology 2) domain in the C-terminal position. In the absence of this MH2 domain, the affinity of SMAD3 for DNA, ensured by the N-terminal domain, is strongly increased [22]. We observed a shift of the *NUPR1* 5'-UTR probe in the presence of GST-SMAD3ΔC, whereas no shift was observed with the control

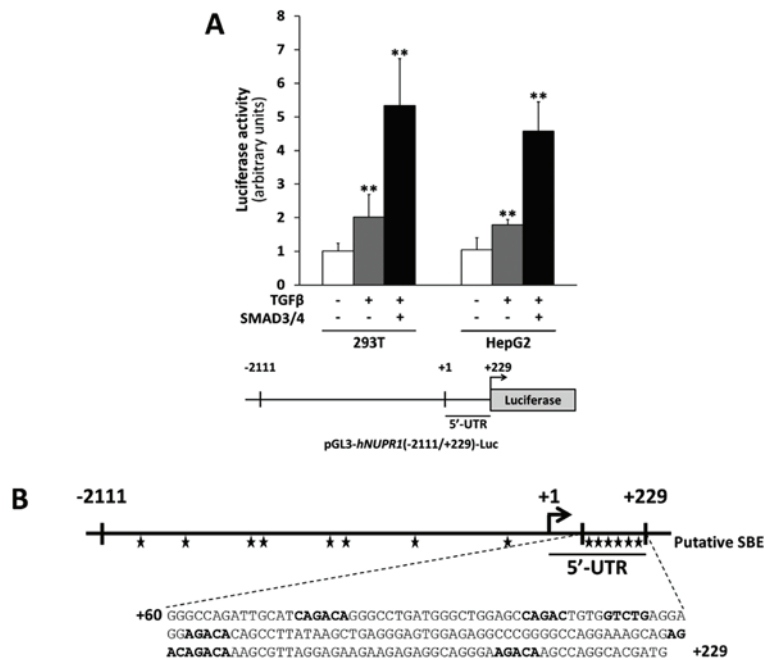


Figure 3 *NUPR1* promoter is activated by the TGFβ/SMAD signalling pathway

(A) Luciferase reporter assay in HepG2 and HEK-293T cells transiently transfected with the pGL3-*hNUPR1*(-2111/+229)-Luc reporter plasmid with or without pcDNA3.1-SMAD3 and pcDNA3.1-SMAD4, treated or not with TGFβ for 24 h. (B) Schematic representation of the *NUPR1* promoter. Putative SBEs (5'-CAGAC-3' or 5'-AGACA-3') are indicated in bold (see Supplementary Figure S2 at <http://www.BiochemJ.org/bj/445/bj4450285add.htm> for more details).

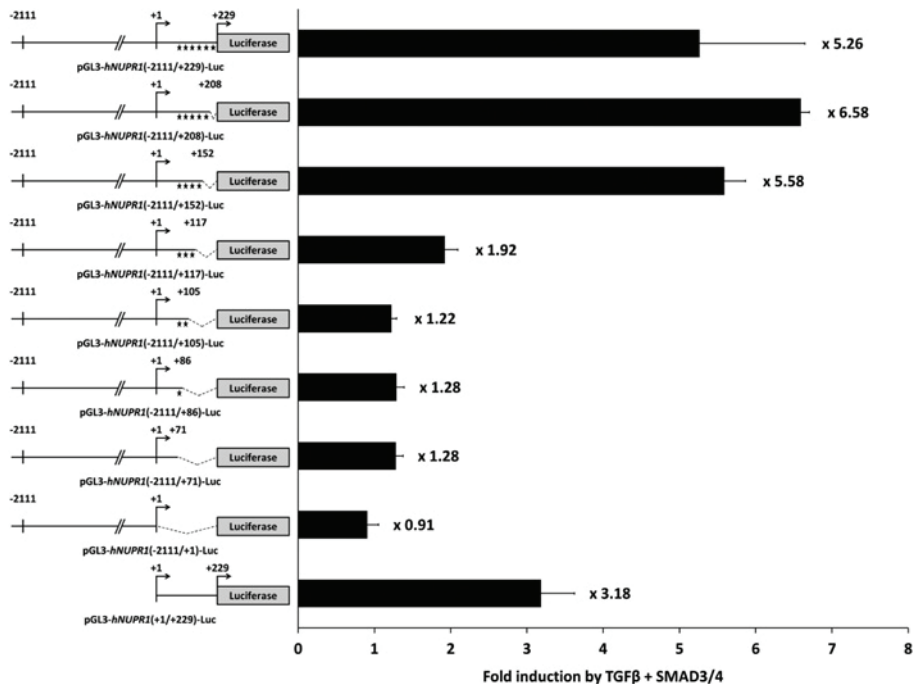


Figure 4 Identification of TGFβ-response elements in the *NUPR1* gene

Luciferase reporter assay in HEK-293T cells transiently transfected with reporters containing the indicated fragment of the *NUPR1* promoter with TGFβ, and SMAD3 and SMAD4 expression vectors.

probe or the recombinant wild-type GST protein (Figure 5A). These results indicate that the SMAD3 protein can specifically and directly bind to the 5'-UTR of the *NUPR1* gene.

We next explored whether an endogenous protein complex could bind to the 5'-UTR of *NUPR1* after TGFβ treatment. To do this, we performed EMSA using nuclear protein extracts

prepared from HepG2 cells either treated or not for 45 min with TGFβ, the length of time sufficient for the nuclear translocation of SMAD2-SMAD3-SMAD4 proteins in response to TGFβ. Our results revealed a shifted band in the presence of nuclear extracts of cells treated with TGFβ (Figure 5B). This indicated an interaction between the 5'-UTR of *NUPR1* and the endogenous

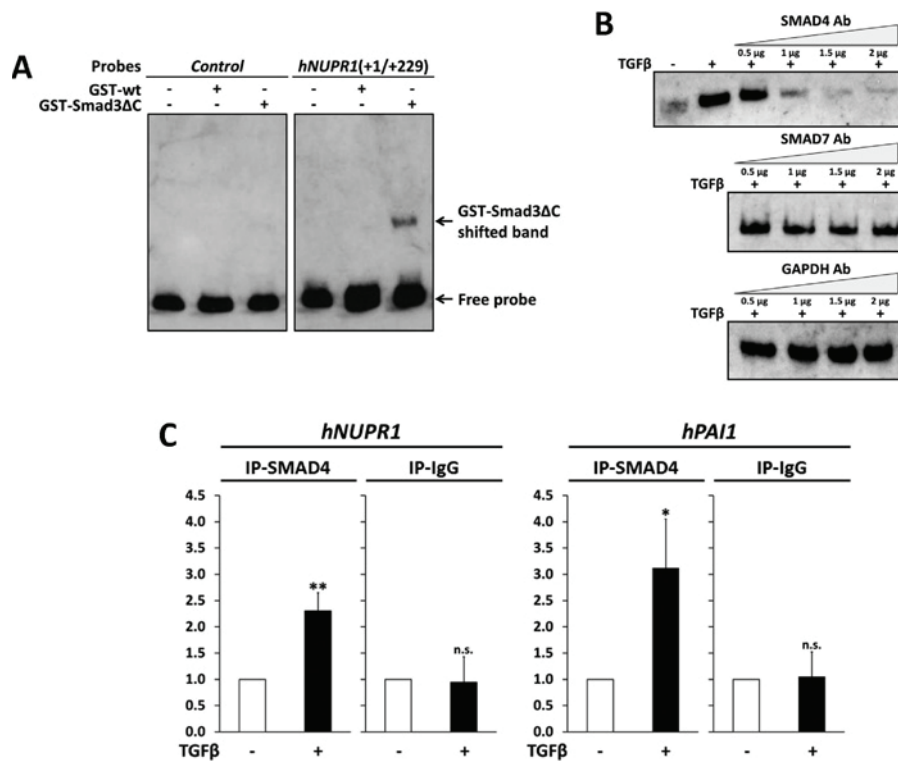


Figure 5 SMAD proteins bind to the *NUPR1* promoter

(A) EMSA performed with a labelled probe corresponding to the *NUPR1* 5'-UTR (+1/+229) in the presence of recombinant GST-SMAD3ΔC. An irrelevant labelled control probe and GST wild-type (wt) protein were used as negative controls. (B) EMSA performed with the *NUPR1* 5'-UTR (+1/+229) and nuclear proteins prepared from HepG2 cells with or without TGFβ (45 min), and pre-incubated or not with increasing concentrations of the indicated antibody (anti-SMAD4, anti-GAPDH and anti-SMAD7). (C) ChIP (IP) assay performed in Colo 357 cells treated or not with TGFβ (45 min). qPCR was performed using primers specific to either *NUPR1* or *PAI-1*. Anti-SMAD4 and rabbit IgG antibodies were used for ChIP. All results obtained were represented as 'percentage input' values and normalized to the untreated condition arbitrarily set at 1.0.

proteins involved in the TGFβ signalling pathway. Then, we investigated whether the complex that binds to the *NUPR1* 5'-UTR after TGFβ treatment actually contains SMAD proteins. For that, we were able to show that pre-incubation of nuclear extracts with an anti-SMAD4 antibody was sufficient to decrease the formation of the DNA-protein complex in a dose-dependent manner (Figure 5B). Binding of the anti-SMAD4 antibody to the SMAD transcriptional complex probably masks the DNA-interacting domain, consequently preventing the interaction of this complex with DNA. Inhibition of band shift formation using competing antibodies has already been described by others [23,24]. As a negative control, no effect was observed using monoclonal isotypical antibodies directed against GAPDH or SMAD7. Altogether, our results indicate that TGFβ treatment induces the binding of a SMAD4 transcriptional complex to the *NUPR1* 5'-UTR that we demonstrated in Figure 4 to confer sensitivity to TGFβ.

Finally, we investigated whether endogenous SMAD4 was recruited to the endogenous promoter of *NUPR1* gene. We performed ChIP experiments in Colo 357 cells. Our results (Figure 5C, left-hand panels) revealed an enrichment (2.5-fold) of SMAD4 bound to the *NUPR1* promoter in cells treated with TGFβ. As a positive control, we verified that the presence of SMAD4 was also enhanced at the well-known TGFβ-sensitive *PAI-1* (encoded by the *SERPINE1* gene) promoter (3-fold). Importantly, no enrichment (of *NUPR1* or *PAI-1*) after TGFβ treatment was detected in precipitates using control IgG (Figure 5C, right-hand panels). Additionally, the *ACTIN* signal was not detected to a significant level in any of the precipitates,

confirming the specificity of the association of SMAD4 with the *NUPR1* promoter.

DISCUSSION

In previous studies, we reported preliminary observations suggesting that TGFβ treatment or SMAD4 overexpression could activate *NUPR1* expression in mouse fibroblasts [25] and human Panc-1 cells [26], with the precise molecular mechanism remaining elusive. In this context, and considering the important role of both molecules in cancer, it was of particular interest to further analyse the regulation of *NUPR1* by TGFβ. The present study provides molecular evidence that *NUPR1* is a direct target gene of the TGFβ-SMAD axis. Indeed, we demonstrated here that TGFβ could activate the transcription of the *NUPR1* gene via the canonical pathway of the SMAD proteins. We cloned the *NUPR1* promoter, allowing us to identify precisely the TGFβ-responsive elements. We demonstrated, using reporter assays, that the activation of *NUPR1* by TGFβ was dependent on a 35 bp sequence (+117/+152) containing a SBE (5'-AGACA-3') which is located in the genomic DNA region corresponding to the 5'-UTR of *NUPR1*. We also showed that a DNA probe corresponding to the 5'-UTR of *NUPR1* could physically interact with SMAD proteins. Finally, ChIP experiments revealed that TGFβ could induce the binding of the endogenous SMAD4 protein to the 5'-UTR of *NUPR1*. Taken together, the results of the present study reveal that *NUPR1* is a transcriptional target of TGFβ involving the SMAD proteins, through a TGFβ-responsive element located in the 5'-UTR of *NUPR1*.

The +1/+229 bp *NUPR1* 5'-UTR is enriched in putative SBE, since it contains six out of the 14 putative SBE present in the -2111/+229 bp *NUPR1* promoter (Supplementary Figure S2). Even more striking, the SBE that we identified in the TGF β -responsive element is located in a 25 bp region (+99-CAGACTgtgGTCTGaggaggAGACA- +123), which contains a cluster of three aggregated SBEs (Supplementary Figure S2). The TGF β -responsive element we identified with our serial deletions corresponds to the more distal (3') SBE, but it will be of particular interest to test the functionality of the two other SBEs, which are positioned into a palindromic orientation, a configuration previously described to bind SMAD proteins with higher affinity than the usual SBEs [27].

NUPR1 expression appears to be a crucial element in cancer cells [5]. It appears to be critical for tumour development in immunodeficient mice [28–30], and is found overexpressed in human cancers [31,32], in which its expression is inversely correlated with apoptosis [33,34]. It is also involved in the resistance to anti-tumoral treatments [35] and the formation of metastases [36]. Our results regarding the regulation of *NUPR1* by TGF β , coupled with the latter's oncogenic properties, make the stress protein *NUPR1* a prime candidate for involvement in the oncogenic response induced by TGF β . Indeed, as TGF β and *NUPR1* play a part in tumour progression [28,30], it is tempting to speculate on the involvement of *NUPR1* in mediating the pro-oncogenic properties of TGF β . We put forward the hypothesis of a new mechanism that enables TGF β to promote tumorigenesis by inducing stress resistance. It is noteworthy that approximately 50% of the pancreatic tumours present a deletion of the locus containing *SMAD4* [also named *DPC4* (deleted in pancreatic carcinoma 4)] [37]. Whether or not *NUPR1/P8* plays a role in *SMAD4*-negative tumours remains elusive. In this context, we can speculate that *NUPR1/P8* activation may involve *SMAD4*-independent pathways, which have been largely described to be involved in the oncogenic properties of TGF β [38]. Moreover, *NUPR1/P8* expression could also be activated by other pathways, which are totally independent of TGF β . Finally, we cannot rule out the possibility that *NUPR1/P8* may be dispensable for tumour aggressiveness in certain subtype of tumours, such as *SMAD4*-negative tumours. Further work need to be performed to address the exact role and the precise genetic background of the TGF β -*NUPR1/P8* axis during pancreatic tumorigenesis. Analysis of large collections of human pancreatic tumours along with the generation of murine models will allow us to clarify the role of the response to cellular stress in tumorigenesis induced by TGF β *in vivo*.

AUTHOR CONTRIBUTION

Roxane Pommier, Johann Gout, Ulrich Valcourt, Julien Marie, Carla Cano, Juan Iovanna and Laurent Bartholin designed the experiments. Roxane Pommier, Bastien Kaniewski, Sylvie Martel, Jonathan Rodriguez and Geneviève Fourel performed the experiments. All of the authors analysed the experimental results. Roxane Pommier, Johann Gout and Laurent Bartholin wrote the paper, and all authors were involved in critical reading of the paper prior to submission.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Peter Ten Dijke and Aristidis Moustakas for the mammalian expression vectors encoding the human *SMAD3* and *SMAD4*, and Alain Mauviel for the bacterial vector encoding the GST-Smad3 Δ C protein. We also thank Caroline Hill for giving us the Colo 357 cells.

FUNDING

This work was supported by the PANSTRESS grant [grant number 2010-203] from INCa (Institut National du Cancer). It was also supported by the Avenir program from INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale). R.M.P. was supported by

fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche de France (MESR); J.G. by a fellowship from the Ligue Nationale Contre le Cancer; D.F.V. by a fellowship from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC); B.K. by the PANSTRESS grant from INCa. S.M. has a permanent position of senior technician at the Centre Léon Bérard.

REFERENCES

- Simmons, S. O., Fan, C. Y. and Ramabhadran, R. (2009) Cellular stress response pathway system as a sentinel ensemble in toxicological screening. *Toxicol. Sci.* **111**, 202–225
- Murakami, S., Noguchi, T., Takeda, K. and Ichijo, H. (2007) Stress signaling in cancer. *Cancer Sci.* **98**, 1521–1527
- Mallo, G. V., Fiedler, F., Calvo, E. L., Ortiz, E. M., Vasseur, S., Keim, V., Morisset, J. and Iovanna, J. L. (1997) Cloning and expression of the rat p8 cDNA, a new gene activated in pancreas during the acute phase of pancreatitis, pancreatic development, and regeneration, and which promotes cellular growth. *J. Biol. Chem.* **272**, 32360–32369
- Gironella, M., Malicet, C., Cano, C., Sandi, M. J., Hamidi, T., Taui, R. M., Baston, M., Valaco, P., Moreno, S., Lopez, F. et al. (2009) p8/nupr1 regulates DNA-repair activity after double-strand γ irradiation-induced DNA damage. *J. Cell. Physiol.* **221**, 594–602
- Cano, C. E., Hamidi, T., Sandi, M. J. and Iovanna, J. L. (2011) Nupr1: the Swiss-knife of cancer. *J. Cell. Physiol.* **226**, 1439–1443
- Moustakas, A. and Heldin, C. H. (2009) The regulation of TGF β signal transduction. *Development* **136**, 3699–3714
- Liu, T. and Feng, X. H. (2010) Regulation of TGF- β signalling by protein phosphatases. *Biochem. J.* **430**, 191–198
- Ikushima, H. and Miyazono, K. (2010) TGF β signalling: a complex web in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 415–424
- Inman, G. J. (2011) Switching TGF β from a tumor suppressor to a tumor promoter. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 93–99
- Cano, C. E., Sandi, M. J., Hamidi, T., Calvo, E. L., Turrini, O., Bartholin, L., Loncle, C., Secq, V., Garcia, S., Lomber, G., Kroemer, G., Urrutia, R. and Iovanna, J. L. (2012) Homotypic cell cannibalism, a cell-death process regulated by the nuclear protein 1, opposes metastasis in pancreatic cancer. *EMBO Mol. Med.*, in the press
- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M. and Miyazono, K. (1997) Smad6 inhibits signalling by the TGF- β superfamily. *Nature* **389**, 622–626
- Moren, A., Itoh, S., Moustakas, A., Dijke, P. and Heldin, C. H. (2000) Functional consequences of tumorigenic missense mutations in the amino-terminal domain of Smad4. *Oncogene* **19**, 4396–4404
- Vindevooghel, L., Lechleider, R. J., Kon, A., de Caestecker, M. P., Utito, J., Roberts, A. B. and Mauviel, A. (1998) SMAD3/4-dependent transcriptional activation of the human type VII collagen gene (COL7A1) promoter by transforming growth factor β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 14769–14774
- Yang, X., Li, C., Herrera, P. L. and Deng, C. X. (2002) Generation of Smad4/Dpc4 conditional knockout mice. *Genesis* **32**, 80–81
- Vincent, D. F., Yan, K. P., Treilleux, I., Gay, F., Arfi, V., Kaniewski, B., Marie, J. C., Lepinasse, F., Martel, S., Goddard-Leon, S. et al. (2009) Inactivation of TIF1 γ cooperates with Kras to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genet.* **5**, e1000575
- Bartholin, L., Cyprian, F. S., Vincent, D., Garcia, C. N., Martel, S., Horvat, B., Berthet, C., Goddard-Léon, S., Treilleux, I., Rimokh, R. and Marie, J. C. (2008) Generation of mice with conditionally activated transforming growth factor β signaling through the T β RI/ALK5 receptor. *Genesis* **46**, 724–731
- Bartholin, L., Maguer-Satta, V., Hayette, S., Martel, S., Gadoux, M., Bertrand, S., Corbo, L., Lamadon, C., Morera, A. M., Magaud, J. P. and Rimokh, R. (2001) FLRG, an activin-binding protein, is a new target of TGF β transcription activation through Smad proteins. *Oncogene* **20**, 5409–5419
- Bartholin, L., Wessner, L. L., Chirgwin, J. M. and Guise, T. A. (2007) The human Cyr61 gene is a transcriptional target of transforming growth factor β in cancer cells. *Cancer Lett.* **246**, 230–236
- Bartholin, L., Powers, S. E., Melhuish, T. A., Lasse, S., Weinstein, M. and Wotton, D. (2006) TGF β inhibits retinoid signaling. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 990–1001
- Vincent, D. F., Gout, J., Chuvin, N., Arfi, V., Pommier, R., Bertolino, P., Jonckheere, N., Ripoche, D., Kaniewski, B., Martel, S. et al. (2012) Tif1 γ suppresses murine pancreatic tumoral transformation by a Smad4-independent pathway. *Am. J. Pathol.*, doi:10.1016/j.ajpath.2012.02.006
- Shi, Y., Wang, Y. F., Jayaraman, L., Yang, H., Massague, J. and Pavletich, N. P. (1998) Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF- β signaling. *Cell* **94**, 585–594
- Denkler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S. and Gauthier, J. M. (1998) Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF β -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J.* **17**, 3091–3100

- 22 Song, C. Z., Siok, T. E. and Gelehrter, T. D. (1998) Smad4/DPC4 and Smad3 mediate transforming growth factor- β (TGF- β) signaling through direct binding to a novel TGF- β -responsive element in the human plasminogen activator inhibitor-1 promoter. *J. Biol. Chem.* **273**, 29287–29290
- 23 Fu, Y., Ishii, K. K., Munakata, Y., Saitoh, T., Kaku, M. and Sasaki, T. (2002) Regulation of tumor necrosis factor α promoter by human parvovirus B19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2. *J. Virol.* **76**, 5395–5403
- 24 Han, S. S., Yun, H., Son, D. J., Tompkins, V. S., Peng, L., Chung, S. T., Kim, J. S., Park, E. S. and Janz, S. (2010) NF- κ B/STAT3/PI3K signaling crosstalk in iMyc^{Flu} B lymphoma. *Mol. Cancer* **9**, 97
- 25 Garcia-Montero, A. C., Vasseur, S., Giono, L. E., Canepa, E., Moreno, S., Dagorn, J. C. and Iovanna, J. L. (2001) Transforming growth factor β -1 enhances Smad transcriptional activity through activation of p8 gene expression. *Biochem. J.* **357**, 249–253
- 26 Malicet, C., Lesavre, N., Vasseur, S. and Iovanna, J. L. (2003) p8 inhibits the growth of human pancreatic cancer cells and its expression is induced through pathways involved in growth inhibition and repressed by factors promoting cell growth. *Mol. Cancer* **2**, 37
- 27 Zawel, L., Dai, J. L., Buckhaults, P., Zhou, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. and Kern, S. E. (1998) Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol. Cell* **1**, 611–617
- 28 Vasseur, S., Hoffmeister, A., Garcia, S., Bagnis, C., Dagorn, J. C. and Iovanna, J. L. (2002) p8 is critical for tumour development induced by rasV12 mutated protein and E1A oncogene. *EMBO Rep.* **3**, 165–170
- 29 Mohammad, H. P., Seachrist, D. D., Quirk, C. C. and Nilson, J. H. (2004) Reexpression of p8 contributes to tumorigenic properties of pituitary cells and appears in a subset of prolactinomas in transgenic mice that hypersecrete luteinizing hormone. *Mol. Endocrinol.* **18**, 2583–2593
- 30 Sandi, M. J., Hamidi, T., Malicet, C., Cano, C., Loncle, C., Pierres, A., Dagorn, J. C. and Iovanna, J. L. (2011) p8 expression controls pancreatic cancer cell migration, invasion, adhesion and tumorigenesis. *J. Cell. Physiol.* **226**, 3442–3451
- 31 Ito, Y., Yoshida, H., Motoo, Y., Iovanna, J. L., Tomoda, C., Uruno, T., Takamura, Y., Miya, A., Kobayashi, K., Matsuzuka, F. et al. (2005) Expression of p8 protein in medullary thyroid carcinoma. *Anticancer Res.* **25**, 3419–3423
- 32 Su, S. B., Motoo, Y., Iovanna, J. L., Xie, M. J., Mouri, H., Ohtsubo, K., Yamaguchi, Y., Watanabe, H., Okai, T., Matsubara, F. and Sawabu, N. (2001) Expression of p8 in human pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **7**, 309–313
- 33 Su, S. B., Motoo, Y., Iovanna, J. L., Berthezene, P., Xie, M. J., Mouri, H., Ohtsubo, K., Matsubara, F. and Sawabu, N. (2001) Overexpression of p8 is inversely correlated with apoptosis in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res.* **7**, 1320–1324
- 34 Ito, Y., Yoshida, H., Motoo, Y., Iovanna, J. L., Nakamura, Y., Kakudo, K., Uruno, T., Takamura, Y., Miya, A., Noguchi, S. et al. (2005) Expression of p8 protein in breast carcinoma; an inverse relationship with apoptosis. *Anticancer Res.* **25**, 833–837
- 35 Giroux, V. (2006) p8 is a new target of gemcitabine in pancreatic cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **12**, 235–241
- 36 Ree, A. H., Tvermyr, M., Engebraaten, O., Rooman, M., Rosok, O., Hovig, E., Meza-Zepeda, L. A., Bruland, O. S. and Fodstad, O. (1999) Expression of a novel factor in human breast cancer cells with metastatic potential. *Cancer Res.* **59**, 4675–4680
- 37 Hahn, S. A., Schutte, M., Hoque, A. T., Moskaluk, C. A., da Costa, L. T., Rozenblum, E., Weinstein, C. L., Fischer, A., Yeo, C. J., Hruban, R. H. and Kern, S. E. (1996) DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* **271**, 350–353
- 38 Heldin, C.-H., Landström, M. and Moustakas, A. (2009) Mechanism of TGF- β signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 166–176

Received 5 March 2012/1 May 2012; accepted 1 May 2012
Published on the Internet 27 June 2012, doi:10.1042/BJ20120368

SUPPLEMENTARY ONLINE DATA

The human *NUPR1/P8* gene is transcriptionally activated by transforming growth factor β via the SMAD signalling pathway

Roxane M. POMMIER*^{†‡§||1}, Johann GOUT*^{†‡§||1}, David F. VINCENT*^{†‡§||}, Carla E. CANO¶, Bastien KANIEWSKI*^{†‡§||}, Sylvie MARTEL*^{†‡§||}, Jonathan RODRIGUEZ*^{†‡§||}, Geneviève FOUREL*^{†‡§||}, Ulrich VALCOURT*^{†‡§||}, Julien C. MARIE*^{†‡§||}, Juan L. IOVANNA¶ and Laurent BARTHOLIN*^{†‡§||2}

*Inserm U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69008 Lyon, France, †CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69008 Lyon, France, ‡Université de Lyon, F-69000 Lyon, France, §Université Lyon 1, F-69000 Lyon, France, ||Centre Léon Bérard, F-69000 Lyon, France, and ¶Inserm U624, Stress Cellulaire, Parc Scientifique et Technologique de Luminy, F-13228 cedex 09 Marseille, France

Table S1 Primer sequences used for qRT-PCR, EMSA experiments and ChIP assay

Fw, forward; Rev, reverse.

(a) RT-qPCR

Oligonucleotide	Sequence
Human <i>NUPR1</i> Fw	5'-GGTCGCACCAAGAGAGAAGC-3'
Human <i>NUPR1</i> Rev	5'-CTCCGCAGTCCCCTCTCTAT-3'
Human <i>SMAD4</i> Fw	5'-GTGGAATAGCTCCAGCTATC-3'
Human <i>SMAD4</i> Rev	5'-CGGCATGGTATGAAGTACTCC-3'
Human <i>GAPDH</i> Fw	5'-CGGAGTCAACGGATTGGTCGTAT-3'
Human <i>GAPDH</i> Rev	5'-AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC-3'
Human <i>HPRT</i> Fw	5'-GAGGGAGAAAAATGCCGAGTG-3'
Human <i>HPRT</i> Rev	5'-CTCCGAAAGCAGTGAGGTAAG-3'
Murine <i>Gapdh</i> Fw	5'-CCCAGCAAGGACACTGAGCAAGAG-3'
Murine <i>Gapdh</i> Rev	5'-CTAGGCCCTCCTGTTATTATGGGG-3'
Murine <i>Nupr1</i> Fw	5'-CCCTTCCCAGCAACCTCTAAA-3'
Murine <i>Nupr1</i> Rev	5'-TCTTGGTCCGACCTTTCCGA-3'
Murine <i>Smad4</i> Superarray primer (Qiagen)	
Murine <i>Hprt</i> Fw	5'-TGACCTTGATTATTTGCATACC-3'
Murine <i>Hprt</i> Rev	5'-CGAGCAAGACGTTCCAGTCT-3'

(b) EMSA

Oligonucleotide	Sequence
Human <i>NUPR1</i> +1 Fw	5'-CTGGTACCGACTCAGGGACCGACTCTTC-3'
Human <i>NUPR1</i> +229 Rev	5'-CTGGCTAGCCATCGTGCCTGGCTTCTT-3'

(c) ChIP assay

Oligonucleotide	Sequence
Human <i>NUPR1</i> Fw	5'-ATGACTGTGTTACTGGGCTGG-3'
Human <i>NUPR1</i> Rev	5'-GCTTGTCTTCCCTGCCTCTC-3'
Human <i>PAI1</i> Fw	5'-AGCCAGACAAGGTTGTTG-3'
Human <i>PAI1</i> Rev	5'-GACCACCTCCAGGAAAG-3'
Human β ACTIN Fw	5'-AGCCATGTACGTTGCTATCCAG-3'
Human β ACTIN Rev	5'-CTTCTCCTTAATGTCACGCACG-3'

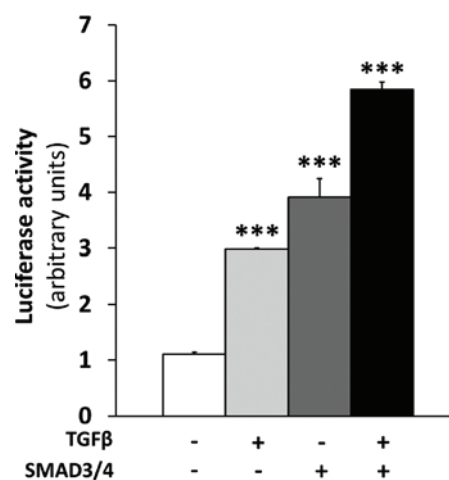


Figure S1 *NUPR1* promoter is activated by the TGF β /SMAD signalling pathway

Luciferase reporter assay in HEK-293T cells transiently transfected with the pGL3-*hNUPR1*(-2111/+229)-luc reporter plasmid with or without pcDNA3.1-SMAD3 and pcDNA3.1-SMAD4, treated or not with TGF β for 24 h.

¹ These authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed (email laurent.bartholin@lyon.unicancer.fr).

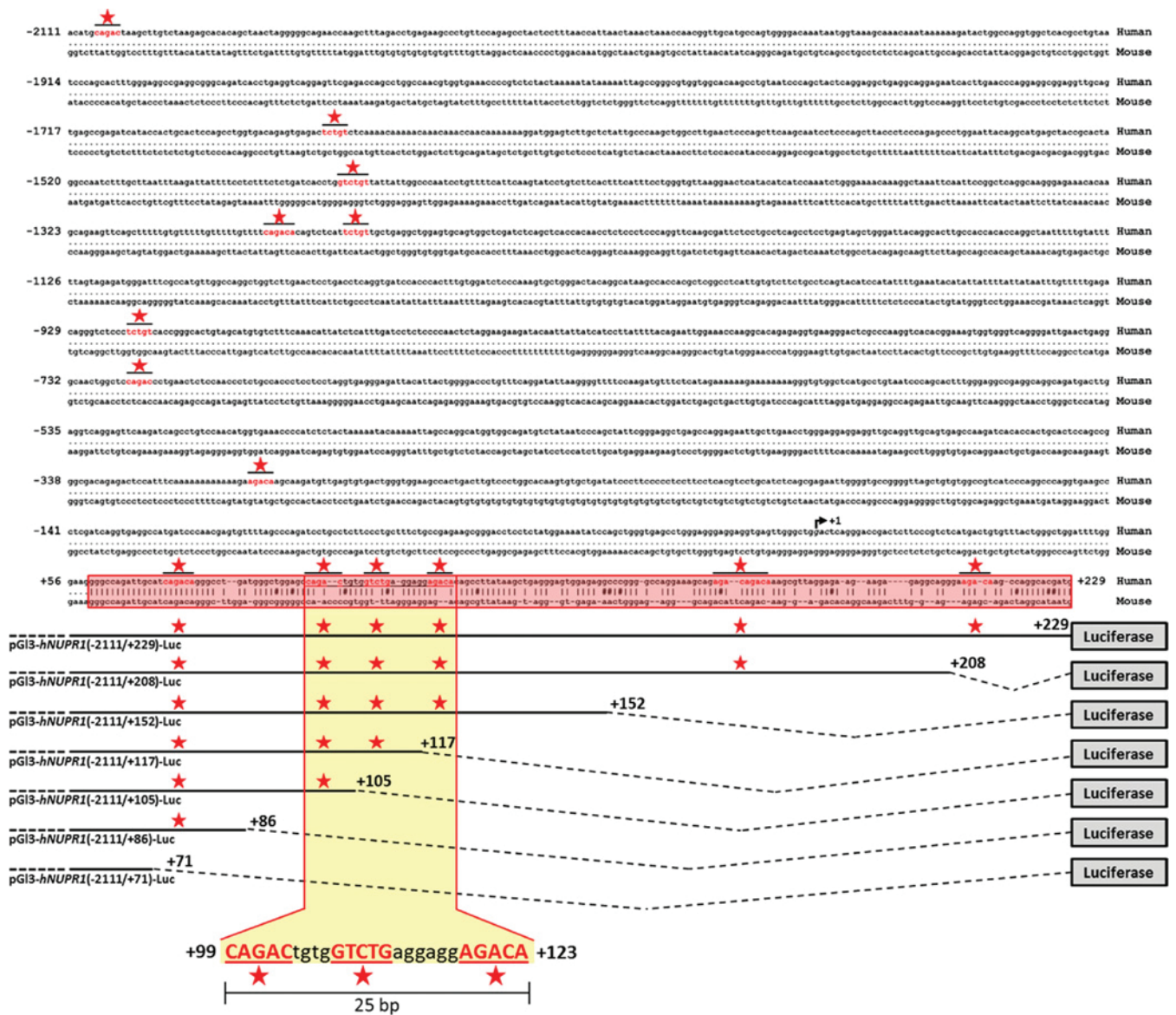


Figure S2 *In silico* analysis of the *NUPR1* promoter

Human genomic sequence of the *NUPR1* promoter located between positions – 2111 and + 229 was aligned with the corresponding murine *Nupr1* promoter region. Red bold nucleotides and red star: putative SBEs; + 1 arrow: transcription start site; red box: conserved region between human *NUPR1* and murine *Nupr1* promoter.

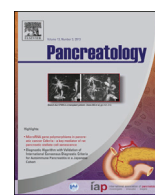
Received 5 March 2012/1 May 2012; accepted 1 May 2012
 Published on the Internet 27 June 2012, doi:10.1042/BJ20120368

II. Analyse du compartiment endocrine dans le modèle murin [*Pdx1-Cre ; Kras^{G12D/+}*]

The conditional expression of *KRAS^{G12D}* in mouse pancreas induces disorganization of endocrine islets prior the onset of ductal pre-cancerous lesions.

Johann Gout, Roxane M. Pommier, David F. Vincent, Doriane Ripoche, Sophie Goddard-Léon, Amélie Colombe, Isabelle Treilleux, Ulrich Valcourt, Richard Tomasini, Marlène Dufresne, Philippe Bertolino, Laurent Bartholin.

Pancreatology (2013). 13, 191-195.



Rapid communication

The conditional expression of *KRAS*^{G12D} in mouse pancreas induces disorganization of endocrine islets prior the onset of ductal pre-cancerous lesions

Johann Gout^{a,b,c,d,e,f}, Roxane M. Pommier^{a,b,c,d,e,f}, David F. Vincent^{a,b,c,d,e,f},
 Doriane Ripoché^{b,c,d,f}, Sophie Goddard-Léon^f, Amélie Colombe^f, Isabelle Treilleux^f,
 Ulrich Valcourt^{a,b,c,d,e,f}, Richard Tomasini^{g,h,i,j}, Marlène Dufresne^{k,l}, Philippe Bertolino^{b,c,d,f},
 Laurent Bartholin^{a,b,c,d,e,f,*}

^a «TGFβ and Pancreatic Cancer» Laboratory, France

^b INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France

^c CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France

^d Université de Lyon, F-69000 Lyon, France

^e Université Lyon 1, F-69000 Lyon, France

^f Centre Léon Bérard, F-69008 Lyon, France

^g INSERM U1068, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, F-13000 Marseille, France

^h CNRS UMR7258, Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, F-13000 Marseille, France

ⁱ Université d'Aix-Marseille, F-13000 Marseille, France

^j Institut Paoli-Calmettes, F-13000 Marseille, France

^k INSERM UMR1037, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, F-31432 Toulouse, France

^l Université de Toulouse III Paul Sabatier, F-31432 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 November 2012

Received in revised form

7 February 2013

Accepted 8 February 2013

Keywords:

Kras

Mouse

Transgenic

Endocrine

Pdx1

ABSTRACT

Background/objectives: *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice develop premalignant pancreatic ductal lesions that can possibly progress spontaneously to pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Although *Pdx1-Cre* is expressed in the embryonic endoderm, which gives rise to all pancreatic lineages, the possible consequences of *KRAS*^{G12D} expression in the endocrine compartment have never been finely explored.

Methods: We examined by histology whether *Pdx1*-driven expression of *KRAS*^{G12D} could induce islets of Langerhans defects.

Results: We observed in *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} early disorganization of the endocrine compartment including i) hyperplasia affecting all the endocrine lineages, ii) ectopic onset of Ck19-positive (ductal-like) structures within the endocrine islets, and iii) the presence of islet cells co-expressing glucagon and insulin, all occurring before the onset of ducts lesions.

Conclusions: This work indicates that expression of *KRAS*^{G12D} in *Pdx1*-expressing cells during embryogenesis affects the endocrine pancreas, and highlights the need to deepen possible consequences on both glucose metabolism and PDAC initiation.

Copyright © 2013, IAP and EPC. Published by Elsevier India, a division of Reed Elsevier India Pvt. Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The exocrine pancreas consists of acinar and ductal cells. The acinar cells constitute the bulk of the pancreatic tissue and produce digestive enzymes that are discharged into the duodenum. The ductal cells add mucous and bicarbonates to the digestive enzyme

mixture. The endocrine pancreas consists of specialized cells organized into compact islets (islets of Langerhans) embedded in the acinar tissue. The α - and β -cells respectively secrete glucagon and insulin, two hormones involved in the control of glycemia. The γ - and PP-cells respectively secrete somatostatin and pancreatic polypeptide, two hormones regulating the secretion of insulin, glucagon, and exocrine enzymes. Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), which represents the vast majority of all pancreatic cancers, is a very aggressive tumor [1]. PDAC is characterized by ductal differentiation and believed to arise from precancerous ductal lesions named pancreatic intraepithelial neoplasias (PanINs). *KRAS*-activating

* Corresponding author. INSERM, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France.

E-mail address: laurent.bartholin@lyon.unicancer.fr (L. Bartholin).

mutations are found in >90% of PDAC cases. Activation of oncogenic *KRAS*^{G12D} in pancreatic progenitor cells in *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice, results in PanIN lesions that evolve spontaneously to aggressive PDAC at low frequency and not until an advanced age [2,3]. *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice have been extensively used to demonstrate the oncogenic role of *KRAS* in PanINs formation [2]. Although the early pancreatic expression of *Pdx1* during endoderm development from E8.5 [4] suggests that *KRAS*^{G12D} expression might also affect the endocrine lineage, these consequences have never been examined. Therefore, we have sought to determine whether the endocrine compartment was affected in the pancreases of *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice.

2. Results and discussion

We first generated *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice ($n = 25$) that we euthanized between 1 and 9 months of age, together with their matching controls. To visualize PanIN lesions showing ductal differentiation, we performed immunohistochemistry (IHC) experiments to detect Cytokeratin-19 (Ck19), which is expressed at the membrane of the cells lining the ducts. No PanIN lesions were observed in the pancreas of 1-month-old *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice (KC). Scattered PanIN lesions were detectable by the time they reached two months of age, the number and grade of these lesions increasing with age (Fig. 1). We further looked at the β - and α -cell contents of the islets of Langerhans by immunodetection of Insulin and Glucagon (Fig. 2A). We observed an increased proportion of both β - and α -cells in the pancreases of *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice as early as the age of 1 month. It is noteworthy that α -cells were also found scattered within the islets, in contrast to their well-defined localization at the periphery of control islets. To quantify the areas occupied by β - and α -cells, we performed morphometric analyses of the Insulin- and Glucagon-positive regions. In *Pdx1-Cre;*

LSL-KRAS^{G12D} pancreases, we found the areas occupied by β - and α -cells to be increased, respectively, 3.1-fold (Fig. 2B) and 7.2-fold (Fig. 2C) at 1 month of age as compared to wild-type controls. Similar increases were found at 2 and 4 months, but increases were hardly measurable at 9 months because of disorganization of the islets structure. By IHC with antibodies directed against Somatostatin and Pancreatic Polypeptide, we also observed an increase of the γ - and PP-cell populations, respectively, in *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice (data not shown). Taken together, our observations highlight that the composition of the entire endocrine compartment of the pancreas is affected in *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice before any lesions of the exocrine compartment such as PanINs and acinar-ductal metaplasia are detectable.

Unexpectedly, we detected Ck19-positive ectopic cells inside the endocrine compartment of *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice by the time they reached 1 month of age (Fig. 3A). Finally, immunofluorescence experiments revealed the existence of cells expressing both Glucagon and Insulin simultaneously, only in the pancreases of *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice and as early as 1 month of age (Fig. 3B).

The present study represents the first report to detail the alterations that affect the endocrine compartment of the pancreases of *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice. We observed a hyperplasia affecting all the endocrine lineages, the presence of ectopic Ck19-positive “ductal-like” structures within the endocrine islets as well as islet cells co-expressing Glucagon and Insulin. However, it remains to be clarified whether these defects are a direct consequence of a cell-autonomous *KRAS*^{G12D} expression in islets or represent an indirect consequence caused by the expression of *KRAS*^{G12D} in the neighboring exocrine tissues. This uncertainty is a consequence of i) the early expression *Pdx1-Cre* in the embryonic endoderm that will give rise to all epithelial pancreatic lineages, and ii) the transdifferentiation processes between the different

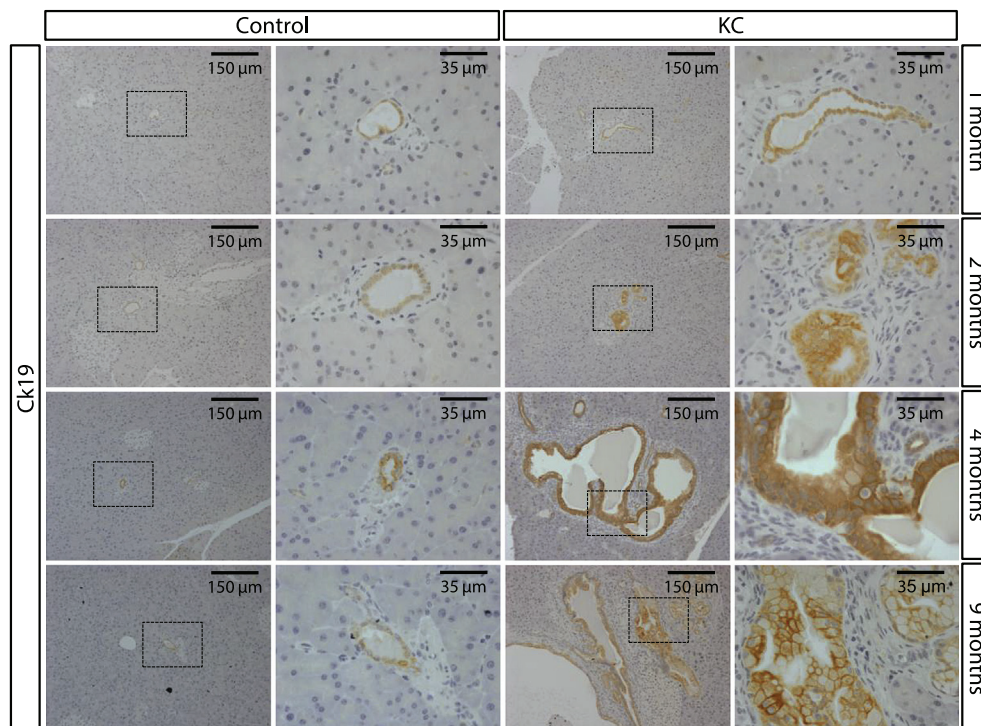


Fig. 1. The *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mouse model recapitulates the full spectrum of pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) development. Cytokeratin-19 (Ck19) immunohistochemical analysis of pancreas sections from 1- to 9-months-old *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} (KC) mice. Note the presence of PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasia) lesions as early as the age of 2 months and their progression to higher grade lesions in older (4- and 9-months-old) *Pdx1-Cre; LSL-KRAS*^{G12D} mice. Controls are littermate mice with one of the following genotype: wild-type, *Pdx1-Cre* and *LSL-KRAS*^{G12D} mice.

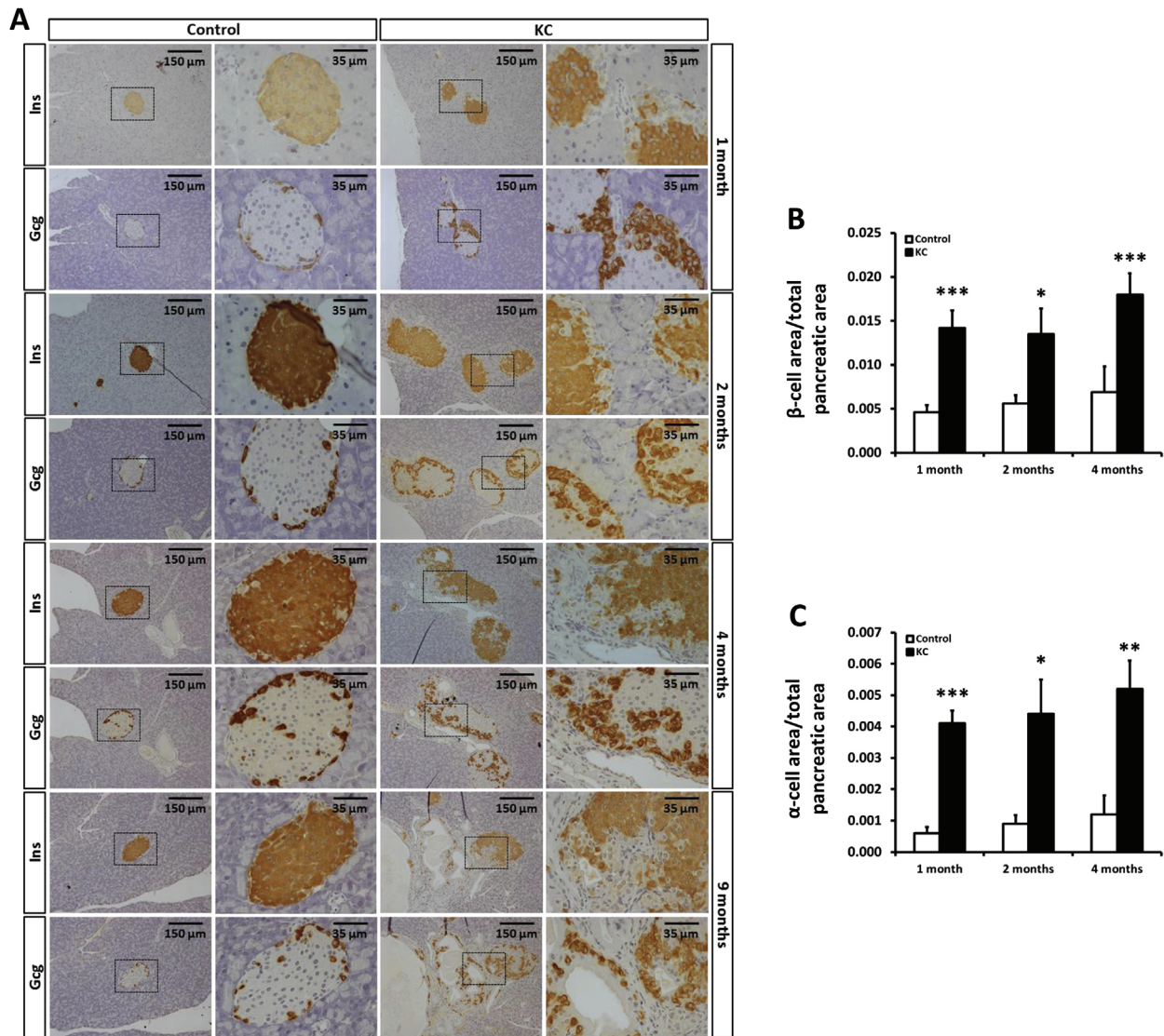


Fig. 2. *Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}* mice present a β - and α -cell hyperplasia prior to epithelial lesions onset. (A) Insulin (Ins) and Glucagon (Gcg) immunohistochemical analysis of pancreas sections highlight, respectively, β - and α -cell hyperplasias present on the *Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}* (KC) pancreatic sections, as compared to control mice. Note that these hyperplasias appear to develop prior to the appearance of PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasia) lesions. (B and C) Morphometric quantification of β - and α -cell areas performed on pancreas sections of 1- to 4-months-old mice confirm the endocrine hyperplasia observed in mutant pancreases, as compared to matched littermate controls. $N \geq 3$, results are shown as mean \pm SEM. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. Controls are littermate mice with one of the following genotype: wild-type, *Pdx1-Cre* and *LSL-KRAS^{G12D}* mice.

pancreatic cells in the adult. For instance, it has been reported that ductal cells are multipotent progenitors that could differentiate in α - or β -cells [5–8]. A significant plasticity also exists between adult pancreatic α - and β -cells themselves, implying a potential route to β -cells generation through α -cells in a murine model that develop α -cells hyperplasia [9,10]. The presence of cells co-expressing Glucagon and Insulin was also reported in humans with pancreatitis [11]. Finally, such plasticity has impeded the clear identification of the cellular origin of PDAC. For instance, it is interesting to underline that transgenic mice using activated KRAS under the control of *Ck19* ductal promoter are largely refractory to KRAS-induced PanIN formation [12,13]. In contrast, mice bearing an activated KRAS mutant allele specifically in their acinar compartment (under the control of *Elastase*, *proCPA1*, *Mist1* promoters) develop spontaneous PanINs [14–17]. More unexpected is the observation according to which *KRAS^{G12D}* expressing Insulin-positive cells of the endocrine lineage (under the control of *Rip* promoter) are refractory to transformation under normal

conditions, but also serve as a cell of origin of PDAC when combined with pancreatic inflammation caused by cerulein injection [18].

3. Conclusion

In conclusion, the alteration of the endocrine compartment we report here before the onset of PanIN lesions in the *Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}* mice suggests that they do not result from a regenerative response of injured pancreas. Therefore, it represents a new example of the important cell plasticity that exists within pancreatic tissues. This study questions the contribution and role of the endocrine compartment in the diseases that affect the exocrine pancreas such as pancreatitis and pancreatic ductal adenocarcinoma. In this context, further as well as published studies using the *Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}* mouse model should consider that the endocrine compartment disorganization, and its possible consequences on glucose metabolism, may participate to the observed phenotype.

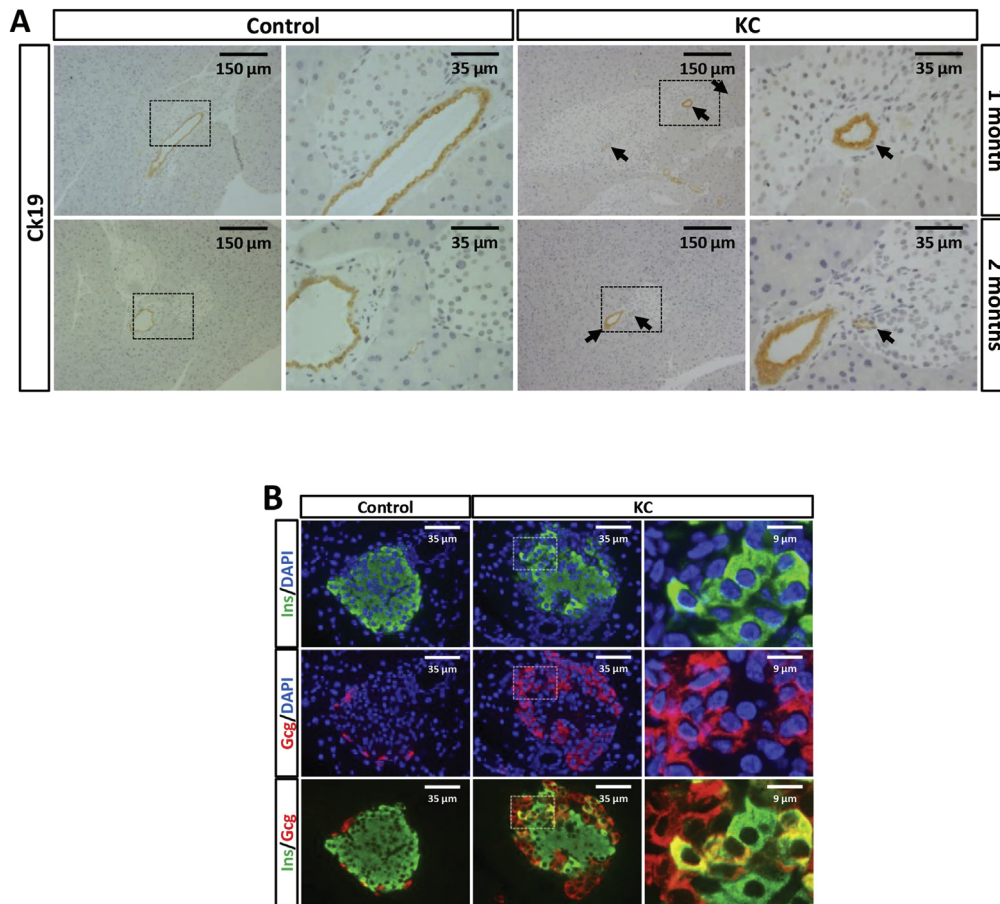


Fig. 3. *Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}* mice exhibit a progressive and severe pancreatic endocrine disorganization. (A) Immunodetection of Cytokeratin-19 (Ck19) performed on serial pancreatic sections reveal early onset of Ck19-positive cells (black arrows) in the endocrine islets of 1- and 2-months-old *Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}* (KC) mice. (B) Insulin (Ins, green) and Glucagon (Gcg, red) double-immunofluorescence experiments, performed on 1-month-old pancreas sections of *Pdx1-Cre; LSL-KRAS^{G12D}* (KC) and control mice, revealed cells co-expressing Ins and Gcg (yellow staining, merge). Cell nuclei are counterstained with DAPI (blue). Right panel shows an enlarged view of the dashed inset. Controls are littermate mice with one of the following genotype: wild-type, *Pdx1-Cre* and *LSL-KRAS^{G12D}* mice.

4. Material and methods

4.1. Mice

The *LSL-KRAS^{G12D}* [19] and *Pdx1-Cre* [20] mice were previously described. Mice were housed and bred in a specific pathogen free animal facility. All experiments were validated by the local Animal Ethic Evaluation Committee (CECCAPP) in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French laws.

4.2. Histology

Immunohistochemistry and immunofluorescence experiments were performed as previously described [21,22]. Primary antibodies used were as follow: Cytokeratin-19 (rat monoclonal, 1:50; Troma-III-s, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa); Insulin (guinea pig polyclonal, 1:25,000; Dako); Glucagon (mouse monoclonal, 1:50,000; Abcam).

4.3. Morphometric quantifications and statistical analysis

Morphometric analyses were realized on Glucagon- or Insulin-immunostained paraffin-embedded pancreatic sections. Whole sections were scanned using an automated E400 Eclipse microscope (Nikon). Acquired sections were subsequently analyzed using

Histolab (Alphelys). Insulin- or Glucagon-positive areas were normalized to total pancreatic surface to calculate the respective percentage occupied by β - or α -cells per pancreas. All scanned sections were carefully selected to exclude artifacts and false-positive areas. Results were represented as mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using Student's *t* test. Differences were considered significant when $P < 0.05$ (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$).

Acknowledgments

We thank the staff of AniCan (CRCL, Lyon) and ALECs-SPF for their technical assistance with animal care. We also thank Christine Carreira (IARC, Lyon) for its assistance and expertise with histological preparation and analysis, AniPath (Université Lyon 1) and more specifically Nicolas Gadot for its help with morphometric analyses. This work was supported by the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM Avenir program), by the Centre National de la Recherche Scientifique, by a grant from IFR62 LYON-EST/CLARA (Projet Transversal 2010) and by fellowships from the Ligue Nationale Contre le Cancer (JG), from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche of France (RMP, DFV and DR) and from the Association pour la Recherche sur le Cancer (DFV). We thank Geneviève Fourel for critical reading of the manuscript.

References

- [1] Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer* 2002;2:897–909.
- [2] Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 2003;4:437–50.
- [3] Aguirre AJ. Activated kras and ink4a/arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev* 2003;17:3112–26.
- [4] Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 1994;371:606–9.
- [5] O'Reilly LA, Gu D, Sarvetnick N, Edlund H, Phillips JM, Fulford T, et al. Alpha-cell neogenesis in an animal model of iddm. *Diabetes* 1997;46:599–606.
- [6] Bonner-Weir S, Baxter LA, Schuppin GT, Smith FE. A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development. *Diabetes* 1993;42:1715–20.
- [7] Wang RN, Kloppel G, Bouwens L. Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats. *Diabetologia* 1995;38:1405–11.
- [8] Rosenberg L. In vivo cell transformation: Neogenesis of beta cells from pancreatic ductal cells. *Cell Transplant* 1995;4:371–83.
- [9] Collombat P, Xu X, Ravassard P, Sosa-Pineda B, Dussaud S, Billestrup N, et al. The ectopic expression of pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells. *Cell* 2009;138:449–62.
- [10] Lu J, Herrera PL, Carreira C, Bonnnavion R, Seigne C, Calender A, et al. Alpha cell-specific men1 ablation triggers the transdifferentiation of glucagon-expressing cells and insulinoma development. *Gastroenterology* 2010;138:1954–65.
- [11] Chung CH, Levine F. Adult pancreatic alpha-cells: a new source of cells for beta-cell regeneration. *Rev Diabet Stud* 2010;7:124–31.
- [12] Brembeck FH, Schreiber FS, Deramandt TB, Craig L, Rhoades B, Swain G, et al. The mutant k-ras oncogene causes pancreatic periductal lymphocytic infiltration and gastric mucous neck cell hyperplasia in transgenic mice. *Cancer Res* 2003;63:2005–9.
- [13] Ray KC, Bell KM, Yan J, Gu G, Chung CH, Washington MK, et al. Epithelial tissues have varying degrees of susceptibility to kras (g12d)-initiated tumorigenesis in a mouse model. *PLoS One* 2011;6:e16786.
- [14] Sandgren EP, Luetkeke NC, Palmiter RD, Brinster RL, Lee DC. Overexpression of tgf alpha in transgenic mice: induction of epithelial hyperplasia, pancreatic metaplasia, and carcinoma of the breast. *Cell* 1990;61:1121–35.
- [15] Guerra C, Schuhmacher AJ, Canamero M, Grippo PJ, Verdaguier L, Perez-Gallego L, et al. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by k-ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* 2007;11:291–302.
- [16] Tuveson DA. *Mist1-KRAS^{G12D}* knock-in mice develop mixed differentiation metastatic exocrine pancreatic carcinoma and hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2006;66:242–7.
- [17] Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008;455:627–32.
- [18] Friedlander SYG, Chu GC, Snyder EL, Girnius N, Dibelius G, Crowley D, et al. Context-dependent transformation of adult pancreatic cells by oncogenic k-ras. *Cancer Cell* 2009;16:379–89.
- [19] Jackson EL, Willis N, Mercer K, Bronson RT, Crowley D, Montoya R, et al. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic k-ras. *Genes Dev* 2001;15:3243–8.
- [20] Gu G, Dubauskaite J, Melton DA. Direct evidence for the pancreatic lineage: Ngn3+ cells are islet progenitors and are distinct from duct progenitors. *Development* 2002;129:2447–57.
- [21] Vincent DF, Gout J, Chuvin N, Arfi V, Pommier RM, Bertolino P, et al. Tif1-gamma suppresses murine pancreatic tumoral transformation by a smad4-independent pathway. *Am J Pathol* 2012;180:2214–21.
- [22] Vincent DF, Yan KP, Treilleux I, Gay F, Arfi V, Kaniewski B, et al. Inactivation of tif1gamma cooperates with kras to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genet* 2009;5:e1000575.

III. Isolation et culture d'acini pancréatiques murins primaires

Isolation and culture of mouse primary pancreatic acinar cells.

Johann Gout, Roxane M. Pommier, David F. Vincent, Bastien Kaniewski, Sylvie Martel, Ulrich Valcourt, Laurent Bartholin.

J. Vis. Exp. (2013). 78, e50514.

Culture primaire de cellules pancréatiques exocrines de souris: un outil indispensable pour la compréhension de l'étiologie de la pancréatite et de la carcinogénèse pancréatique.

Ulrich Valcourt, Roxane M. Pommier, David F. Vincent, Laurent Bartholin.

In *Culture de Cellules Animales (3rd ed.)*. (2014).

Video Article

Isolation and Culture of Mouse Primary Pancreatic Acinar Cells

Johann Gout^{1,2,3,4,5}, Roxane M. Pommier^{1,2,3,4,5}, David F. Vincent^{1,2,3,4,5}, Bastien Kaniewski^{1,2,3,4,5}, Sylvie Martel^{1,2,3,4,5}, Ulrich Valcourt^{1,2,3,4,5}, Laurent Bartholin^{1,2,3,4,5}

¹INSERM U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

²CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon

³Université de Lyon

⁴Université Lyon 1

⁵Centre Léon Bérard

*These authors contributed equally

Correspondence to: Laurent Bartholin at laurent.bartholin@lyon.unicancer.fr

URL: <http://www.jove.com/video/50514>

DOI: [doi:10.3791/50514](https://doi.org/10.3791/50514)

Keywords: Cancer Biology, Issue 78, Cellular Biology, Molecular Biology, Biomedical Engineering, Medicine, Anatomy, Physiology, Surgery, Oncology, Pancreas, Exocrine, Cells, Cultured, Mice, Primary Cell Culture, Exocrine pancreas, Cell culture, Primary acinar cells, Mouse, pancreatic cancer, cancer, tumor, tissue, animal model

Date Published: 8/13/2013

Citation: Gout, J., Pommier, R.M., Vincent, D.F., Kaniewski, B., Martel, S., Valcourt, U., Bartholin, L. Isolation and Culture of Mouse Primary Pancreatic Acinar Cells. *J. Vis. Exp.* (78), e50514, doi:10.3791/50514 (2013).

Abstract

This protocol permits rapid isolation (in less than 1 hr) of murine pancreatic acini, making it possible to maintain them in culture for more than one week. More than 20×10^6 acinar cells can be obtained from a single murine pancreas. This protocol offers the possibility to independently process as many as 10 pancreases in parallel. Because it preserves acinar architecture, this model is well suited for studying the physiology of the exocrine pancreas *in vitro* in contrast to cell lines established from pancreatic tumors, which display many genetic alterations resulting in partial or total loss of their acinar differentiation.

Video Link

The video component of this article can be found at <http://www.jove.com/video/50514/>

Introduction

A frequently encountered problem for research laboratories working on exocrine pancreatic tissue is the difficulty of cultivating acinar cells *in vitro* for a period of time long enough to allow a long-term experiment.

One factor impeding development of such culture systems is the intrinsic sensitivity of pancreatic tissue to experimental manipulation due to the high content in glycolytic, proteolytic, and lipolytic enzymes, which literally digest the pancreatic tissue when they are released during the isolation of pancreatic cells.

A second factor is the remarkable *in vitro* plasticity of acinar cells, which tend to lose their secretory characteristics and transdifferentiate to other mature cells, such as pancreatic ductal cells or hepatocyte-like cells¹. *In vitro*, this cell plasticity varies with the experimental conditions (such as culture medium composition)² and introduces a degree of complexity into the design of appropriate culture conditions for exocrine pancreatic cells¹.

Several methods have been developed for the isolation and culture of acinar cells, first from the guinea pig pancreas³⁻⁵. Initially, those protocols involved digestion of pancreatic tissue with collagenase, chymotrypsin, and a protease cocktail, with ultimate isolation by vigorous mechanical dissociation. The pancreatic cells isolated in this way displayed abnormal structural and functional characteristics, notably a loss of apical structures and significant damage to their membrane receptors. Isolated cells remained viable for only 1 or 2 days.

Preparation of dispersed acini maintains their intra- and intercellular architecture, preserving cell membranes, limiting damage to surface receptors, and thus improving exocrine secretion in response to secretagogues⁶⁻⁸. As a result, this method offers the major advantage of extending acinar cell viability to 7-10 days *in vitro*. Furthermore, this method is currently preferred to acinar cell isolation⁹⁻¹² because maintenance of intercellular contacts, including cell coupling by gap junctions, is an essential determinant of the exocrine pancreatic acinar cell phenotype¹³.

As the dedifferentiation of acinar cells and their transdifferentiation to ductal cells is one of the proposed mechanisms for the genesis of aggressive exocrine pancreatic cancers¹⁴, the dispersed acini model is also an adequate system to study pancreatic plasticity and its

subsequent molecular mechanisms. Furthermore, in combination with the use of genetically modified animals^{15,16} and the development of gene transfer techniques (adenoviral² or lentiviral transduction, use of nanoparticles, etc), this *in vitro* primary acinar cell model can be very useful in determining how various genetic dysfunctions affect the regulation of acinar cell differentiation or dedifferentiation and should provide better understanding of the molecular events responsible for the onset of pancreatitis, precancerous lesions, and changes in cell plasticity.

Isolation of dispersed acini is the approach we use in our laboratory to culture pancreatic acinar cells. We here describe and discuss the method used. It involves enzymatic dissociation of pancreatic tissue (with a bacterial collagenase) coupled to mechanical disruption without dissociation of acinar cells. While most protocols involve culturing the acini, either in suspension or on specially treated plastic substrates, we grow them in suspension only briefly (for 24 hr), seeding them afterwards onto matrix scaffolds if prolonged cell culture is required.

This protocol allows rapid isolation (in less than 1 hr) of dispersed pancreatic acini, sustainable for more than one week in culture. It allows isolation of more than 20×10^6 acinar cells per mouse pancreas. Its simplicity makes it possible to process independently as many as 10 pancreases in parallel. By maintaining the intra- and intercellular architecture of acini and thus the acinar phenotype of isolated primary cells, this model constitutes a system of choice for the study of transdifferentiation mechanisms, as all other exocrine pancreatic models currently available are derived from pancreatic tumors displaying many genetic alterations leading to cellular transformation.

Protocol

All procedures were approved by an ethic committee under regulatory of governmental authority ("Comité d'Evaluation Commun au Centre Léon Bérard, à l'Animalerie de transit de l'ENS, au PBES et au laboratoire P4" (CECCAPP)). Mice were maintained in a specific pathogen-free animal facility at the "Plateforme AniCan, Centre Léon Bérard" (Lyon, France) and handled in compliance with the institutional guidelines.

A schematic representation of the procedure is shown in **Figure 1**.

1. Pancreas Dissection and Dilaceration (Day 0)

A very rapid dissection is critical for an optimal yield of extraction and to insure a good viability of cells in culture. In order to reduce the time needed for pancreas isolation, all instruments and equipment must be ready before the mouse euthanasia.

1. Euthanize mouse by CO₂ asphyxiation or cervical dislocation.

From this step, all procedures have to be performed under a sterile atmosphere (microbiological safety cabinet, level II) with sterile dissection equipment.

2. Fix the mouse and spray the mouse abdomen with 70% ethanol. With any dissecting scissors and forceps, make a V-shaped incision at the genital area and continue it up to the diaphragm to open completely the abdominal cavity.
3. Position the liver lobes against the diaphragm; they should remain there if the body cavity is open far enough. Pull the gut and the colon outside the abdominal cavity to your left, and find the rectum. With a pair of curved forceps and dissecting scissors, grab and section the rectum.
4. With the same pair of forceps, carefully unroll entirely the bowel from the rectum to the stomach by pulling the intestine on your left.

At this step, the pancreas can be distinguished as a small strip between the stomach and the beginning of the bowel. Its ligations with the spleen remain intact.

5. Using Noyes scissors and a pair of forceps, carefully cut the pancreas along the bowel and liberate it with the spleen from the rest of the digestive tract.
6. Grab the spleen and section the pancreas attached to it (**Figure 2**).

At this step, be sure that no mesenteric fat tissue and/or other adjacent tissue (spleen, bowel, etc) could be collected with the pancreas, to avoid cellular contamination.

For the rest of the procedure, all buffers must be prepared without calcium ion Ca²⁺ chelators to avoid the complete dissociation of the exocrine pancreatic tissue in single acinar cells.

7. Rinse the pancreas twice in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) 1x.

At this step, as fat tissue will float contrary to pancreas that will sink, it is easily possible to visualize and rapidly remove the contaminant white adipose tissue still attached to pancreas.

If the pancreas needs to be transported to the cell culture facility, it must be kept on ice in HBSS 1x.

8. Transfer the pancreas in a sterile Petri dish containing 5 ml of HBSS 1x. Using Noyes scissors and a scalpel, slice the pancreas in small pieces of 1 to 3 mm³ (**Figure 3A**).

2. Enzymatic and Mechanical Dissociations of Pancreas (Day 0)

1. Transfer them into a sterile 50 ml polypropylene tube.
2. Centrifuge for 2 min at 450 x g and 4 °C. Aspirate and discard the supernatant to remove cell fragments and blood cells.

3. Add 10 ml of collagenase IA solution (HBSS 1x containing 10 mM HEPES, 200 U/ml of collagenase IA, and 0.25 mg/ml of trypsin inhibitor) to pancreas sections. Using a 25 ml serological pipette, transfer them to a 25 cm² flask. Incubate it for 20-30 min at 37 °C. During this time (every 5 min), perform a mechanical dissociation by energetically moving back-and-forth the pancreas fragments about ten times, in sterile pipettes of decreasing size (25, 10, and 5 ml serological pipettes).

At this step, it is essential to frequently monitor the extent of the enzymatic dissociation of pancreatic sections.

4. When the pancreatic tissue seems to be well-dissociated (according to the disappearance of pancreatic fragments and to the increased turbidity of the solution) (**Figure 3B**), stop the enzymatic reaction by adding 10 ml of cold buffered washing solution (HBSS 1x containing 5 % Fetal Bovine Serum (FBS) and 10 mM HEPES).
5. Transfer it into a sterile 50 ml polypropylene tube and centrifuge for 2 min at 450 x g and 4 °C. Carefully aspirate and discard the supernatant to remove the collagenase IA solution.
6. Resuspend and wash the pellet with 10 ml of buffered washing solution. Centrifuge for 3 min at 450 x g and 4 °C. Carefully aspirate and discard the supernatant. Repeat this step two more times.

3. Filtration and Seeding of Dispersed Acini (Day 0)

1. Resuspend the cell pellet in 7 ml of Waymouth's medium containing 2.5 % FBS, 1 % Penicillin-Streptomycin mixture (PS), 0.25 mg/ml of trypsin inhibitor, and 25 ng/ml of recombinant human Epidermal Growth Factor (EGF).
2. Filtrate the cell mixture by allowing it to pass through a 100 µm filter to retain the non-digested fragments (ducts, blood vessels, and Langerhans islets). Pancreatic acinar structures (acinus of 10-15 cells) pass through.
3. Rinse the filter with 6 ml of Waymouth's medium containing FBS, PS, trypsin inhibitor, and EGF.

After this step, the cells have to be treated very carefully, to avoid any acini dissociation.

4. Seed the isolated acini in a 6-well culture dish (2 ml per well) (**Figure 3C**). Culture them at 37 °C under 5% (v/v) CO₂ atmosphere.

After this step, the acinar cells are cultured in suspension.

4. Acinar Cell Culture (Day 1 to 10)

1. Twenty-four hours after, transfer the acini (in suspension) into a new 6-well culture dish, to eliminate the contaminant cells and cellular remnants that have adhered overnight (**Figure 4**).

If the cell culture needs to be extended for several days or if the experimental conditions require cells grown in monolayer, it is recommended to transfer and seed acini on matrix scaffolds.

2. The day before seeding on matrix support (Day 0), coat a 6-well culture dish with type I collagen (5 µg/cm²). Add 1 ml of type I collagen solution (50 µg/ml in 0.02 M acetic acid, 0.2 µm-filtered) to each well and allow it to passively adsorb on plastic, during 1 hr at 37 °C (or overnight at 4 °C).
3. Aspirate the type I collagen solution and rinse the coated well twice with Phosphate-Buffered Saline 1x.
4. Allow the coated well to dry (under a microbiological safety cabinet) at least 12 hr before use.
5. Transfer the isolated primary acini (obtained at Step 4.1) into the type I collagen-coated 6-well culture dish and culture them in the same conditions as previously described (at 37 °C under 5% (v/v) CO₂ atmosphere). The cells adhere to the type I collagen substrate for 2 days.
6. On Day 3, change the culture medium to eliminate non-viable cells that have not adhered. With time in culture, the cells will progressively spread on the collagen-containing support. Change the culture medium every 3 days (**Figure 5**).

The isolated acinar cells obtained can be counted, after a complete mechanical dissociation by using a Thoma cell counting chamber. Note that isolated acinar cells cannot be maintained in culture afterwards.

The quality of the acinar culture obtained can be controlled by checking the expression of acinar specific markers such as *Trypsinogen*, *Pancreas Transcription Factor 1 subunit Alpha*, or *Carboxypeptidase A1* (by immunocytochemistry or immunofluorescence experiments).

Representative Results

Figure 1 schematizes the "dispersed" acini method for primary acinar cells isolation. The critical steps, which have to be strictly respected during the protocol, are described in the discussion part.

To facilitate its removal, the pancreas has to be collected from the abdomen along with the attached spleen (**Figure 2**). Both organs need to be cut apart, and the residual fat tissue that could be still attached to the pancreas must be removed (Step 1.6).

The macro- and microscopic pictures, which are shown in **Figure 3**, represent the result after every single step of the enzymatic and mechanical dissociations of the pancreas. After slicing, the pancreas is divided into small parts (**Figure 3A**; Step 1.8). The **Figure 3B** shows the aspect of the pancreas following a successful enzymatic dissociation relying on a careful temporal monitoring of the on-going digestion (Step 2.4). This step is a crucial step to determine the exact time that is needed. The **Figure 3C** shows the obtained material after the filtration of the pancreatic mixture (Step 3.4). Only the well-separated acini are kept after this step.

The **Figure 4** is a typical Day 1 illustration of pancreatic acini isolated using our protocol. The transfer of acinar cells into a new culture dish permits to eliminate the cellular fragments and the adherent contaminant cells (Step 4.1).

As shown in **Figure 5**, when cultured on type I collagen, the acinar cells spread and lose their acinar differentiation (morphology and 3D organization), giving rise to a monolayer of spindle-shaped cells (Step 4.6).

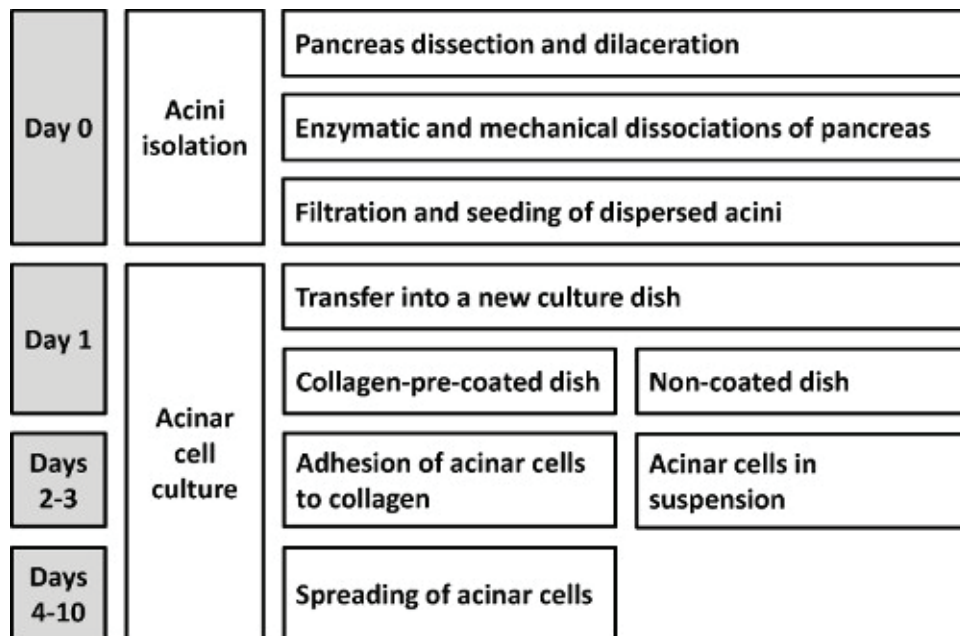


Figure 1. Schematic representation of the protocol allowing the isolation of mouse primary dispersed acini.

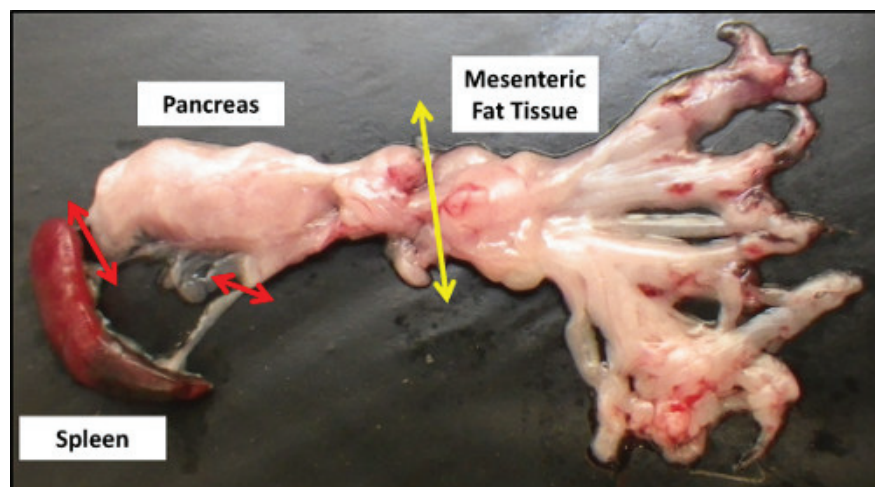


Figure 2. Gross anatomy of the pancreas after dissection. Red and yellow arrows respectively indicate the remaining anatomical connections with the spleen and mesenteric fat tissue that need to be cut for pancreas collection.

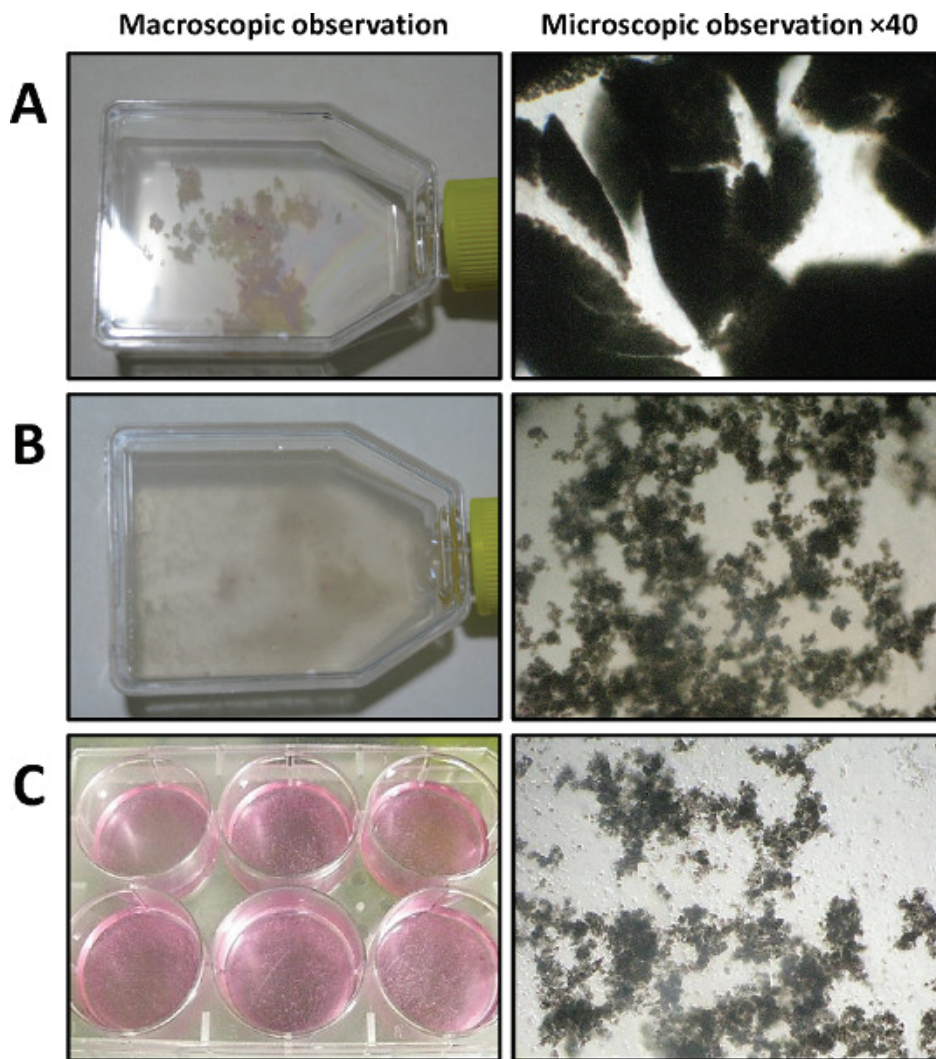


Figure 3. Dispersed acini isolation (Day 0) visualized by macroscopic observation (left panel) and phase-contrast microscopy (right panel, 40X magnification). **A)** After dilaceration (shown in a 25 cm² flask). **B)** After collagenase IA digestion and vigorous mechanical dissociation. **C)** After filtration and transfer in a 6-well culture dish.

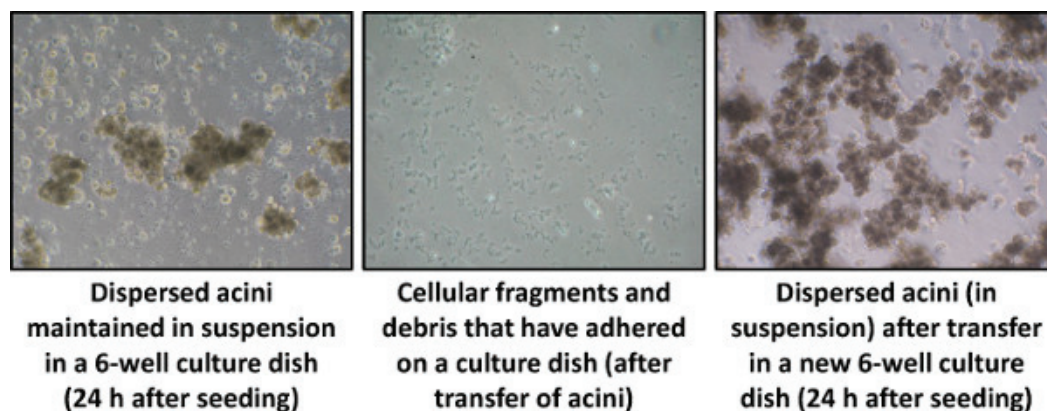


Figure 4. Dispersed acini culture, 24 hr after seeding (Day 1), visualized by phase-contrast microscopy (40X magnification).

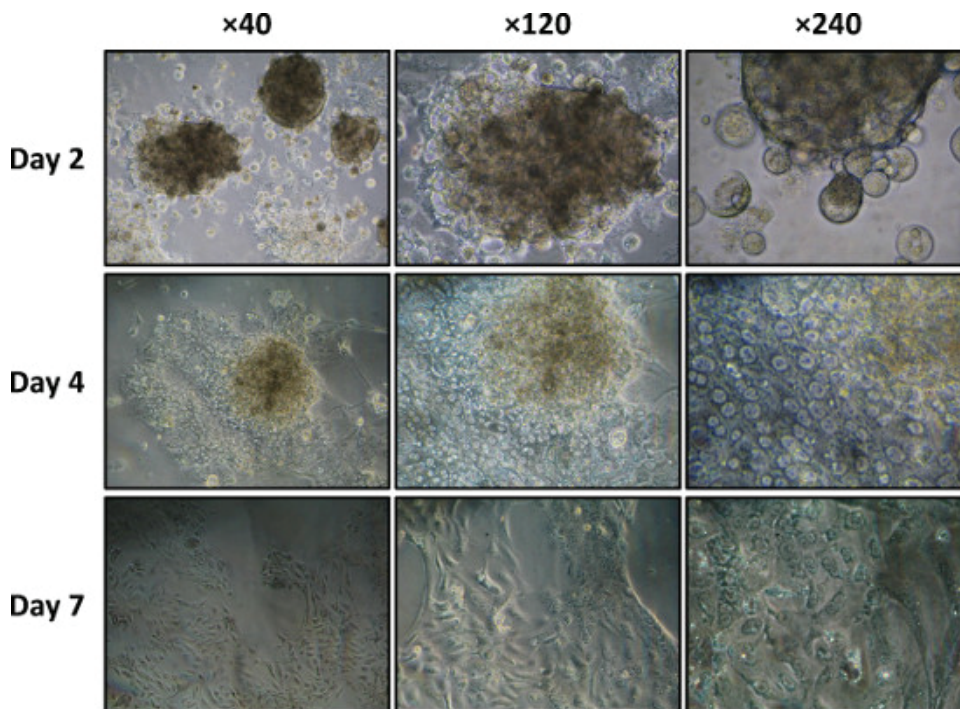


Figure 5. Dispersed acini culture on a type I collagen-coated dish on days 2, 4, and 7 visualized by phase-contrast microscopy (40X, 120X, and 240X magnifications).

Discussion

In this protocol, we describe a procedure for isolating pancreatic acinar cells. This method makes possible to isolate more than 20×10^6 acinar cells per animal in less than 1 hr. Thanks to its rapid and simple implementation (as many as 10 pancreases can be independently processed per experiment in parallel), this protocol appears as a good compromise between existing isolation methods^{3-5,9-12,17}.

Critical steps/Trouble-shooting

The efficiency of this method relies on precautions taken at a few critical points. The first step of pancreas dilaceration (Step 1.8) is essential to subsequent pancreas enzymatic digestion. Insufficient cutting-up will decrease the yield of enzymatic dissociation and the number of acinar cells obtained. This makes it necessary to prolong incubation with collagenase IA, inevitably causing an excessive dissociation of acinar cells and consecutively increasing cell death.

As cautioned above, the second critical step is digestion by collagenase IA (Step 2.3). Too much enzymatic dissociation leads to a high rate of cell death. The extent of pancreas digestion must be frequently monitored during this critical step (**Figure 3B**). After mechanical and enzymatic dissociations, special attention needs to be paid in order to very gently handle the dispersed acini in order to preserve their intercellular structures.

Limitations

Even if the addition of Epidermal Growth Factor (EGF) to the Waymouth's culture may precipitate the progressive acinar-to-ductal transdifferentiation, it is essential to maintain the cells alive.

As described in the protocol and if needed, the *in vitro* culture period of the acinar cells can be extended to up to 10 days by seeding the cells on matrix scaffolds such as type I collagen. Yet importantly, and as shown by others¹, culturing cells on type I collagen will induce the progressive transdifferentiation of acinar cells to ductal cells. This process starts after 4 days of culture on collagen and can be complete after 7 days. It may therefore be necessary to check for the presence of a specific ductal marker such as the *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* or *Cytokeratin-19* (by immunocytochemistry or immunofluorescence experiments) if the acinar cell culture needs to be extended to 1 week. The alternative use of Matrigel as a matrix scaffold, by reducing the adherence of dispersed acini, makes it possible to extend the maintenance of their acinar phenotype for 2 days.

Possible modifications

Sectioning the rectum during the dissection step increases the risk of bacterial contamination. We have never experienced such a situation. However, if needed, there is another procedure to circumvent this possible issue. It consists of finding the stomach, spleen and the first part of duodenum, and sectioning attached pancreas. Note that this alternate procedure needs to be perfectly mastered. Otherwise, the duration of the dissection will get longer, jeopardizing then the quality of the removed biological material.

The long-term monolayer culture of acinar cells can be optimized, notably by modifying the support matrix. If required by the experimental conditions, type I collagen can be replaced with another scaffold, such as Matrigel. In this case, Matrigel must be freshly prepared at 400 µg/ml concentration in cold Phosphate-Buffered Saline 1x. Thereafter, wells are incubated with Matrigel (40 µg/cm²) overnight at 4 °C. This point must be strictly respected. The culture procedure remains the same as described in Step 4.

The method can be further optimized empirically. For example, the amount of amino acids in the culture medium of exocrine pancreatic cells can regulate protein synthesis by these cells¹⁸. Sphyris *et al.*² and Bläuer *et al.*¹⁹ have elaborated a complete culture medium containing a higher amount of amino acids (essential and non-essential), promoting maintenance of acinar cells in the differentiated state. Such a medium might be very useful if one wishes to culture acinar cells isolated by this method for more than 10 days.

Another parameter that could be modified if long-term culture is required, is the pH of the culture medium. Physiologically, the apical pole of acinar cells is in permanent contact with a bicarbonate-rich, slightly alkaline liquid giving rise to the pancreatic juice. It is tempting to speculate that the pH of the acinar cell environment could be important in maintaining the acinar differentiation state. Some protocols previously reported the use of a culture medium with a pH adjusted to 7.8 to mimic the "initial" physiology of acinar cells¹⁹.

Significance of the technique

It is important to mention that there exist other protocols for culturing acinar cells, using pancreas explants and organotypic cultures¹⁹. Their application, based on pancreatic cell migration from the explant to the membrane on which they are cultured, is more difficult. Isolation of these pancreatic cells notably requires a first week of pancreatic explant culture. The major advantage of this method is that no enzymatic dissociation is needed, so that both the cell membrane integrity and cell-to-cell interactions are preserved. Under these conditions, acinar cells can be maintained *in vitro* for up to 14 days. Yet the acinar cell culture obtained is not pure, and contaminant fibroblasts, ductal cells, and endothelial cells are inevitably present, which could be incompatible with some kinds of experiments. In contrast, our procedure rapidly yields a pure population of acinar cells, conserving their initial architecture of acini.

Dorrell *et al.* described another method in order to isolate the different mouse pancreatic cell types (including acinar, duct, and endocrine cells), using Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)¹⁷. This method is very efficient to obtain a pure (or specific) population of acinar cells. However, it requires a fluorescent labeling with specific antibodies, prior sorting. Moreover, this procedure also requires an expertise in FACS and a flow cytometer. Besides, this technique does not permit an extended culture of acinar cells, due to the loss of their initial architecture of acini. Our rapid method allows an extended *in vitro* culture of dispersed acinar cells with a quality and a purity that are compatible with most of the further routine applications.

Future applications

Once mastered, this technique for isolating/culturing acinar cells should prove very useful in addressing a range of questions and notably for investigating the mechanisms involved in pancreatic plasticity and transdifferentiation, which are well known but poorly understood. By preserving some inter- and intracellular communications, this dispersed acini model remains more physiologically relevant than immortalized cell lines.

In the field of pancreatic tumorigenesis, this primary cell model provides an adequate system for studying acinar cell transdifferentiation, one of the mechanisms proposed to generate aggressive pancreatic cancers. Although immortalized human or murine cell lines (such as Colo357, Panc-1, or BxPC3) might be more flexible to use than primary acinar cells, both their origin and their complex genetic status (as transformed cell lines initially isolated from pancreatic tumors or even pancreatic metastases) constitute major drawbacks in studying such mechanisms.

Disclosures

The authors declare that they have no competing financial interests.

Acknowledgements

We thank the staff of AniCan (CRCL, Lyon) for their technical assistance with animal care. This work was supported by the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM Avenir Program), the Ligue Nationale Contre le Cancer, by the Association pour la Recherche sur le Cancer, by the Institut National du Cancer, and by fellowships from the Ligue Nationale Contre le Cancer (JG), from the Institut National du Cancer (JG), from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche of France (RMP and DFV) and from the Association pour la Recherche sur le Cancer (DFV).

References

1. Lardon, J. & Bouwens, L. Metaplasia in the pancreas. *Differentiation*. **73**, 278-286 (2005).
2. Sphyris, N., Logsdon, C.D., & Harrison, D.J. Improved retention of zymogen granules in cultured murine pancreatic acinar cells and induction of acinar-ductal transdifferentiation *in vitro*. *Pancreas*. **30**, 148-157 (2005).
3. Amsterdam, A. & Jamieson, J.D. Structural and functional characterization of isolated pancreatic exocrine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 3028-3032 (1972).
4. Amsterdam, A. & Jamieson, J.D. Studies on dispersed pancreatic exocrine cells. I. Dissociation technique and morphologic characteristics of separated cells. *J. Cell. Biol.* **63**, 1037-1056 (1974).
5. Amsterdam, A. & Jamieson, J.D. Studies on dispersed pancreatic exocrine cells. II. Functional characteristics of separated cells. *J. Cell. Biol.* **63**, 1057-1073 (1974).

6. Schultz, G.S., *et al.* Guinea pig pancreatic acini prepared with purified collagenase. *Exp. Cell Res.* **130**, 49-62 (1980).
7. Williams, J.A., Korc, M., & Dormer, R.L. Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini. *Am. J. Physiol.* **235**, 517-524 (1978).
8. Logsdon, C.D. & Williams, J.A. Epidermal growth factor binding and biologic effects on mouse pancreatic acini. *Gastroenterology.* **85**, 339-345 (1983).
9. Han, B. & Logsdon, C.D. Cholecystokinin induction of mob-1 chemokine expression in pancreatic acinar cells requires NF-kappaB activation. *Am. J. Physiol.* **277**, C74-82 (1999).
10. Ji, B., Kopin, A.S., & Logsdon, C.D. Species differences between rat and mouse CCKA receptors determine the divergent acinar cell response to the cholecystokinin analog JMV-180. *J. Biol. Chem.* **275**, 19115-19120 (2000).
11. Ji, K.A., Yang, M.S., Jou, I., Shong, M.H., & Joe, E.H. Thrombin induces expression of cytokine-induced SH2 protein (CIS) in rat brain astrocytes: involvement of phospholipase A2, cyclooxygenase, and lipoxygenase. *Glia.* **48**, 102-111 (2004).
12. Gaiser, S., *et al.* Intracellular activation of trypsinogen in transgenic mice induces acute but not chronic pancreatitis. *Gut.* **60**, 1379-1388 (2011).
13. Logsdon, C.D. & Williams, J.A. Pancreatic acinar cells in monolayer culture: direct trophic effects of caerulein *in vitro*. *Am. J. Physiol.* **250**, G440-447 (1986).
14. Stanger, B.Z. & Dor, Y. Dissecting the cellular origins of pancreatic cancer. *Cell Cycle.* **5**, 43-46 (2006).
15. Vincent, D.F., *et al.* Tif1gamma suppresses murine pancreatic tumoral transformation by a smad4-independent pathway. *Am. J. Pathol.* **180**, 2214-2221 (2012).
16. Vincent, D.F., *et al.* Inactivation of TIF1gamma cooperates with Kras to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genet.* **5**, e1000575 (2009).
17. Dorrell, C., *et al.* Isolation of mouse pancreatic alpha, beta, duct and acinar populations with cell surface markers. *Mol. Cell Endocrinol.* **339**, 144-150 (2011).
18. Case, R.M. Synthesis, intracellular transport and discharge of exportable proteins in the pancreatic acinar cell and other cells. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **53**, 211-354 (1978).
19. Blauer, M., Nordback, I., Sand, J., & Laukkarinen, J. A novel explant outgrowth culture model for mouse pancreatic acinar cells with long-term maintenance of secretory phenotype. *Eur. J. Cell. Biol.* **90**, 1052-1060 (2011).

31

Culture primaire de cellules pancréatiques exocrines de souris

Un outil indispensable pour la compréhension de l'étiologie de la carcinogenèse pancréatique

*U. VALCOURT, R. M. POMMIER,
D. F. VINCENT, L. BARTHOLIN*

L'adénocarcinome du pancréas, communément nommé cancer du pancréas exocrine, est le type de cancer pancréatique le plus répandu. Il représente 85 % des néoplasmes pancréatiques. L'adénocarcinome pancréatique est considéré comme une des néoplasies les plus agressives (Jemal et al., 2010). En effet, il représente la quatrième cause de mortalité par cancer dans les pays industrialisés (notamment aux États-Unis), avec un taux de survie à 5 ans inférieur à 6 % (Jemal et al., 2010) et une durée de survie médiane proche de 6 mois (<http://seer.cancer.gov/>; Maitra et Hruban, 2008). Le mauvais pronostic des patients atteints de ce cancer résulte de l'absence de symptômes spécifiques et de l'inexistence de facteurs diagnostiques, si bien que la prise en charge du patient est bien souvent tardive, faisant face à une dissémination tumorale trop avancée pour permettre une résection chirurgicale (seulement 10 à 15 % des cancers du pancréas sont opérables). En outre, les traitements chimiothérapeutiques conventionnels actuels restent inefficaces. L'adénocarcinome du pancréas est une pathologie liée au vieillissement. En effet, il apparaît rarement chez des patients âgés de moins de 40 ans, mais son incidence augmente fortement entre 60 et 80 ans (Maitra et Hruban, 2008 ; Jemal et al., 2010). L'augmentation progressive de l'incidence des adénocarcinomes pancréatiques (Jemal et al., 2010), corrélée à l'allongement de l'espérance de vie de la population, est l'une des préoccupations importantes des systèmes de santé des pays industrialisés. Dans les prochaines décennies, le cancer du pancréas exocrine pourrait même devenir la première cause de mortalité par un cancer.

De nombreuses études épidémiologiques et génétiques ont été menées sur les vingt dernières années pour comprendre l'étiologie de l'adénocarcinome du pancréas. De nombreux facteurs augmentent le risque d'apparition

d'adénocarcinome pancréatique, comme le tabac, l'obésité, le diabète, la pancréatite chronique... (Hezel et al., 2006 ; Maitra et Hruban, 2008). Toutefois, il est maintenant évident que ce cancer provient de mutations somatiques ou héréditaires de certains gènes (Hezel et al., 2006 ; Maitra et Hruban, 2008). Les altérations géniques rencontrées de façon récurrentes dans les cancers pancréatiques exocrines incluent des mutations activatrices de l'oncogène *KRAS* (90-95 % des cas) ou des mutations inactivatrices de gènes suppresseurs de tumeurs, comme *p16^{INK4A}* (90 %), *TP53* (50-75 %) et *SMAD4/DPC4* (55 %) (Bardeesy et DePinho, 2002 ; Maitra et Hruban, 2008). Le cancer du pancréas est initié à partir de lésions précurseurs précancéreuses qui accumulent de façon séquentielle ces altérations géniques (Bardeesy et DePinho, 2002 ; Maitra et Hruban, 2008). En outre, il est clairement démontré que la pancréatite est un déterminant micro-environnemental très favorable à l'initiation de la carcinogenèse dans ce tissu exocrine (Raimondi et al., 2010).

À partir de ces données génétiques et physiopathologiques, de nombreux modèles expérimentaux de cancer pancréatique ont été développés, basés sur la création de souris génétiquement modifiées, qui reproduisent la progression séquentielle de la maladie humaine (Aguirre et al., 2003 ; Hingorani et al., 2003 ; Hingorani et al., 2005 ; Bardeesy et al., 2006 ; Izeradjene et al., 2007). Ces souris génétiquement modifiées représentent de précieux outils pour appréhender les événements moléculaires et cellulaires permettant l'établissement d'un adénocarcinome du pancréas (Carriere et al., 2011 ; Guerra et al., 2011). Malgré les progrès importants de l'imagerie du petit animal, l'utilisation des modèles animaux ne permet pas de répondre à toutes les questions mécanistiques concernant l'apparition de lésions précancéreuses et leur éventuelle

progression vers des lésions malignes. Ces modèles animaux représentent toutefois des sources précieuses de cellules exocrines possédant différentes altérations génétiques. Ainsi, la culture primaire de cellules pancréatiques exocrines sécrétrices d'enzymes digestives (cellules acineuses) constitue un outil de choix pour la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires de l'étiologie de la pancréatite et de la carcinogenèse pancréatique.

Après une présentation générale de la biologie du pancréas, nous discuterons dans un premier temps des approches historiques de la culture de cellules acineuses pancréatiques. Comme notre laboratoire est spécialisé dans l'utilisation de nombreux modèles de souris génétiquement modifiées pour l'étude de l'étiologie de la pancréatite, des lésions précancéreuses et cancéreuses (Bartholin et al., 2008 ; Doisne et al., 2009 ; Vincent et al., 2009 ; Vincent et al., 2012), les protocoles d'isolement des cellules acineuses pancréatiques seront abordés uniquement chez cette espèce animale. Dans la troisième partie, nous présenterons en détail la procédure expérimentale utilisée au laboratoire en routine et nous permettant d'isoler des acini pancréatiques murins « intacts ». Puis, nous évoquerons ensuite brièvement la caractérisation moléculaire des cellules pancréatiques obtenues, en indiquant les protocoles permettant l'extraction optimale des protéines et des acides ribonucléiques à partir de ce type cellulaire particulier. Enfin, ce chapitre se terminera par une présentation de protocoles complémentaires utilisés dans d'autres laboratoires.

Biologie du pancréas

Le pancréas est un organe associé au tractus digestif. Chez l'Homme, le pancréas est un organe rétro-péritonéal (localisé en arrière du péritoine pariétal), situé dans l'abdomen supérieur, au-devant des premières vertèbres lombaires, en arrière de l'estomac, entre la rate et l'anse duodénale (Moo et al., 2009). Le pancréas est une glande amphicrine, c'est-à-dire possédant des capacités de sécrétion exocrine et endocrine. La partie exocrine est responsable de la sécrétion du suc pancréatique, nécessaire à la digestion des aliments, alors que la partie endocrine sécrète les hormones responsables du contrôle du métabolisme du glucose. Ces deux fonctions du pancréas sont assurées par des compartiments épithéliaux distincts possédant des morphologies différentes (Leung, 2010a). Le pancréas est une glande organisée en lobules (**figure 31-1B**), séparés les uns des autres par de fines travées (les septa) composées de tissu conjonctif lâche. Le pancréas exocrine constitue la majeure partie de l'organe (90-95 % du volume du pancréas). Ce compartiment exocrine est constitué de nombreux acini sécrétoires, serrés les uns contre les autres, qui constituent les plus petites unités d'un système de canaux excréteurs branchés. Très schématiquement, le

pancréas exocrine ressemble à une grappe de raisins, où les acini correspondent aux baies, et le système canalaire aux branches de la grappe.

Au niveau histologique, les acini sont composés d'un amas irrégulier de cellules acineuses, de forme pyramidale, qui forment alors une minuscule lumière centrale, à l'origine du canal excréteur (**figure 31-1C**) (Leung, 2010a). Les cellules acineuses sont les cellules responsables de la synthèse des enzymes digestives qu'elles libèrent par exocytose dans la lumière acineuse. La lumière de l'acinus est en prolongement direct avec la lumière d'un petit canal (canal intercalaire), qui est formé par les cellules centro-acineuses (*voir* figure 31-1C) (Leung, 2010a). Les cellules centro-acineuses forment une transition histologique entre les cellules acineuses et le système excréteur canalaire. Ces cellules sont nommées ainsi car dans les coupes histologiques passant par le centre des acini, elles apparaissent souvent pénétrer l'unité acineuse, occupant la lumière acineuse. Le canal intercalaire rejoint alors d'autres canaux pour former des canaux excréteurs de diamètres croissants, tout d'abord les canaux intralobulaires, qui convergent vers des canaux interlobulaires (*voir* figure 31-1B) (Leung, 2010a). Ces canaux sont constitués de cellules épithéliales de morphologie cubique, nommées les cellules canalaire (*voir* figure 31-1C). Les plus gros canaux sont bordés d'un épithélium cubique stratifié pouvant être entouré d'un tissu conjonctif. Les cellules canalaire représentent 10 % des cellules du pancréas et correspondent à 4 % du volume de l'organe (Githens, 1988). Elles produisent et libèrent une solution alcaline riche en mucus et en ions bicarbonates, qui vise à neutraliser le pH acide du suc gastrique (Leung, 2010a ; Rovasio, 2010). Le suc pancréatique, contenant les sécrétions enzymatiques et hydroélectrolytiques, s'écoule dans le canal pancréatique principal (canal de Wirsung), qui rejoint la voie biliaire (canal cholédoque) au niveau de l'ampoule de Vater et se déverse dans le duodénum par la papille duodénale principale (**figure 31-1A**). Certains individus possèdent également un canal pancréatique accessoire (canal de Santorini), qui est plus petit et qui rejoint directement le duodénum (Moo et al., 2009 ; Rovasio, 2010).

Au niveau ultrastructural, une cellule acineuse est caractérisée par une organisation polarisée des différents organites (**figure 31-1D**). Le noyau occupe une position basale et est entouré d'un abondant réseau de réticulum endoplasmique rugueux ainsi que de nombreuses mitochondries. La partie centrale de la cellule concentre un appareil de Golgi très développé, en accord avec l'abondante sécrétion de protéines. La caractéristique principale de cette cellule est la présence de nombreuses vésicules sécrétrices (nommées grains ou granules de zymogène) qui contiennent des enzymes ou précurseurs d'enzymes (Rovasio, 2010). Les vésicules sécrétrices sont orientées vers le pôle apical des cellules. En réponse à des stimuli excréteurs, elles déversent leur contenu au niveau de la lumière en fusionnant avec la membrane plasmique. La membrane apicale des cellules acineuses pancréatiques est

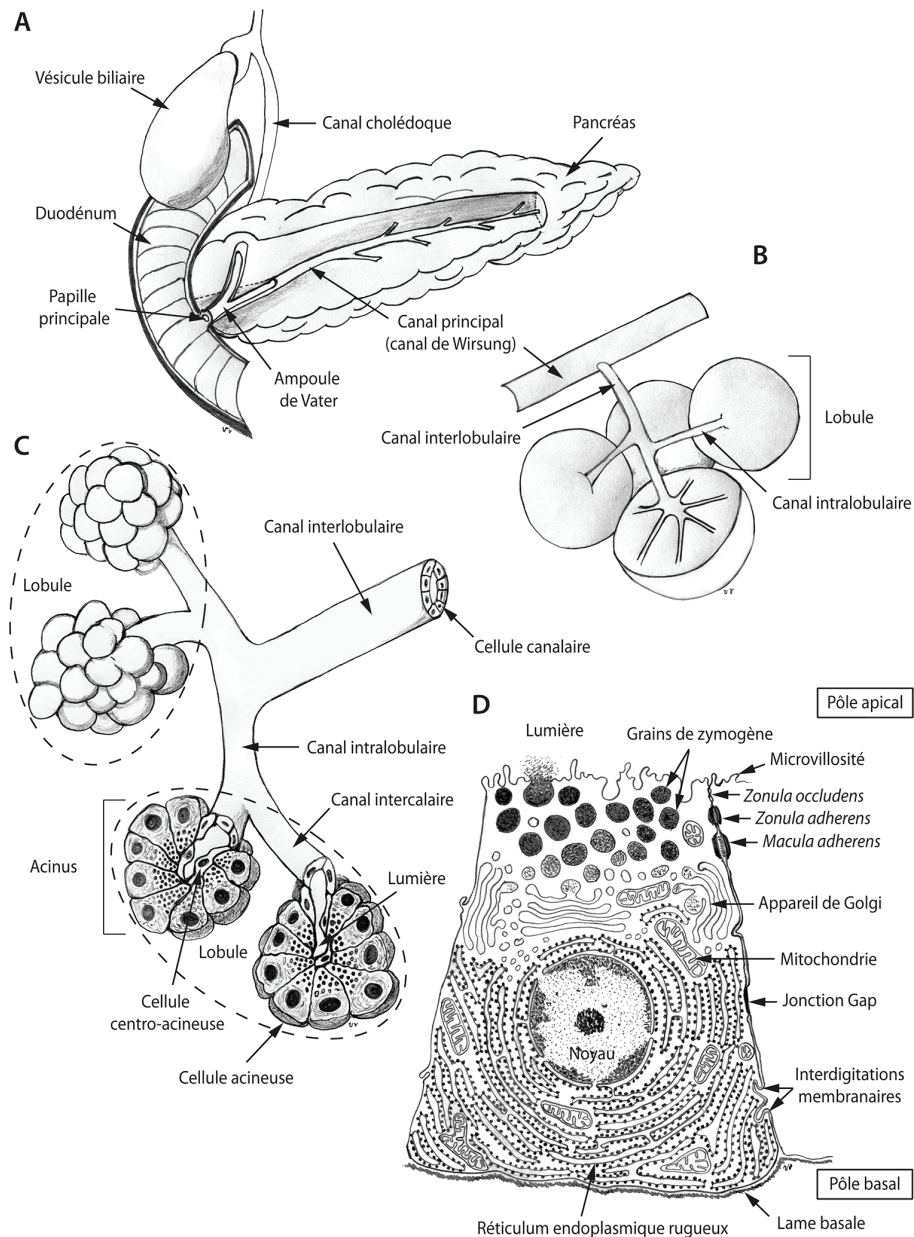


Figure 31-1 Représentations schématiques (A) du pancréas, (B) de l'organisation des lobules pancréatiques, (C) de l'architecture des acini et (D) d'une cellule acineuse pancréatique. Les acini pancréatiques peuvent être arrondis ou allongés et parfois branchés. Le nombre d'acini par lobule est variable ; seulement deux acini ont été représentés dans ce dessin, par commodité. Les cellules acineuses sont polarisées, avec un noyau et un réticulum endoplasmique rugueux plutôt en position basale et de nombreux grains de zymogènes localisés dans le cytoplasme apical. Notez l'extension des cellules centro-acineuses dans l'acinus et la continuité de la lumière acineuse avec le système canalaire. Les échelles et les proportions ne sont pas respectées.

également caractérisée par la présence de courtes microvillosités. La polarité de la cellule acineuse est assurée par la présence de complexes de jonctions au niveau apical, qui sont formés par les zonula occludens (jonctions serrées), zonula adherens (jonctions d'adhérence) et des macula

adherens (desmosomes ponctués). Les jonctions serrées assurent également l'étanchéité entre la lumière, riche en suc pancréatique, et le compartiment baso-latéral des cellules. Les cellules acineuses sont couplées à chaque cellule de l'acinus par des jonctions communicantes (jonctions

gap) permettant une sécrétion synchronisée en réponse aux signaux excréteurs.

Le pancréas exocrine possède un cycle de sécrétion rythmé, caractérisé par un taux basal de sécrétion continue, qui augmente de façon intense, mais périodiquement, suite à une stimulation nerveuse ou hormonale liée à l'ingestion d'aliments. Ces stimulations impliquent notamment des neurotransmetteurs (acétylcholine, sérotonine...), issus de fibres nerveuses provenant du nerf vague, et des peptides régulateurs, issus de l'intestin et de l'estomac (Chang et Chey, 2001 ; Leung, 2010b). Le contrôle hormonal de la sécrétion des cellules acineuses est influencé par l'acidité des sucs gastriques lorsqu'ils arrivent au niveau du duodénum. Cet événement stimule la sécrétion de deux hormones polypeptidiques intestinales, la sécrétine et la cholécystokinine, dans la circulation systémique. Ces deux hormones induisent la sécrétion d'un volume important de liquide alcalin pauvre en activité enzymatique par les cellules canalaire et d'une large quantité d'enzymes digestives par les cellules acineuses (Chang et Chey, 2001). Que les ligands soient des neurotransmetteurs ou des hormones polypeptidiques, les cellules acineuses possèdent des récepteurs à ces sécrétagogues. Ces récepteurs appartiennent à deux grandes classes : ceux réalisant leurs effets via l'AMP cyclique (sécrétine) et ceux induisant une concentration intracellulaire élevée en Ca^{2+} (cholécystokinine et acétylcholine, par exemple) (Leung, 2010b).

En réponse aux stimulations adéquates, les cellules pancréatiques acineuses sécrètent des amylases, des lipases et des protéases, à savoir les enzymes responsables de la digestion, respectivement, des sucres, des lipides et des protéines issus de l'alimentation (Leung, 2010b). Les protéases retrouvées dans le suc pancréatique sont la trypsine (20 % du contenu pancréatique), la chymotrypsine, l'élastase, les carboxypeptidases (A et B) et la kallikréine (Kunitz et Northrop, 1936 ; Doyle et al., 2012). Ces enzymes protéolytiques sont sécrétées sous des formes inactives (pro-enzymes) qui deviennent actives lorsque le contenu du suc pancréatique atteint le duodénum. Au niveau de la lumière duodénale, l'entérokinase, une enzyme ancrée à la surface apicale des entérocytes, active le trypsinogène en trypsine, qui peut alors convertir (et activer) les autres pro-enzymes protéolytiques du suc pancréatique (chymotrypsinogène, pro-carboxypeptidase, pro-kallikréine et pro-élastase). La trypsine est également capable d'activer les molécules de trypsinogène, permettant ainsi de générer une vague rapide d'activation enzymatique. Toutefois, si les protéases sont activées de façon prématurée dans le pancréas, un phénomène rencontré dans le cas de pancréatite aiguë, elles peuvent digérer les tissus pancréatiques, aboutissant à une destruction rapide et massive de la glande. Les cellules acineuses sécrètent également des enzymes glycolytiques, comme l'amylase (Doyle et al., 2012), qui est libérée directement sous une forme active. Cette enzyme est responsable de la dégradation de l'amidon en dextrine et maltose. Enfin, les cellules acineuses pancréatiques produisent

diverses lipases (phospholipase A2 et lipase des triglycérides) et des hydrolases du cholestérol (Doyle et al., 2012). Ces enzymes lipolytiques sont également sécrétées sous une forme active.

Les cellules étoilées sont des cellules résidentes du tissu conjonctif localisées autour des acini, des vaisseaux lymphatiques et vasculaires et des canaux pancréatiques. Ces cellules quiescentes possèdent une morphologie allongée, avec beaucoup d'extensions cytoplasmiques leur procurant une forme caractéristique qui leur a donné leur nom. Elles partagent des caractéristiques structurales et fonctionnelles avec les cellules étoilées hépatiques, permettant de les distinguer des fibroblastes « classiques ». En effet, elles ont une grande capacité de stockage de la graisse (cytoplasme riche en gouttelettes lipidiques) et expriment des filaments intermédiaires caractéristiques comme la desmine et la protéine gliale fibrillaire acide. Ces cellules peuvent être activées lors de processus inflammatoires. Cette activation s'opère notamment par leur différenciation en cellules myofibroblastiques (exprimant des marqueurs cellulaires spécifiques comme l'isoforme α de l'actine du muscle lisse) et par une expression accrue de protéines de la matrice extracellulaire (collagène de type I). L'activation s'accompagne également d'une augmentation de leur capacité proliférative. L'activation soutenue des cellules étoilées est associée aux phénomènes de fibrose observés lors de pancréatite chronique et participe à la réaction desmoplastique (stromale) retrouvée dans le cancer du pancréas (Vonlaufen et al., 2008).

Le compartiment endocrine du pancréas est minoritaire ; il ne représente que 1 à 2 % de la masse totale de l'organe. Ce compartiment du pancréas est constitué d'îlots cellulaires, de taille variable, éparpillés au sein du tissu exocrine, les îlots de Langerhans (**figure 31-2**). Ces îlots comportent quatre types cellulaires spécialisés qui sécrètent des hormones régulant le métabolisme du glucose. Les cellules α et β régulent l'utilisation du glucose en produisant le glucagon (hormone hyperglycémiante) et l'insuline (hormone hypoglycémiante), respectivement. Les cellules β sont les cellules les plus nombreuses du pancréas endocrine. Leur destruction par des anticorps auto-immuns engendre l'apparition de diabète sucré (de type 1). Les cellules δ et PP produisent et sécrètent la somatostatine et le polypeptide pancréatique, respectivement, deux hormones régulant les activités sécrétrices des autres cellules endocrines pancréatiques (Moo et al., 2009).

Cette revue traite de l'isolement et de la culture des *cellules pancréatiques exocrines sécrétrices d'enzymes digestives* (acini dispersés). Pour l'extraction et la purification d'autres types cellulaires pancréatiques, le lecteur peut être invité à consulter des revues techniques sur la purification des cellules étoilées (Apte et al., 1998 ; Ramm, 1998 ; Kruse et al., 2001 ; Mathison et al., 2010), des cellules centro-acineuses (Rovira et al., 2010) et des cellules canalaire (Agbunag et al., 2006 ; Klein et al., 2009). Avec la problématique de transplantation de cellules des îlots

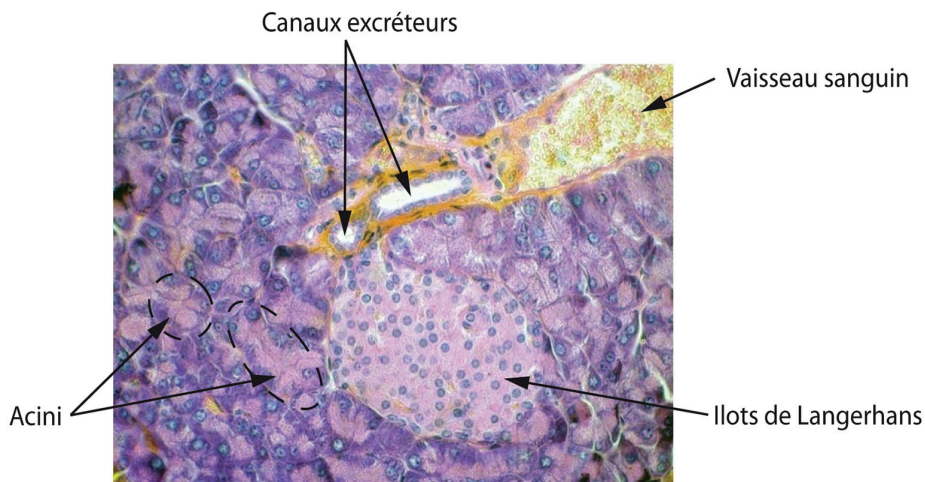


Figure 31-2 Coupe histologique de pancréas de souris (coloration hématoxyline-phloxine-safran, $\times 400$). Les fibres de collagène (tissu conjonctif) sont mises en évidence en orange avec ce type de coloration. Notez la différence de coloration entre le pôle basal des cellules acineuses, avec le noyau et le réticulum endoplasmique rugueux (basophiles), et le cytoplasme apical (plutôt acidophile) avec les nombreux grains de zymogènes.

de Langerhans pour pallier le mauvais fonctionnement du pancréas endocrine, dans le cas de diabète de type 1 par exemple, la procédure d'isolement de cellules pancréatiques endocrines (îlots de Langerhans) est largement décrite dans la littérature (Ricordi et al., 1989 ; Noguchi, 2009).

Culture des cellules acineuses dispersées ou d'acini dispersés

Un obstacle fréquemment rencontré par les laboratoires de recherche travaillant sur le tissu pancréatique exocrine est la difficulté de cultiver *in vitro* les cellules acineuses suffisamment longtemps pour permettre une expérimentation de longue durée. Un des déterminants rendant difficile le développement de tels systèmes de culture est la sensibilité intrinsèque du tissu pancréatique à la manipulation expérimentale. Ce facteur est imputable au contenu élevé en enzymes glycolytiques, protéolytiques et lipolytiques, qui contribuent littéralement à la digestion du tissu pancréatique lorsque ces dernières sont libérées au cours du prélèvement et de la dissociation du tissu pancréatique. Le second déterminant important est la remarquable plasticité des cellules acineuses *in vitro*, accompagnée de la perte des caractéristiques sécrétrices et une transdifférenciation en d'autres cellules matures, comme en cellules canalaire pancréatiques ou en cellules de type hépatocyte... (Lardon et Bouwens, 2005). Cette plasticité cellulaire *in vitro* varie en fonction des conditions expérimentales, comme la composition du milieu (Sphyris et al., 2005), et apporte un degré de complexité supplémentaire à

la conception des conditions de culture appropriées pour les cellules pancréatiques exocrines (Lardon et Bouwens, 2005).

Plusieurs méthodes ont été développées pour l'isolement et la mise en culture de cellules acineuses. Les techniques pionnières consistaient en l'isolement de cellules acineuses en soumettant le pancréas de cobaye à une solution enzymatique contenant deux protéases, la collagénase et la chymotrypsine, ainsi que de la hyaluronidase – une enzyme catalysant l'hydrolyse de l'acide hyaluronique (Amsterdam et Jamieson, 1972, 1974a, 1974b).

La collagénase est une enzyme qui clive spécifiquement les molécules de collagène sous la forme de triple hélice. Elle permet ainsi de dégrader les fibrilles de collagène qui forment les septa entourant les acini. La dissociation des acini pancréatiques de la matrice extracellulaire est achevée par les activités enzymatiques conjointes de la hyaluronidase et de la chymotrypsine, qui aboutissent à la dégradation des autres macromolécules matricielles.

La chymotrypsine permet également de dissocier et de libérer les cellules acineuses d'entre elles. En effet, cette enzyme protéolytique à spectre large dégrade les protéines de surface cellulaire, et notamment les protéines d'adhérence intercellulaires (intégrines, cadhérines, nectines...). La suspension cellulaire est ensuite exposée à des agents chélatant les cations divalents, comme l'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA). Cet agent piège les cations nécessaires à la fonction des protéines d'adhérence (cadhérines) retrouvées au niveau des jonctions d'adhérence et des desmosomes et accélère la dissociation des cellules acineuses. L'isolement des cellules acineuses pancréatiques est alors achevé par une dissociation mécanique engendrée

par une répétition de pipetages vigoureux (Amsterdam et Jamieson, 1972, 1974a, 1974b).

Les cellules obtenues à l'aide d'une telle méthode présentent des caractéristiques structurales et fonctionnelles anormales : une perte des microvillosités et des autres structures apicales, des dommages importants générés au niveau des récepteurs membranaires à cause notamment de l'action de la chymotrypsine, altérant ainsi les réponses fonctionnelles aux sécrétagogues (Bosco et al., 1994). En outre, les cellules obtenues par ces procédés ne sont viables que 1 à 2 jours, ce qui ne permet que des analyses *in vitro* de courte durée.

Pour pallier ces problèmes techniques et permettre une meilleure étude de la physiologie des cellules acineuses *in vitro*, un autre système cellulaire a été élaboré par la suite : l'isolement d'acini intacts à partir de pancréas de cobaye (Schultz et al., 1980), de souris ou de rat (Williams et al., 1978 ; Logsdon et Williams, 1983).

Les améliorations apportées dans ce système reposent sur le maintien de l'adhérence et des communications entre les cellules acineuses, et consistent en un traitement ménagé des membranes cellulaires. Ainsi, ces protocoles de culture d'acini dispersés se caractérisent par :

- une exclusion (Schultz et al., 1980) ou une réduction (Williams et al., 1978 ; Logsdon et Williams, 1983) de l'utilisation d'enzymes protéolytiques à spectre large (chymotrypsine) qui endommagent les récepteurs de surface cellulaire et les protéines d'adhérence intercellulaire ;

- une élimination des agents chélatant les cations divalents, comme l'EDTA, utilisés pour inactiver les interactions cellulaires (jonctions d'adhérence et desmosomes) et ainsi isoler les cellules acineuses. Certains auteurs (Schultz et al., 1980) ajoutent même du Ca^{2+} (2 mM) dans leur solution de dissociation afin de favoriser le maintien des jonctions intercellulaires dépendantes de ces cations divalents, notamment les systèmes jonctionnels contenant les protéines de la famille des cadhérines ;

- une dissociation mécanique « douce ». Ainsi des pipetages lents et doux sont préférés à la trituration tissulaire par un pipetage vigoureux afin de préserver les interactions intercellulaires.

L'avantage principal de la préparation d'acini dispersés est qu'elle maintient davantage l'architecture intracellulaire et intercellulaire, préserve les membranes cellulaires, limite les dommages aux récepteurs de surface et améliore la sécrétion en réponse aux sécrétagogues (Williams et al., 1978 ; Schultz et al., 1980 ; Logsdon et Williams, 1983). L'atout majeur de ce mode de culture est que la viabilité des cellules est allongée en culture (7-10 jours).

Comme le maintien des contacts intercellulaires, notamment le couplage cellulaire par les jonctions communicantes, est un déterminant indispensable à la fonction exocrine des cellules acineuses pancréatiques (Logsdon et Williams, 1986), la méthode d'isolement des acini dispersés est couramment préférée à celle isolant les

cellules acineuses (Han et Logsdon, 1999 ; Ji et al., 2000 ; Ji et al., 2009 ; Gaiser et al., 2011).

La culture d'acini dispersés est le mode de culture des cellules issues du pancréas exocrine que nous pratiquons au laboratoire. Nous allons décrire de façon détaillée, dans la partie suivante, le protocole utilisé, en indiquant les améliorations que nous avons apportées, par rapport aux publications originales.

Isolement et culture d'acini dispersés

Considérations générales et précautions

Bien que fréquemment rencontrée dans les protocoles d'isolement de cellules acineuses, l'utilisation de la trypsine (comme agent de dissociation enzymatique) est à proscrire. En effet, cette enzyme protéolytique de la famille des protéases à sérine catalyse la conversion des pro-enzymes pancréatiques en enzymes matures qui pourraient être responsables de la digestion du tissu pancréatique. Ainsi, les milieux de culture des cellules acineuses ainsi que le milieu de dissociation et la solution de rinçage isotonique contiennent des inhibiteurs de la trypsine. L'inhibiteur de la trypsine issu de la gaine de soja (*Soybean Trypsin Inhibitor*, STI) inhibe la trypsine et, à moindre mesure, d'autres protéases à sérine, comme la chymotrypsine (De Vonis Bidlingmeyer et al., 1972). Cet inhibiteur (100-250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) est très fréquemment rencontré dans les protocoles d'isolement de cellules pancréatiques exocrines. D'autres protocoles utilisent l'aprotinine (Trasylol[®], Bayer), à la concentration de 0,5 % (v/v), pour remplacer le STI (Rapoport et al., 2009). L'aprotinine est un polypeptide de 58 acides aminés dérivé de l'inhibiteur de la trypsine pancréatique bovine basique (*Bovine Basic Pancreatic Trypsin Inhibitor*) qui possède la propriété de bloquer de façon réversible les sites catalytiques de plusieurs protéases à sérine, comme la trypsine, la chymotrypsine, la plasmine et la kallistéine (Ascenzi et al., 2003).

Le principe du protocole, illustré sur la **figure 31-3**, consiste en une dissociation enzymatique du tissu conjonctif situé entre les lobules pancréatiques et à la base des acini, couplée à une dissociation mécanique ménagée (pipetages doux), permettant la mise en culture des acini sans dissociation des cellules acineuses. La solution de dissociation utilisée contient de la collagénase bactérienne. Les systèmes canaux, vasculaires, lymphatiques, nerveux et endocriniens sont séparés physiquement de la préparation d'acini dispersés à l'aide d'un filtre possédant des pores de 100 μm de diamètre. Alors que la plupart des protocoles préconisent la culture des acini soit en suspension, soit sur des supports en plastique spécialement traités pour la culture, les acini sont tout d'abord cultivés en suspension pour une courte durée (24 heures), puis ensemencés

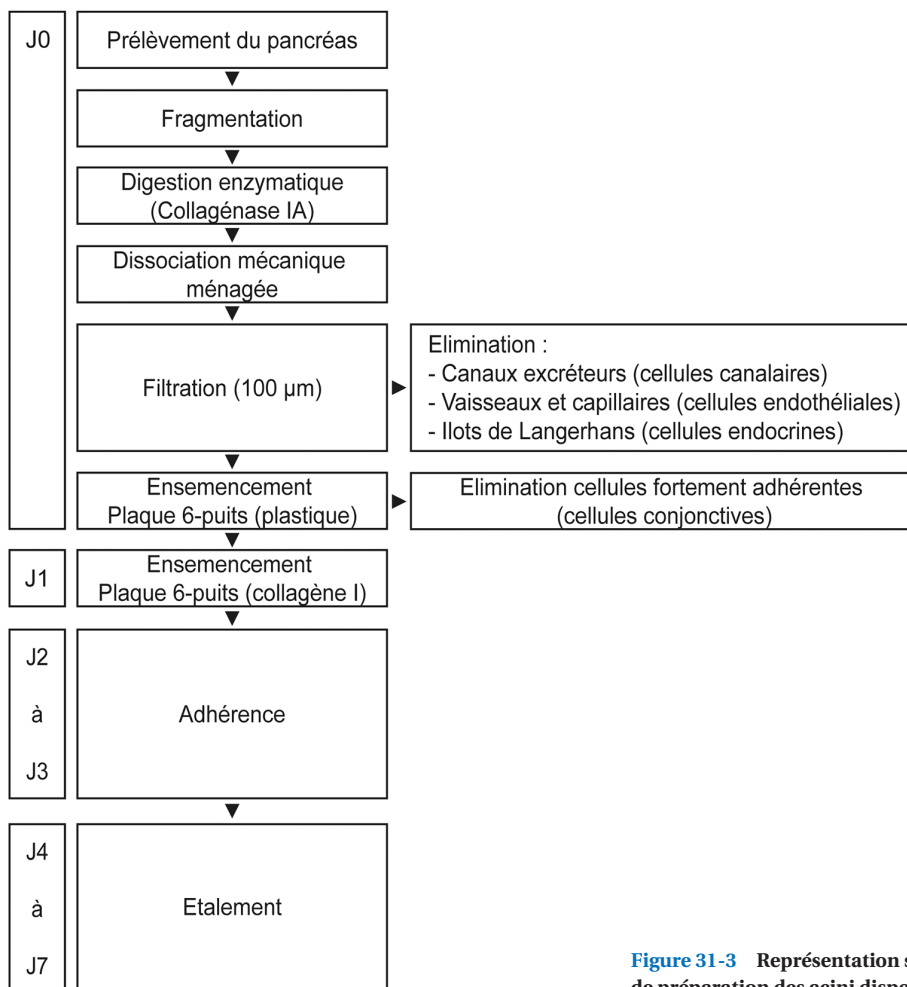


Figure 31-3 Représentation simplifiée des différentes étapes de préparation des acini dispersés de pancréas de souris.

sur des supports de culture recouverts de protéines matricielles jusqu'à l'analyse phénotypique ou fonctionnelle des cellules exocrines. La première étape transitoire permet d'éliminer les débris cellulaires et les cellules « contaminantes », alors que la culture sur des protéines matricielles favorise l'adhérence des acini.

Il convient de préciser que, outre les cellules acineuses, des cellules centro-acineuses, lesquelles sont très minoritaires, sont également incorporées dans la préparation des acini pancréatiques en utilisant cette méthode.

Protocole

Animaux et considérations éthiques

Au laboratoire, le pancréas est prélevé à partir de souris C57BL/6, sauvages (Charles River Laboratories) ou génétiquement modifiées (Vincent et al., 2009 ; Vincent et al., 2012), maintenues dans un environnement dépourvu

de pathogène spécifique au sein de l'animalerie AniCan du centre de recherche en cancérologie de Lyon (CRCL). Les souris ont été manipulées et euthanasiées en accord avec les réglementations d'expérimentation animale française et européenne et après approbation des protocoles auprès du comité éthique local d'expérimentation animale, le comité d'évaluation commun au centre Léon Bérard, à l'animalerie de transit de l'ENS, au PBES et au laboratoire P4 (CECCAP) de Lyon.

Dissection et prélèvement du pancréas

Alors que le pancréas se présente comme une glande massive et compacte (glande conglomérée) chez les carnivores, le porc, la chèvre et les primates, la glande est diffuse chez les lagomorphes (lièvres, lapins et pikas) et les rongeurs (souris, rats, écureuils, loirs...). En effet, à l'exception du lobe gauche encore distinct, la glande est majoritairement constituée de nodules glandulaires éparpillés à la surface du

mésentère chez ces animaux. À cause de cette particularité anatomique chez les rongeurs, le pancréas n'est pas facilement repérable dans l'abdomen des souris. Le pancréas est formé d'un ensemble de lobules blanchâtres diffus groupés en deux ensembles : l'un entourant le duodénum et le canal

cholédoque, l'autre la rate à laquelle le rattachent des liens conjonctivo-vasculaires (**figure 31-4A**).

Le pancréas peut être distingué sous la forme d'une petite « languette », entre l'estomac et le début de l'intestin. Il est prélevé dans des conditions aseptiques, sous le poste

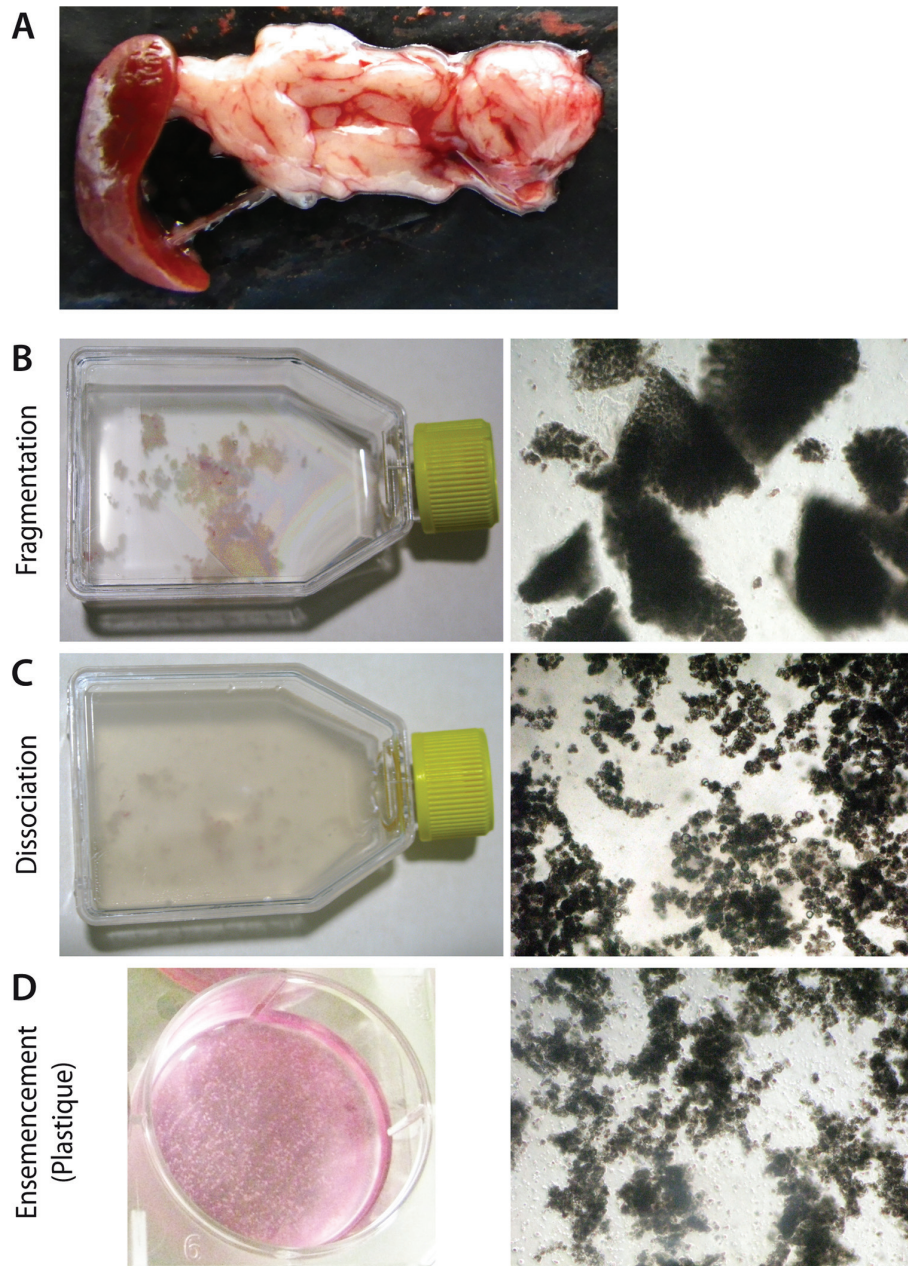


Figure 31-4 Illustration des différentes étapes de préparation des acini dispersés de pancréas de souris. (A) Prélèvement du pancréas (droite) attaché à la rate (gauche) par des liens conjonctivo-vasculaires. (B-D) Observations macroscopique (gauche) et en microscopie à contraste de phase (droite, grossissement $\times 40$) des premières étapes de l'isolement des acini pancréatiques dispersés, à savoir les étapes suivant (B) la fragmentation, (C) les dissociations enzymatiques et mécaniques et (D) lors de l'ensemencement sur des supports de culture en plastique

de sécurité microbiologique, à l'aide d'instruments de dissection stériles. Pour récupérer le pancréas en entier, toutes les boucles intestinales le recouvrant doivent être libérées. Pour cela, il suffit de découper le gros intestin à la base (au niveau du rectum), de tirer sur l'intestin et de le dérouler jusqu'à la base de l'estomac en coupant les attaches conjonctives (ou mésentériques). Ainsi, les connexions du duodénum avec le pancréas sont rompues, mais les liens avec la rate sont préservés. En utilisant cette méthode, le pancréas entier est libéré très rapidement (1 minute), en une unité rattachée à la rate (*voir* figure 31-4A). Lors des étapes de prélèvement et de manipulation du pancréas, il est préférable de le maintenir par les tissus mésentériques ou adipeux associés afin de ne pas créer de dommages mécaniques.

Comme le mésentère, accompagné du tissu adipeux de réserve, possède un aspect morphologique et macroscopique proche du tissu pancréatique diffus, il est important de prendre garde de ne pas confondre le tissu adipeux mésentérique avec le tissu pancréatique. Le tissu adipeux apparaît cependant plus blanc et plus « friable » que le tissu pancréatique.

L'isolement des acini dispersés s'effectue dans des conditions aseptiques, sous le poste de sécurité microbiologique.

Fragmentation du pancréas et dissociation (enzymatique et mécanique) des acini

Une fois le pancréas prélevé, il est déposé dans une boîte de Pétri (100 mm de diamètre) et est débarrassé du tissu adipeux contaminant et des brides mésentériques. Pour ce faire, le pancréas est étalé sur la boîte à l'aide d'une pince et le tissu adhérent au support plastique, essentiellement le tissu adipeux, est éliminé à l'aide d'un scalpel. Une fois le pancréas nettoyé de la matière adipeuse, il est rincé deux fois avec une solution saline équilibrée de Hank 1× (HBSS, *Hank's Balanced Salt Solution*). Le tissu pancréatique est découpé à l'aide d'un scalpel et d'une pince stérile en petits fragments de 1 à 3 mm³ d'épaisseur (**figure 31-4B**). Les fragments pancréatiques sont ensuite transvasés en tube en polypropylène de 50 ml. Les débris et les déchets cellulaires (principalement les cellules sanguines) sont éliminés par une centrifugation de 2 minutes à 450 g, à +4 °C. Après élimination du surnageant, le culot, contenant les cellules pancréatiques est repris dans une solution de dissociation contenant de la collagénase bactérienne (**tableau 31-I**).

La collagénase IA utilisée dans notre protocole provient d'une fraction faiblement purifiée du milieu de fermentation de la bactérie anaérobie *Clostridium histolyticum*. Cette enzyme offre un rendement satisfaisant de dégradation des collagènes. Toutefois, elle peut contenir d'autres enzymes protéolytiques (clostripaïne et caséinase). Par conséquent, certains auteurs, travaillant avec des tissus pancréatiques humains (Fanjul et al., 2010), préfèrent utiliser des collagénases purifiées à homogénéité

Tableau 31-I Solution de dissociation des acini pancréatiques

Produit	Concentration finale
Collagénase IA (Sigma-Aldrich)	200 U/ml
STI (Sigma-Aldrich)	250 µg/ml
HEPES (BioWhittaker)	10 mM
HBSS contenant Ca ²⁺ et Mg ²⁺ (Gibco®, Life Technologies)	1×

HBSS, *Hank's Balanced Salt Solution* ; STI, Inhibiteur de trypsine de la graine de soja.

telle la Liberase® (Roche Diagnostics). Ce dernier type de préparation enzymatique offre une meilleure reproductibilité de purification face aux différents lots utilisés, mais possède cependant un coût plus élevé.

Classiquement, au laboratoire, nous utilisons 10 ml de solution de dissociation par pancréas de souris. L'homogénéat tissulaire est alors incubé dans une enceinte thermostatée à +37 °C avec une agitation manuelle occasionnelle. En parallèle de la dissociation enzymatique, le tissu pancréatique va subir une dissociation mécanique, à intervalles de 5 minutes, afin de compléter la libération des acini. La dissociation mécanique est réalisée à l'aide de pipettes stériles en polystyrène avec des orifices de taille décroissante (3,3 mm, 2,4 mm et 1,2 mm de diamètre). Les mouvements d'aspiration et de refoulement sont effectués de manière très douce. Au cours de cette étape de dissociation enzymatique et mécanique, il est indispensable de surveiller fréquemment l'étendue de la digestion. Lorsque le tissu pancréatique apparaît dissocié, classiquement entre 20 et 30 minutes d'incubation, la réaction enzymatique est ralentie par l'addition de 10 ml d'une solution de lavage tamponnée préalablement refroidie (**tableau 31-II**).

Comme illustré sur la **figure 31-4C**, l'effet combiné de la digestion enzymatique et de la dissociation mécanique est observable à l'œil nu avec la disparition progressive des fragments pancréatiques et la turbidité croissante du milieu de dissociation. La dissociation des acini devient

Tableau 31-II Solution de lavage des acini dispersés

Produit	Concentration finale
HBSS contenant Ca ²⁺ et Mg ²⁺ (Gibco®, Life Technologies)	1×
Sérum de veau fœtal (Gibco®, Life Technologies)	5 %
HEPES (BioWhittaker)	10 mM

HBSS, *Hank's Balanced Salt Solution*.

alors évidente à l'examen au microscope à contraste de phase (voir figures 31-4C versus figure 31-4B).

Filtration et ensemencement des acini dispersés

La solution de collagénase est éliminée par une centrifugation à 450 g pendant 2 minutes, à +4 °C. La préparation d'acini est lavée trois fois consécutives avec l'addition de 10 ml de solution de lavage et est suivie d'une centrifugation de 3 minutes à 450 g à +4 °C. À l'issue du troisième lavage, le culot d'acini est repris dans 10 ml de solution de lavage et est filtré sur une membrane de nylon possédant des pores de 100 µm (Tamis cellulaire, BD Biosciences). Le filtre permet de retenir les fragments tissulaires pancréatiques dont le diamètre est supérieur à ceux des pores et qui ont été laissés intacts par le traitement par la solution de collagénase, tels que les canaux pancréatiques, les vaisseaux et capillaires sanguins, et les îlots de Langerhans. Les acini dispersés qui ont un diamètre inférieur à 100 µm (acinus jusqu'à 10-15 cellules) passent à travers le filtre et constituent le matériel biologique utilisé dans nos études. Le filtre est rincé par l'addition supplémentaire de 5 ml de tampon de lavage et les acini sont centrifugés pendant 3 minutes à 200 g, à +4 °C. Les acini sont repris dans 10 ml d'un milieu de culture complet (tableau 31-III) et ensemencés dans des supports compatibles avec la culture cellulaire. Au laboratoire, les acini sont répartis dans les différents puits d'une plaque de culture en polystyrène comportant six puits (BD Biosciences Falcon™) et incubés pendant 24 heures dans une enceinte thermostatée à +37 °C, en atmosphère humide et comportant 5 % de CO₂.

Immédiatement après leur ensemencement dans les supports de culture en polystyrène, les acini sont de petites tailles, généralement isolés ou formant des petites grappes.

Tableau 31-III Milieu de culture des acini pancréatiques dispersés

Produit	Concentration finale
Waymouth's MB752/1 supplémenté en L-Glutamine (Gibco®, Life Technologies)	1×
Sérum de veau fœtal (Gibco®, Life Technologies)	10 %
Pénicilline (Invitrogen)	100 U/ml
Streptomycine (Invitrogen)	100 µg/ml
STI (Sigma-Aldrich)	250 µg/ml
hEGF recombinant (Promokine)	25 ng/ml

hEGF, facteur de croissance épidermique humain ; STI, Inhibiteur de trypsine de la graine de soja.

Il est alors possible de distinguer les cellules acineuses, caractérisées par un cytoplasme très sombre en microscopie à contraste de phase (figure 31-5A). Cet aspect provient en partie de la richesse en grains de zymogènes que contiennent ces cellules.

Le lendemain de l'ensemencement des acini sur le support de culture en polystyrène, les acini forment des agrégats (visibles à l'œil nu, sous forme de petits points blancs, dans les puits de la plaque de culture) (figure 31-4D). Lorsque les cellules sont observées au microscope à contraste de phase, nous remarquons que les cellules conjonctives adhèrent sur le plastique de culture alors que les acini restent en suspension. Le support de culture est également tapissé de nombreux débris cellulaires. Il est important de signaler que les acini forment alors des agrégats compacts et que les cellules acineuses contiennent encore de nombreuses vésicules de sécrétion (figure 31-5B).

À ce stade du protocole, si l'expérimentateur désire prolonger la culture des acini sur des supports en plastique, il convient de transvaser délicatement les acini en suspension, à l'aide d'une pipette stérile, dans une nouvelle plaque de culture contenant six puits. Cette étape permet notamment d'éliminer les cellules contaminantes qui ont adhéré sur le support ainsi qu'une fraction des débris cellulaires.

Maintien de la culture des acini dispersés sur un support matriciel

Si la culture des acini doit être maintenue sur de « longues » périodes ou si les conditions expérimentales exigent des cellules cultivées en monocouche, il est recommandé d'ensemencer les cellules sur des supports matriciels, qui permettent une adhérence des cellules au support de culture. Différentes sources de matrice extracellulaire peuvent être utilisées pour réaliser la culture de cellules. Concernant les cellules pancréatiques, le collagène de type I (Logsdon et Williams, 1986) et les molécules matricielles mimant une lame basale (Sphyrin et al., 2005 ; Bendayan et al., 1986) peuvent être utilisées.

Lorsque des solutions de collagène de type I sont utilisées, il faut savoir qu'il s'agit de molécules de collagène monomérique qui sont immobilisées sur le support de culture, et non de fibrilles de collagène. Les solutions de collagène couramment utilisées pour la culture de cellules sont issues soit de derme de bovins, soit de tendons de queues de rat, par un procédé de solubilisation du collagène (acido-soluble) dans de l'acide acétique. Les fractions de collagène acido-insoluble subissent alors un traitement par de la pepsine, ce qui permet ainsi d'augmenter leur solubilité dans de l'acide acétique. Dans ce cas, le collagène est alors dépourvu de ses extrémités télépeptidiques.

D'autres études préconisent également l'utilisation des matrices qui miment la lame basale. Ce type de matrice est commercialisé sous le nom de Matrigel™ (BD Biosciences). Cette matrice est extraite à partir de milieu conditionné de la lignée cellulaire de sarcome murin EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) et contient du collagène

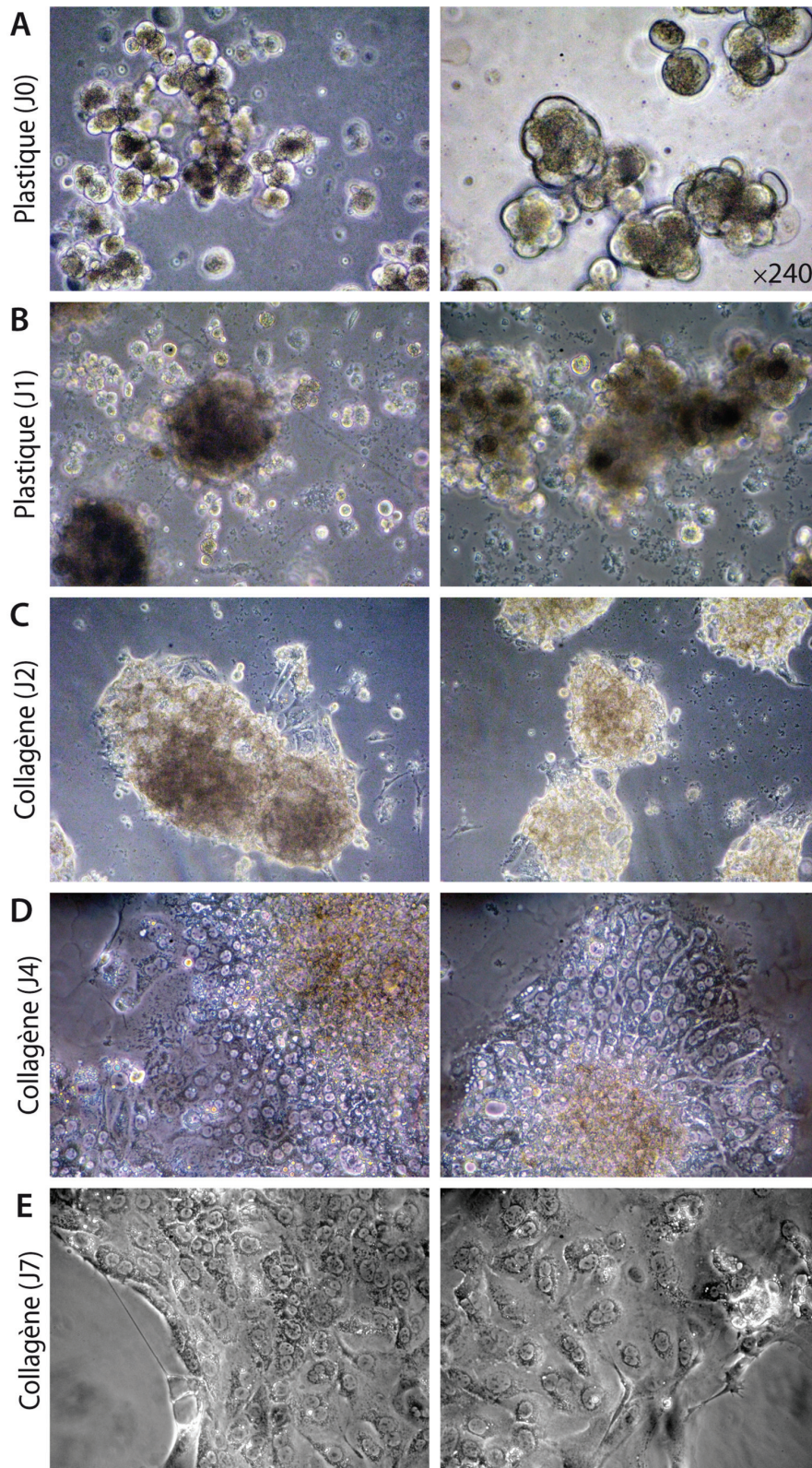


Figure 31-5 Observation en microscopie à contraste de phase de la culture d'acini dispersés de pancréas de souris. Observation des acini dispersés (A) immédiatement ou (B) 24 heures après leur ensemencement sur les supports de culture en plastique, ou cultivés pendant (C) 24 heures, (D) 72 heures ou (E) 144 heures sur un support de collagène de type I. (A-D) Le contraste des images a été ajusté pour mettre en évidence les grains de zymogènes (marron) dans les cellules acineuses. (E) Les images ont été converties en niveaux de gris pour accentuer le contraste des cellules. (A-E) Sauf indication sur la photographie, le grossissement des observations est $\times 120$.

de type IV, de la laminine, du nidogène/entactine, et des protéoglycanes à sulfate d'héparane (Kleinman et al., 1982 ; Kleinman et al., 1986). Cependant, les solutions de Matrigel™ contiennent des quantités non négligeables de *Transforming Growth Factor* β (TGF β), d'*Epidermal Growth Factor* (EGF), d'*Insulin-like Growth Factor* (IGF), de *Fibroblast Growth Factor* (FGF) et d'autres facteurs de croissance ou de cytokines sécrétés naturellement par les cellules tumorales EHS (Vukicevic et al., 1992). Ces facteurs de croissance régulent de nombreuses fonctions cellulaires, telles que la survie, la prolifération, la différenciation, la migration, ou encore l'apoptose (mort programmée) des cellules. La présence de ces facteurs de croissance peut interférer avec les conditions expérimentales de certaines études. Pour des applications nécessitant des préparations de lame basale de composition mieux définie, il est préférable d'utiliser des solutions de Matrigel™ réduites en facteurs de croissance (Matrigel™ Matrix Growth Factor Reduced). Le collagène de type IV et la laminine, utilisés séparément ou en combinaison, comme dans le Matrigel™, semblent promouvoir l'expression du phénotype différencié pour de nombreuses cellules épithéliales (Seely et Aggeler, 1991 ; Kibbey et al., 1992 ; Ghajar et Bisselle, 2008 ; Benton et al., 2011), mais limitent leur capacité proliférative.

Au laboratoire, les acini sont cultivés sur des supports de culture en plastique (plaque six puits) recouverts de protéines matricielles. Deux types de substrats matriciels ont été comparés pour l'adhérence des acini : le collagène de type I acido-soluble de tendons de queues de rat (BD Biosciences) et le Matrigel™ réduit en facteur de croissance (BD Biosciences). Les supports de culture contenant les substrats matriciels sont préparés la veille, sous le poste de sécurité microbiologique :

- la solution de collagène de type I acido-soluble. Elle est diluée dans de l'acide acétique 0,02 M stérile afin d'obtenir une concentration finale de 50 $\mu\text{g/ml}$, puis déposée sur les supports de culture (1 ml par puits) à raison de 5 $\mu\text{g/cm}^2$ environ. L'adsorption de la protéine matricielle sur le plastique de culture s'effectue passivement en incubant les solutions de collagène pendant une heure à +37 °C ou une nuit à +4 °C ;

- la solution de Matrigel™. Elle est, quant à elle, diluée (concentration finale de 400 $\mu\text{g/ml}$) dans du PBS froid et est déposée sur les supports de culture (1 ml par puits) pour obtenir un dépôt d'environ 40 $\mu\text{g/cm}^2$ de macromolécules matricielles. L'adsorption des macromolécules matricielles sur le plastique de culture s'effectue passivement en incubant la solution de Matrigel™ une nuit à +4 °C. Cette température d'incubation doit être respectée car le Matrigel™ polymérise pour former un gel à température ambiante.

Dans les deux cas, une fois l'adsorption effectuée, l'excédent des solutions matricielles est éliminé, les supports de culture sont alors rincés deux fois avec du PBS et séchés sous le poste de sécurité microbiologique pendant 12 heures ou jusqu'à l'ensemencement des acini. Il est

possible de conserver les supports de culture recouverts de protéines matricielles pendant 3 à 4 semaines à +4 °C avant leur utilisation.

Vingt-quatre heures après l'isolement, les acini en suspension (préparés selon le protocole précédemment décrit) sont prélevés délicatement à l'aide d'une pipette stérile en polystyrène de 10 ml (afin de ne pas dissocier les acini agrégés) et déposés sur le support de culture recouvert de protéines matricielles. Les acini sont alors cultivés dans une enceinte thermostatée à +37 °C, en atmosphère humide et comportant 5 % de CO₂.

Observation des acini sur les supports matriciels

Après un jour de culture sur un support recouvert de collagène de type I, les acini adhèrent au substrat matriciel et se comportent comme des explants en culture : les acini adoptent une morphologie semi-sphérique d'où sortent et migrent quelques cellules acineuses (**figure 31-5C**). La migration des cellules acineuses s'accroît avec le temps en culture, permettant leur colonisation progressive du support de culture. Trois jours après l'ensemencement sur le collagène de type I (J4 post-isolement), les cellules conservent encore de nombreux grains de zymogènes, qui apparaissent hautement réfringents en microscopie à contraste de phase (**figure 31-5D**). Plus tardivement, une semaine après l'isolement, les acini ont achevé leur processus d'adhérence ou d'attachement, bien que subsistent de rares « dômes » acineux. Les cellules couvrent alors presque la totalité du support de culture et forment une monocouche cellulaire (**figure 31-5E**). À ce stade de la culture, il apparaît évident en microscopie à contraste de phase que les cytoplasmes des cellules contiennent moins de grains de zymogènes, indiquant une perte du phénotype acineux. Toutefois, les cellules sont viables. À l'issue d'une semaine en culture, les cellules peuvent subir un repiquage, en utilisant les conditions classiques de subculture, et peuvent être maintenues encore quelques jours (1-2 jours) avant l'apparition de signes de sénescence ou de mort cellulaire.

Lorsque les acini dispersés sont ensemencés sur un support de Matrigel™, la phase d'adhérence est ralentie et les cellules maintiennent de façon plus prolongée (de 24-48 heures) un phénotype acineux (données non montrées).

Analyse du phénotype des cellules pancréatiques primaires

Les cellules acineuses subissent spontanément une trans-différenciation en cellules de type canalaire *in vitro* (Lardon et Bouwens, 2005). Ce phénomène peut être notamment observé par la perte des grains de zymogènes en microscopie à contraste de phase (*voir* figure 31-5). L'analyse des marqueurs moléculaires de ces deux types

cellulaires au cours des différentes étapes de la culture permet de contrôler le stade de différenciation des cellules.

Différentes techniques peuvent être utilisées pour analyser le phénotype des cellules pancréatiques exocrines en culture. Celles employées le plus fréquemment au laboratoire sont les techniques d'analyses de l'expression de gènes marqueurs (par RT-PCR conventionnelle ou quantitative) et les techniques d'immunodétection (immunofluorescence et Western-blotting) de protéines caractéristiques.

Les marqueurs des cellules acineuses couramment utilisés au laboratoire correspondent essentiellement aux produits de sécrétion de ces cellules : le trypsinogène, le chymotrypsinogène, les inhibiteurs pancréatiques des protéases à sérine, les amylases, les lipases, les pro-carboxypeptidases... La présence des amylases et des lipases sécrétées dans le milieu de culture des acini pancréatiques peut également être détectée et quantifiée par un dosage enzymatique. Un phénotype de type canalaire peut également être recherché dans les cellules en culture par la présence ou l'expression de la cytokératine de type 19, de l'anhydrase carbonique de type II et du transporteur d'ions chlorure (CFTR, *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*). L'anhydrase carbonique et le transporteur CFTR sont respectivement responsables de la synthèse et de la sécrétion des ions bicarbonates par les cellules canalaires (Leung, 2010b).

L'extraction des protéines, pour des analyses biochimiques ou de détection par Western-blotting, et des acides ribonucléiques (ARN), pour l'étude de l'expression des gènes marqueurs, est particulièrement délicate à partir de cellules pancréatiques exocrines. En effet, les grandes quantités et la variété des protéases synthétisées et sécrétées par ces cellules compromettent fortement l'intégrité structurale et fonctionnelle des protéines extraites. D'autre part, outre la sécrétion des enzymes protéolytiques, les cellules acineuses pancréatiques sécrètent également des nucléases, et notamment des ribonucléases, telle la RNase A1 (Doyle et al., 2012), qui limitent beaucoup la préparation d'ARN à partir de tissu pancréatique ou de cellules pancréatiques acineuses en culture. Le paragraphe suivant indique les précautions que nous respectons au laboratoire pour la préparation optimale d'extraits protéiques ou pour l'isolement d'ARN à partir d'acini en culture.

Extraction des protéines

L'extraction des protéines est réalisée par la lyse des cellules pancréatiques exocrines à l'aide d'un tampon salin contenant des détergents, comme le tampon RIPA (NaCl 150 mM, NP-40 1 %, déoxycholate de sodium 1 %, dodécylsulfate de sodium 0,1 %, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5). La première précaution est d'introduire, dans la solution de lyse cellulaire, des inhibiteurs de protéases à spectre large (leupeptine 1 µg/ml, aprotinine 1 µg/ml ou fluorure de phénylméthylsulfonate 0,2 mM), ainsi que des agents chélatant les cations divalents pour inhiber les protéases

dépendantes de ces ions, tel l'EDTA (1 mM) ou l'acide éthylène glycol tétraacétique (EGTA, 1 mM). Lorsque des études de signalisation cellulaire sont envisagées, pour mettre en évidence le statut phosphorylé de protéines membranaires ou intracellulaires spécifiques, il convient alors d'ajouter des inhibiteurs de phosphatases dans la solution de lyse tels le pyrophosphate de sodium (2,5 mM), le β-glycérophosphate (1 mM) et l'orthovanadate de sodium (1 mM). La seconde précaution est d'éliminer complètement le milieu de culture des cellules contenant les enzymes protéolytiques sécrétées et d'effectuer deux lavages successifs avec une solution saline équilibrée avant de procéder à la lyse cellulaire. La qualité des protéines obtenues avec ce « cocktail » d'inhibiteurs de protéases (et de phosphatases) est suffisante pour leur détection par Western-blotting.

Extraction des acides ribonucléiques messagers

Les cellules pancréatiques acineuses possèdent de nombreux granules de sécrétion contenant de la RNase A1 biologiquement active. Lorsque les cellules sont lysées, la RNase A1 est libérée et dégrade rapidement les ARN cellulaires. Les RNases sont des enzymes très actives. Une façon de neutraliser leur activité est de les dénaturer. La dénaturation doit être la plus rapide possible pour limiter l'action de la RNase A1. Deux paramètres sont déterminants pour une préparation optimale des ARN à partir des cellules pancréatiques exocrines : une concentration élevée en agent chaotrope, comme le thiocyanate de guanidine, et une homogénéisation efficace du lysat cellulaire (Chirgwin et al., 1979). L'homogénéisation est également importante pour réduire la viscosité du lysat et permettre la purification des ARN. La plupart des solutions commerciales recommandées pour la préparation des ARN contiennent une trop faible concentration en agent chaotrope pour permettre une dénaturation protéique efficace à partir de cellules ou tissus riches en RNases. Notre laboratoire a développé une solution de lyse basée sur le protocole original de Chirgwin (Chirgwin et al., 1979) qui contient une forte concentration en thiocyanate de guanidine (5 M) et du 2-mercaptoéthanol (1 %) (tableau 31-IV).

Tableau 31-IV Solution de lyse pour l'extraction des ARN

Produit	Concentration finale
Thiocyanate de guanidine	5 M
Citrate de sodium (pH 7,0)	2,5 mM
N-Laurylsarcosine	0,5 %
2-Mercaptoéthanol (*)	1 %

* Ajouté de façon extemporanée.

Après élimination du milieu de culture et lavage de la préparation d'acini avec une solution saline équilibrée, les cellules sont lysées directement dans le support de culture à l'aide d'une solution de lyse. Classiquement, 350 µl de la solution de lyse sont ajoutés dans le puits d'une plaque contenant six puits. La solution de lyse est répartie sur le support de culture à l'aide d'un grattoir (*cell scraper*) et les cellules sont homogénéisées par des cycles d'aspiration et refoulement à l'aide d'une pipette munie d'un cône (de capacité de 1 ml) afin d'éliminer les agrégats. L'homogénéisation peut être améliorée en aspirant et refoulant plusieurs fois le lysat au travers d'une seringue munie d'une aiguille de 21 Gauge (0,8 mm de diamètre). Après clarification du lysat pendant 3 minutes à 15 700 g, les ARN peuvent être purifiés par chromatographie d'affinité à l'aide de résines commerciales. Les ARN purifiés à l'aide de ce protocole sont de qualité suffisante pour subir une transcription inverse et effectuer des analyses phénotypiques (RT-PCR conventionnelle ou quantitative), voire transcriptomiques.

Analyse du phénotype des cellules

Un exemple de caractérisation d'une culture d'acini effectuée par RT-PCR quantitative est illustré sur la **figure 31-6**. Vingt-quatre heures après l'ensemencement sur le collagène de type I (J2 post-isolement), les cellules

expriment les gènes marqueurs des cellules acineuses, comme les gènes codant le trypsinogène et l'inhibiteur murin de protéases à sérine (SPINK3), alors que l'expression du transporteur d'ions chlorure (CFTR), un marqueur caractéristique des cellules canalaire, est relativement faible. Nous notons une transdifférenciation partielle au cours de la culture, puisque nous observons une diminution de l'expression des marqueurs des cellules acineuses et une augmentation de l'expression du gène *Cftr* (marqueur canalaire) après 4 jours de culture des cellules sur le collagène de type I (5 jours post-isolement). À l'issue de la culture primaire (7 jours post-isolement), les cellules possèdent majoritairement un phénotype de type canalaire (*voir* figure 31-6).

En résumé, le protocole que nous avons décrit dans la précédente partie permet un isolement rapide (< 2 heures) des acini pancréatiques. En outre, les cellules obtenues sont viables plus d'une semaine en culture. Comme la plupart des analyses cellulaires effectuées dans notre laboratoire nécessitent un maintien relativement court des acini en culture (2-3 jours post-isolement), les cellules acineuses possèdent encore des caractéristiques proches de celles rencontrées *in vivo*. Ainsi, ce protocole d'isolement d'acini dispersés convient parfaitement pour la réalisation de nos études expérimentales *in vitro*. D'autres laboratoires ont apporté des modifications par rapport aux protocoles

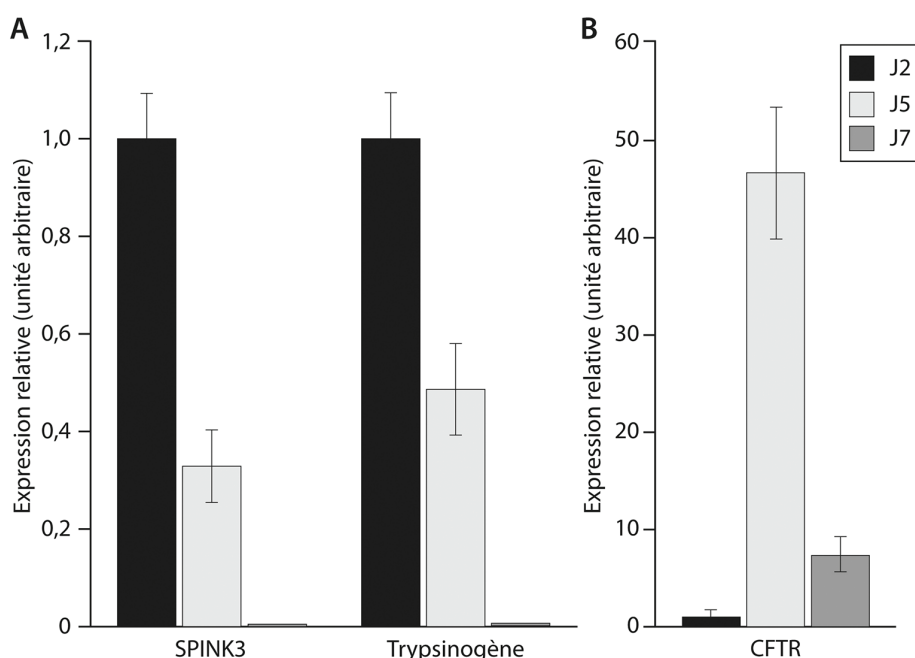


Figure 31-6 Analyse du phénotype des cellules pancréatiques exocrines primaires ensemencées sur une matrice de collagène de type I. Cinétique de l'expression des gènes codant le trypsinogène, l'inhibiteur de protéases à sérine (SPINK3), et le transporteur d'ions chlorure (CFTR) dans les cellules pancréatiques exocrines après la culture des acini sur le support de collagène pendant 24 heures (J2 post-isolement), 96 heures (J5) ou 144 heures (J7). L'expression de ces gènes a été analysée par RT-PCR quantitative en temps réel en utilisant le gène codant la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) comme gène de référence.

initiaux, et ce, afin de prolonger la culture d'acini dispersés et de maintenir des cellules acineuses sécrétrices sur de longues périodes de cultures (entre une et deux semaines *in vitro*). La suite de cette revue présente de façon détaillée deux de ces protocoles afin que le lecteur puisse trouver des renseignements complémentaires sur l'isolement et la culture de cellules acineuses pancréatiques.

Protocoles complémentaires d'isolement et de culture des cellules acineuses pancréatiques

Le caractère « labile » du phénotype différencié des cellules acineuses pancréatiques peut être un frein pour la réalisation de certaines analyses cellulaires de longue durée. Dans cette dernière partie de ce chapitre, nous décrivons deux protocoles permettant de prolonger la culture des acini et de maintenir plus longtemps la capacité sécrétrice des cellules acineuses obtenues. L'ensemble des améliorations apportées par les deux protocoles provient d'une réflexion et/ou d'une observation sur l'environnement tissulaire et la physiologie des cellules acineuses pancréatiques. Il en ressort que deux paramètres semblent indispensables pour favoriser le maintien du phénotype des cellules acineuses et en augmenter leur durée de vie en culture : l'apport en acides aminés et un pH adéquat du milieu de culture.

Concentration en acides aminés

Les cellules pancréatiques possèdent la fonction principale de synthétiser et de sécréter une grande quantité de protéines. Le pancréas possède d'ailleurs la particularité d'être un des organes ayant le plus fort taux de synthèse protéique. Les cellules acineuses sont caractérisées par un réticulum endoplasmique rugueux très développé et de nombreuses vésicules de sécrétion. Cette synthèse protéique importante requiert un apport accru en acides aminés. Il a été montré, dans les cellules pancréatiques exocrines, que le taux d'acides aminés régule le processus de synthèse protéique ; une insuffisance en acides aminés inhibe la synthèse protéique alors qu'elle est stimulée par un apport extracellulaire en acides aminés (Case, 1978). Dans les protocoles détaillés ci-après, Sphyris et al. (2005), et Bläuer et al. (2011) ont élaboré un milieu de culture complet contenant une quantité plus élevée en acides aminés (essentiels et non essentiels) pour faciliter la synthèse protéique et favoriser le maintien de l'état différencié et sécréteur des acini dispersés.

Importance du pH

Le pôle apical des cellules acineuses est en contact intime avec le liquide canalaire à l'origine du suc

pancréatique. Ce liquide élaboré par les cellules canalaire est riche en ions bicarbonate et est légèrement alcalin. Il est tentant de penser que le pH de l'environnement cellulaire soit important pour le respect de la physiologie des cellules acineuses. Ainsi, le pH du milieu de culture des cellules acineuses pourrait permettre de maintenir l'état différencié des cellules acineuses. Bläuer et al. (2011) (*voir* protocole ci-après) ont utilisé un milieu de culture dont le pH a été ajusté à 7,8 (au lieu de 7,4, classiquement).

Méthode de Sphyris et al. (2005)

La méthode consiste en deux étapes de culture distinctes :

- un attachement initial des acini sur un support de culture recouvert de collagène de type IV, en présence d'un milieu riche en sérum, permettant d'améliorer la survie des cellules ;

- une culture des acini dans un milieu défini sans sérum, mais riche en acides aminés, afin de favoriser l'état différencié des cellules sécrétrices.

Sphyris et al. isolent les acini pancréatiques de souris adultes (50 à 70 jours) en suivant un protocole de digestion enzymatique (70 U/ml de collagénase) et de dispersion mécanique ménagée (pipetages à travers des pipettes en polystyrène) proche de celui que nous avons décrit précédemment. Après filtration sur une membrane de nylon de 150 µm, les acini sont purifiés par une centrifugation (8 g pendant 4 minutes) au travers d'une solution de BSA 4 % et repris dans le milieu d'ensemencement (**tableau 31-V**), contenant notamment 15 % de sérum de veau fœtal. Après

Tableau 31-V Milieu d'ensemencement des acini dispersés (D'après Sphyris et al., 2005)

Produit	Concentration finale
Milieu DMEM	1×
Sérum de veau fœtal	15 %
Pénicilline	100 U/ml
Streptomycine	100 µg/ml
Amphotéricine B	0,25 µg/ml
STI	200 µg/ml
3-isobutyl-1-méthyl-xanthine (IBMX)	0,5 mmol/l
EGF recombinant	5 ng/ml

DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle Medium* ; EGF, Facteur de croissance épidermique ; STI, Inhibiteur de la trypsine de la graine de soja.

une nouvelle centrifugation, le culot d'acini est repris dans le même milieu et transféré sur des supports de culture (plaque de 24 puits) contenant du collagène de type IV (50 µg/ml), préalablement adsorbé. Les acini sont maintenus dans ces conditions de culture classiques (enceinte thermostatée à 37 °C, sous atmosphère humide et en présence de 5 % de CO₂) pendant 3 à 5 jours, permettant ainsi l'attachement initial des acini sur le support recouvert de collagène. En microscopie à contraste de phase, les acini apparaissent sous forme d'îlots épithéliaux.

Les acini sont ensuite cultivés dans un milieu de culture sans sérum, le milieu CME (*Chee Medium with EGF*) (**tableau 31-VI**). Ce milieu contient cependant de l'insuline, de la transferrine, du sélénium et du facteur de croissance épidermique (EGF). La survie et la prolifération des îlots acineux cultivés dans le milieu sans sérum sont très dépendantes de la densité des îlots épithéliaux au moment du changement de milieu. Les îlots acineux ne doivent pas être trop petits en diamètre ou trop clairsemés au moment du changement de milieu. Au besoin, il est recommandé de retarder cette étape d'un jour ou deux.

Cette méthode permet de conserver des acini sécréteurs pendant une période de culture allant jusqu'à 12 jours post-isolement. En microscopie à contraste de phase, les acini apparaissent toujours une sous-forme d'îlots épithéliaux et les cellules acineuses conservent une morphologie

plutôt sphérique. Des analyses ultrastructurales de ces acini ont montré que les cellules maintenues selon cette méthode conservent un réticulum endoplasmique granuleux abondant et une grande richesse en vésicules de sécrétion de taille variable (grains de zymogènes). En revanche, dans ces conditions de culture, les cellules ont un index mitotique très faible. Cette faible capacité proliférative peut être la conséquence de l'absence de sérum et/ou de l'état différencié des cellules acineuses.

Méthode de Bläuer et al. (2011) : culture organotypique

Bläuer et al. ont décrit une méthode permettant de cultiver des cellules pancréatiques acineuses sur une période de culture allant jusqu'à 14 jours. Leur procédure expérimentale comporte deux étapes distinctes et successives :

- une culture d'explants de tissu pancréatique réalisée dans un environnement à l'interphase air-liquide. Cette culture « organotypique » est effectuée sur une membrane poreuse d'un insert de culture en contact étroit avec un milieu de culture ne contenant pas de sérum (**figure 31-7**). Ces conditions favorisent sélectivement la migration des cellules acineuses hors de l'explant, tout en limitant la prolifération d'autres types cellulaires (notamment des cellules conjonctives). À l'issue d'une semaine de culture, les cellules acineuses forment une monocouche cellulaire à la surface de la membrane ;

- une culture « secondaire » de cellules acineuses obtenue par repiquage des cellules ayant migré hors de l'explant. Les cellules sont alors cultivées en monocouche sur plastique pendant une semaine supplémentaire.

Le pancréas est récupéré à partir de souris C57BL/6 et immergé dans une solution de lavage (**tableau 31-VII**) contenant un assortiment varié d'inhibiteurs de protéases à large spectre, ainsi que le STI.

Après l'élimination du tissu adipeux, le pancréas est émincé très finement de telle sorte que chaque fragment

Tableau 31-VI Milieu de culture CME des acini dispersé. (D'après Sphyris et al., 2005)

Produit	Concentration finale
Milieu Chee	1×
Pénicilline	100 U/ml
Streptomycine	100 µg/ml
Amphotéricine B	0,25 µg/ml
L-Glutamine	4 mmol/l
Dexaméthasone	100 nmol/l
Insuline	10 µg/ml
Transferrine	5 µg/ml
Sélénium	6,7 ng/l
STI	200 µg/ml
IBMX	0,5 mmol/l
EGF recombinant	5 ng/ml

CME, *Chee Medium with EGF* EGF, Facteur de croissance épidermique ; STI, Inhibiteur de la trypsine de la graine de soja.

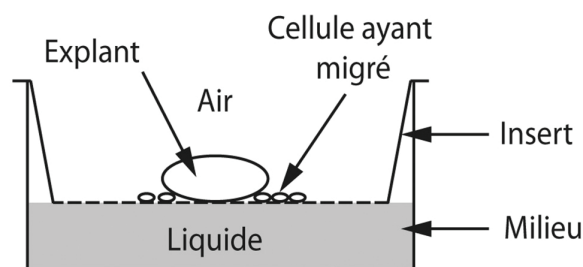


Figure 31-7 Illustration schématique du mode de culture des explants de pancréas de souris. Les explants de pancréas sont cultivés à l'interface air-liquide sur une membrane poreuse. Les cellules acineuses migrent hors de l'explant pour coloniser la surface de la membrane. (D'après Bläuer et al., 2011)

Tableau 31-VII Solution de lavage des explants pancréatiques (D'après Bläuer et al., 2011)

Produit	Concentration finale
Milieu DMEM/F12	1:1
Pénicilline	100 U/ml
Streptomycine	100 µg/ml
BSA	0,1 %
Pyruvate de sodium	2 mM
STI	0,02 %
Cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche)	1×

BSA, *bovin serum albumin* ; STI, Inhibiteur de la trypsine de la graine de soja.

mesure environ 1 mm de diamètre. Les fragments pancréatiques sont alors rincés deux fois avec de la solution de lavage, par sédimentation et resuspension. Au dernier lavage, les fragments pancréatiques sont repris dans du milieu de culture (**tableau 31-VIII**) et transférés dans douze inserts de culture (membrane poreuse ; diamètre des pores de 8 µm ; 12-Well ThinCert, Greiner), à raison de 5 à 8 explants par insert de culture (*voir* figure 31-7).

La mise en culture des explants requiert deux précautions importantes. Les explants doivent être en contacts directs avec leur support de culture (la membrane poreuse de l'insert), afin de permettre leur adhérence avec leur substrat et la migration conséquente de cellules pancréatiques. Ainsi, afin d'empêcher la flottaison des explants, il est important d'éliminer l'excédent de milieu accompagnant les explants. Les inserts sont ensuite placés délicatement dans une plaque de culture contenant douze puits. Le volume de milieu de culture dans le puits en dessous de l'insert est un paramètre important pour la réussite de la culture. En effet, le volume de milieu doit être suffisant pour nourrir les explants et ne pas excéder le niveau de la membrane afin d'éviter de faire flotter les explants (*voir* figure 31-7). Dans le système d'insert de culture d'une plaque contenant douze puits, il est recommandé de compléter le puits avec 300 µl de milieu de culture (*voir* tableau 31-VIII).

Il est à noter que l'addition de la solution de MatrigelTM directement dans le milieu de culture est une bonne alternative à l'adsorption préalable de protéines matricielles sur la membrane des inserts de culture. Il est important de souligner que le milieu de culture élaboré par cette équipe est très enrichi en acides aminés et que son pH est légèrement alcalin (*voir* tableau 31-VIII). Le milieu de culture est renouvelé tous les 2 à 3 jours et la culture est maintenue au moins

Tableau 31-VIII Milieu de culture des explants pancréatiques et des cellules acineuses dispersées (D'après Bläuer et al., 2011)

Produit	Concentration finale
Milieu DMEM/F12	1:1
Pénicilline	50 U/ml
Streptomycine	50 µg/ml
Acides aminés (essentiels et non essentiels)	3× la formulation du DMEM
Insuline	5 µg/ml
STI	0,01 %
EGF recombinant	25 ng/ml
Matrigel TM (réduit en facteurs de croissance)	200 µg/ml

EGF, Facteur de croissance épidermique ; STI, Inhibiteur de la trypsine de la graine de soja.

Remarque : le pH du milieu de culture est ajusté à 7,8.

pendant 7 jours, jusqu'à ce que les cellules migrent hors de l'explant, colonisent le support de culture et forment une monocouche à la surface de la membrane poreuse.

À l'issue de la culture primaire (environ 7 jours), les cellules acineuses ayant colonisé le support de culture sont détachées de la membrane à l'aide d'une solution de trypsine recombinante (TripLETM Express, Invitrogen) pendant 10 minutes à +37 °C. Une dissociation mécanique ménagée avec une pipette en polystyrène permet de séparer les cellules acineuses. Les agrégats tissulaires non digérés (dont l'explant) sont éliminés grâce à un tamis en nylon possédant des pores de 40 µm (BD Biosciences FalconTM). Les cellules sont concentrées par une centrifugation de 200 g pendant 1 minute et rincées une fois par l'addition de milieu de culture (*voir* tableau 31-VIII). Les cellules lavées sont reprises dans le milieu de culture, puis ensemencées dans les puits d'une plaque contenant 96 puits, à raison de 30 000 cellules par puits, dans du milieu de culture (50 µl/puits). Le lendemain, le même volume de milieu de culture est ajouté, et les jours suivants, seulement la moitié du milieu de culture conditionné est renouvelée par du milieu de culture « frais ».

Avec ce mode opératoire, les cellules acineuses pancréatiques de souris sont capables de survivre et de maintenir leur phénotype sécréteur sur de longues périodes de culture, jusqu'à 14 jours. En effet, ces cellules sont capables de sécréter de l'amylase non seulement à l'issue de la culture primaire (7 jours post-isolément), mais également après une semaine de culture en monocouche,

après avoir subi un repiquage. Ce protocole offre un réel progrès pour étudier la physiologie et la pathophysiologie des cellules acineuses *in vitro*. Un autre avantage de cette technique réside dans le fait que la culture est obtenue sans aucune dissociation enzymatique, ce qui permet de maintenir l'intégrité des membranes cellulaires et des relations intercellulaires. Cependant, comme il s'agit d'une culture provenant d'explants de pancréas, qui contiennent différents types cellulaires (cellules fibroblastiques, cellules endothéliales, canalaire...), la culture obtenue peut contenir des cellules contaminantes. Cette hétérogénéité cellulaire peut être un frein à certaines études expérimentales qui nécessitent une réponse cellulaire fine.

Conclusion

Dans cette revue, nous avons vu qu'il existait différents protocoles permettant de cultiver des cellules pancréatiques acineuses murines, avec de nombreuses possibilités d'adaptations des procédures expérimentales, en fonction du degré de purification des cellules, des applications recherchées, et du temps consacré à l'isolement de ces cellules. Même si le phénomène de dédifférenciation des cellules acineuses pancréatiques reste inévitable *in vitro*, les protocoles détaillés dans ce chapitre ont permis d'apporter des améliorations pour ralentir ce processus. Comme la dédifférenciation des cellules acineuses et leur transdifférenciation en cellules de type canalaire est un des mécanismes proposés pour la genèse des cancers pancréatiques exocrines (Stanger et Dor, 2006), la culture d'acini pancréatiques représente un système adéquat pour les études des mécanismes moléculaires responsables de la plasticité de ces cellules. En combinaison avec l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés (Aguirre et al., 2003 ; Hingorani et al., 2003 ; Hingorani et al., 2005 ; Bardeesy et al., 2006 ; Izeradjene et al., 2007 ; Vincent et al., 2009 ; Carrière et al., 2011 ; Guerra et al., 2011) et le développement des techniques de transfert de gènes [transduction adénovirale (Sphyrin et al., 2005) ou lentivirale, utilisation de nanoparticules], ce système *in vitro* de culture de cellules pancréatiques acineuses primaires est très utile pour déterminer les conséquences d'un dysfonctionnement génique sur la régulation de la différenciation ou la dédifférenciation des cellules acineuses et permettra de mieux comprendre les événements moléculaires responsables de l'apparition des pancréatites, des lésions précancéreuses et leur évolution en cellules néoplasiques.

RÉFÉRENCES

- Agbunag C, Lee KE, Buontempo S, Bar-Sagi D. (2006) Pancreatic duct epithelial cell isolation and cultivation in two-dimensional and three-dimensional culture systems. *Meth Enzymol.* 407:703-10.
- Aguirre AJ, Bardeesy N, Sinha M, Lopez L, Tuveson DA, Horner J, et al. (2003) Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* 17:3112-26.
- Amsterdam A, Jamieson JD. (1972) Structural and functional characterization of isolated pancreatic exocrine cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 69:3028-32.
- Amsterdam A, Jamieson JD. (1974a) Studies on dispersed pancreatic exocrine cells. I. Dissociation technique and morphologic characteristics of separated cells. *J Cell Biol.* 63:1037-56.
- Amsterdam A, Jamieson JD. (1974b) Studies on dispersed pancreatic exocrine cells. II. Functional characteristics of separated cells. *J Cell Biol.* 63:1057-73.
- Apte MV, Haber PS, Applegate TL, Norton ID, McCaughan GW, Korsten MA, et al. (1998) Periampullar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut.* 43:128-33.
- Ascenzi P, Bocedi A, Bolognesi M, Spallarossa A, Coletta M, De Cristofaro R, et al. (2003) The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein. *Curr Protein Pept Sci.* 4:231-51.
- Bardeesy N, DePinho RA. (2002) Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat Rev Cancer.* 2:897-909.
- Bardeesy N, Cheng KH, Berger JH, Chu GC, Pahler J, Olson P, et al. (2006) Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes Dev.* 20:3130-46.
- Bartholin L, Cyprian FS, Vincent D, Garcia CN, Martel S, Horvat B, et al. (2008) Generation of mice with conditionally activated transforming growth factor beta signaling through the TbetaRI/ALK5 receptor. *Genesis.* 46:724-31.
- Bendayan M, Duhr MA, Gingras D. (1986) Studies on pancreatic acinar cells in tissue culture: basal lamina (basement membrane matrix promotes three-dimensional reorganization. *Eur J Cell Biol.* 42:60-7.
- Benton G, Kleinman HK, George J, Arnaoutova I. (2011) Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells. *Int J Cancer.* 128:1751-7.
- Bläuer M, Nordback I, Sand J, Laukkarinen J. (2011) A novel explant outgrowth culture model for mouse pancreatic acinar cells with long-term maintenance of secretory phenotype. *Eur J Cell Biol.* 90:1052-60.
- Bosco D, Soriano JV, Chanson M, Meda P. (1994) Heterogeneity and contact-dependent regulation of amylase release by individual acinar cells. *J Cell Physiol.* 160:378-88.
- Carrière C, Young AL, Gunn JR, Longnecker DS, Korc M. (2011) Acute pancreatitis accelerates initiation and progression to pancreatic cancer in mice expressing oncogenic Kras in the nestin cell lineage. *PLoS one.* 6:e27725.
- Case RM. (1978) Synthesis, intracellular transport and discharge of exportable proteins in the pancreatic acinar cell and other cells. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 53:211-354.
- Chang TM, Chey WY. (2001) Neurohormonal control of exocrine pancreas. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 17:416-25.
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry.* 18:5294-9.
- De Vonis Bidlingmeyer U, Leary TR, Laskowski M Jr. (1972) Identity of the tryptic and alpha-chymotryptic reactive sites on soybean trypsin inhibitor (Kunitz). *Biochemistry.* 11:3303-10.
- Doisne JM, Bartholin L, Yan KP, Garcia CN, Duarte N, Le Luduec JB, et al. (2009) iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-beta signaling. *J Exp Med.* 206:1365-78.
- Doyle CJ, Yancey K, Pitt HA, Wang M, Bemis K, Yip-Schneider MT, et al. (2012) The proteome of normal pancreatic juice. *Pancreas.* 41:186-94.

- Fanjul M, Gmyr V, Sengenès C, Ratovo G, Dufresne M, Lefebvre B, et al. (2010) Evidence for epithelial-mesenchymal transition in adult human pancreatic exocrine cells. *J Histochem Cytochem.* 58:807-23.
- Gaiser S, Daniluk J, Liu Y, Tsou L, Chu J, Lee W, et al. (2011) Intracellular activation of trypsinogen in transgenic mice induces acute but not chronic pancreatitis. *Gut.* 60:1379-88.
- Ghajar CM, Bissell MJ. (2008) Extracellular matrix control of mammary gland morphogenesis and tumorigenesis: insights from imaging. *Histochem Cell Biol.* 130:1105-18.
- Githens S. (1988) The pancreatic duct cell: proliferative capabilities, specific characteristics, metaplasia, isolation, and culture. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 7:486-506.
- Guerra C, Collado M, Navas C, Schuhmacher AJ, Hernández-Porras I, Cañamero M, et al. (2011) Pancreatitis-induced inflammation contributes to pancreatic cancer by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Cell.* 19:728-39.
- Han B, Logsdon CD. (1999) Cholecystokinin induction of mob-1 chemokine expression in pancreatic acinar cells requires NF-kappaB activation. *Am J Physiol.* 277:C74-82.
- Hezel AF, Kimmelman AC, Stanger BZ, Bardeesy N, Depinho RA. (2006) Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* 20:1218-49.
- Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, et al. (2003) Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell.* 4:437-50.
- Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, et al. (2005) Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell.* 7:469-83.
- Izeradjene K, Combs C, Best M, Gopinathan A, Wagner A, Grady WM, et al. (2007) Kras(G12D) and Smad4/Dpc4 haploinsufficiency cooperate to induce mucinous cystic neoplasms and invasive adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Cell.* 11:229-43.
- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. (2010) Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin.* 60:277-300.
- Ji B, Gaiser S, Chen X, Ernst SA, Logsdon CD. (2009) Intracellular trypsin induces pancreatic acinar cell death but not NF-kappaB activation. *J Biol Chem.* 284:17488-98.
- Ji B, Kopin AS, Logsdon CD. (2000) Species differences between rat and mouse CCKA receptors determine the divergent acinar cell response to the cholecystokinin analog JMV-180. *J Biol Chem.* 275:19115-120.
- Kibbey MC, Royce LS, Dym M, Baum BJ, Kleinman HK. (1992) Glandular-like morphogenesis of the human submandibular tumor cell line A253 on basement membrane components. *Exp Cell Res.* 198:343-51.
- Klein T, Heremans Y, Heimberg H, Pipeleers D, Madsen OD, Serup P, et al. (2009) Investigation and characterization of the duct cell-enriching process during serum-free suspension and monolayer culture using the human exocrine pancreas fraction. *Pancreas.* 38:36-48.
- Kleinman HK, McGarvey ML, Liotta LA, Robey PG, Tryggvason K, Martin GR. (1982) Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry.* 21:6188-93.
- Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, et al. (1986) Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry.* 25:312-8.
- Kruse ML, Hildebrand PB, Timke C, Fölsch UR, Schäfer H, Schmidt WE. (2001) Isolation, long-term culture, and characterization of rat pancreatic fibroblastoid/stellate cells. *Pancreas.* 23:49-54.
- Kunitz M, Northrop JH. (1936) Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound. *J Gen Physiol.* 19:991-1007.
- Lardon J, Bouwens L. (2005) Metaplasia in the pancreas. *Differentiation.* 73:278-86.
- Leung PS. (2010a) Overview of the pancreas. In: *The renin-angiotensin system: Current research progress in the pancreas.* Leung PS. Springer Netherlands, pp. 3-12.
- Leung PS. (2010b) Physiology of the pancreas. In: *The renin-angiotensin system: Current research progress in the pancreas.* Leung PS. Springer Netherlands, pp. 13-27.
- Logsdon CD, Williams JA. (1983) Epidermal growth factor binding and biologic effects on mouse pancreatic acini. *Gastroenterology.* 85:339-45.
- Logsdon CD, Williams JA. (1986) Pancreatic acinar cells in monolayer culture: direct trophic effects of caerulein in vitro. *Am J Physiol.* 250:G440-7.
- Mathison A, Liebl A, Bharucha J, Mukhopadhyay D, Lomber G, Shah V, et al. (2010) Pancreatic stellate cell models for transcriptional studies of desmoplasia-associated genes. *Pancreatology.* 10:505-16.
- Maitra A, Hruban RH. (2008) Pancreatic cancer. *Annu Rev Pathol.* 3:157-88.
- Moo TA, Zarnegar R, Brunaud L. (2009) Pancreas: Embryology, anatomy, and physiology. In: *Endocrine surgery.* Hubbard J, Inabnet WB, Lo CY. Springer London, pp. 459-69.
- Noguchi H. (2009) Pancreatic islet transplantation. *World J Gastrointest Surg.* 1:16-20.
- Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R. (2010) Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 24:349-58.
- Ramm GA. (1998) Isolation and culture of rat hepatic stellate cells. *J Gastroenterol Hepatol.* 13:846-51.
- Rapoport DH, Schickanz S, Gürleyik E, Zühlke C, Kruse C. (2009) Isolation and in vitro cultivation turns cells from exocrine human pancreas into multipotent stem-cells. *Ann Anat.* 191:446-58.
- Ricordi C, Lacy PE, Scharp DW. (1989) Automated islet isolation from human pancreas. *Diabetes.* 38(Suppl. 1):140-2.
- Rovasio RA. (2010) Development and structure of the pancreas. In: *Pancreatic cancer.* Neoptolemos JP, Urrutia R, Abbruzzese J, Büchler MW. Springer, New York, pp. 27-38.
- Rovira M, Scott SG, Liss AS, Jensen J, Thayer SP, Leach SD. (2010) Isolation and characterization of centroacinar/terminal ductal progenitor cells in adult mouse pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107:75-80.
- Schultz GS, Sarras MP Jr, Gunther GR, Hull BE, Alicea HA, Gorelick FS, et al. (1980) Guinea pig pancreatic acini prepared with purified collagenase. *Exp Cell Res.* 130:49-62.
- Seely KA, Aggeler J. (1991) Modulation of milk protein synthesis through alteration of the cytoskeleton in mouse mammary epithelial cells cultured on a reconstituted basement membrane. *J Cell Physiol.* 146:117-30.
- Sphyris N, Logsdon CD, Harrison DJ. (2005) Improved retention of zymogen granules in cultured murine pancreatic acinar cells and induction of acinar-ductal transdifferentiation in vitro. *Pancreas.* 30:148-57.
- Stanger BZ, Dor Y. (2006) Dissecting the cellular origins of pancreatic cancer. *Cell Cycle.* 5:43-6.
- Vincent DF, Gout J, Chuvin N, Arfi V, Pommier RM, Bertolino P, et al. (2012) Tif1-gamma suppresses murine pancreatic tumoral transformation by a smad4-independent pathway. *Am J Pathol.* 180:2214-21.

Vincent DF, Yan KP, Treilleux I, Gay F, Arfi V, Kaniewski B, et al. (2009) Inactivation of TGF1gamma cooperates with Kras to induce cystic tumors of the pancreas. *PLoS Genet.* 5:e1000575.

Vonlaufen A, Phillips PA, Xu Z, Goldstein D, Pirola RC, Wilson JS, et al. (2008) Pancreatic stellate cells and pancreatic cancer cells: an unholy alliance. *Cancer Res.* 68:7707-10.

Vukicevic S, Kleinman HK, Luyten FP, Roberts AB, Roche NS, Reddi

AH. (1992) Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Exp Cell Res.* 202:1-8.

Williams JA, Korc M, Dormer RL. (1978) Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini. *Am J Physiol.* 235:517-24.

IV. Génération d'un modèle murin délété de façon conditionnelle pour ALK4

Generation of a conditional mouse model to target Acvr1b disruption in adult tissues.

Doriane Ripoche*, Johann Gout*, Roxane M. Pommier, Rami Jaafar, Chang X. Zhang, Laurent Bartholin, Philippe Bertolino.

Genesis (2012). 8, 1–8.

* *co-premiers auteurs*

TECHNOLOGY REPORT

Generation of a Conditional Mouse Model to Target *Acvr1b* Disruption in Adult Tissues

Doriane Ripoche,^{1,2,3} Johann Gout,^{1,2,3} Roxane M. Pommier,^{1,2,3} Rami Jaafar,^{1,2,3}
Chang X. Zhang,^{1,2,3} Laurent Bartholin,^{1,2,3} and Philippe Bertolino^{1,2,3*}

¹Inserm U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France

²CNRS UMR5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France

³Université Lyon 1, F-69000 Lyon, France

Received 13 September 2012; Revised 11 October 2012; Accepted 13 October 2012

Summary: Alk4 is a type I receptor that belongs to the transforming growth factor-beta (TGF- β) family. It takes part in the signaling of TGF- β ligands such as Activins, Gdfs, and Nodal that had been demonstrated to participate in numerous mechanisms ranging from early embryonic development to adult-tissue homeostasis. Evidences indicate that Alk4 is a key regulator of many embryonic processes, but little is known about its signaling in adult tissues and in pathological conditions where Alk4 mutations had been reported. Conventional deletion of Alk4 gene (*Acvr1b*) results in early embryonic lethality prior gastrulation, which has precluded study of Alk4 functions in postnatal and adult mice. To circumvent this problem, we have generated a conditional *Acvr1b* floxed-allele by flanking the fifth and sixth exons of the *Acvr1b* gene with loxP sites. Cre-mediated deletion of the floxed allele generates a deleted allele, which behaves as an *Acvr1b* null allele leading to embryonic lethality in homozygous mutant animals. A tamoxifen-inducible approach to target disruption of *Acvr1b* specifically in adult tissues was used and proved to be efficient for studying Alk4 functions in various organs. We report, therefore, a novel conditional model allowing investigation of biological role played by Alk4 in a variety of tissue-specific contexts. *genesis* 00:1–8, 2012. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: Alk4; tamoxifen; Cre-LoxP; conditional null allele; liver

Activins are homo- or heterodimers of Inhibin β A and β B subunits that belong to the transforming growth factor-beta (TGF- β) superfamily of ligands. Originally associated with the reproduction axis and the regula-

tion and secretion of follicle-stimulating hormones (FSHs) (Ling *et al.*, 1986), activins signaling has recently emerged in the homeostasis of numerous adult tissues as well as in pathological conditions such as wound healing, fibrosis, cachexia, inflammation, and cancer (Sulyok *et al.*, 2004; Xia and Schneyer, 2009; Zhou *et al.*, 2010). Activin ligands signal through hetero-tetrameric complexes of specific type I and type II transmembrane serine/threonine kinase receptors. Whereas ActRIIA and ActRIIB, the known Activin-type II receptors are well-studied and have benefit from the use of appropriate mouse models (Lee *et al.*, 2006; Matzuk *et al.*, 1995; Oh and Li, 1997; Song *et al.*, 1999), the functions and roles of the Alk4 and Alk7 type I Activin receptors have drawn so far less interest (Bertolino *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 1998; Jörnvall *et al.*, 2004).

Various functions, ranging from mesoderm induction, primitive streak formation, axis and left-right determination in vertebrate development, have been proposed for Alk4 and its cognate ligands (Armes and Smith, 1997; Chen *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 1997). To that extend, disruption of Alk4 by targeting *Acvr1b* in mouse was

Doriane Ripoche and Johann Gout contributed equally to this work.

* Correspondence to: Philippe Bertolino, Lyon Cancer Research Center (CRCL), Inserm U1052- CNRS 5286, Team 4, 28 Rue Laennec, Lyon 69008, France. E-mail: philippe.bertolino@inserm.fr

Contract grant sponsor: The Ligue Départementale CD42 de Lutte contre le Cancer and Lyon I University.

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

DOI: 10.1002/dvg.22352

shown to be lethal during embryonic development (E9.5) due to an egg cylinder development-arrest before embryos reach gastrulation (Gu *et al.*, 1998). Interestingly, and despite the accumulation of evidence indicating that Alk4 is a key regulator of many embryonic processes, very little is known about the spatiotemporal aspects of Alk4 signaling in adult tissues. This observation underscores the importance of a better understanding of Alk4 functions in tissues like liver, kidneys, pancreas, skin, brain, lung, and muscles where Alk4 expression had been reported (Roberts and Barth, 1994; Ten Dijke *et al.*, 1993). Moreover, Alk4 is capable of binding and signaling ligands that are not limited to Activin members but further include Nodal, Gdf-1, Gdf-3, Gdf-8, and Gdf-11 (Andersson *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2004; Kemaladewi *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2002; Yeo and Whithman, 2001). The importance of ligands such as Gdf-8 in muscle, Gdf-3 in adipose tissues and Gdf-1/Gdf-11 in brain reinforces the need to re-evaluate the importance of the functions modulated by Alk4 in those tissues. Such need is further emphasized by both the existence of Alk4 polymorphisms associated with muscle strength (Windelinckx *et al.*, 2011) and the identification of Alk4 mutations in patients with pituitary adenomas (Danila *et al.*, 2002) and pancreatic ductal adeno-carcinomas (PDAC) (Su *et al.*, 2001). Unfortunately, the understanding of Alk4 functions has so far been precluded by the lack of adapted mouse model. Recently, Qui *et al.* (2011) reported a novel conditional allele for *Acrv1b* based on the disruption of the entire coding sequence from the peptide signal sequence of Alk4. Use of these animals in combination with a Keratin14-Cre driver line led mutant mice to develop a severe hair loss phenotype. This work emphasizes an important role of Alk4 in hair follicle development and cycling. It represents a major advance for better understanding Alk4 adult functions, which was previously hampered by the early embryonic lethality observed in mice lacking this receptor. Here, we report another *Acrv1b* animal model with restricted spatiotemporal receptor deficiencies that will help to further address the important question of Alk4 function *in vivo*.

The *Acrv1b* gene comprises nine exons spanning 39.6 kb on mouse chromosome 15. We based our conditional targeting approach on a CreLoxP-mediated excision of the fifth and sixth *Acrv1b* exons as previous targeting of exon 5 was shown to be sufficient to inactivate Alk4 and cause embryonic lethality (Gu *et al.*, 1998). We decided to include exon 6 in our LoXP excision-strategy to further disrupt the reading of the remaining sequences due to the codon frame-shift that exists between exon 4 and exon 7 (Fig. 1a). Four ES clones with correct homologous recombination were obtained following targeting of the *Acrv1b* locus. These clones carrying the targeted (Tg) allele were screened on both arms by long-range PCR com-

bined with *EcoRV* or *BamHI* digestion (Fig. 1a and data not shown). Two ES clones were used to get chimeras that were subsequently checked by PCR for efficient germline transmission. Surprisingly, we found that the sole insertion of the Frt-*PgkNeo*-Frt-LoXP cassette in intron 4 did not result in a disrupted allele (data not shown). Taking benefit of our strategy allowing the removal of the *PgkNeo* cassette using a FLP recombinase, we use the *ACT-FLPe* deleter mice (Rodriguez *et al.*, 2000) to generate the *Acrv1b*-floxed (Fx) conditional allele (Fig. 1b,c). We next generated a deleted (Δ) *Acrv1b* allele by breeding *Acrv1b*^{Fx/Fx} animals with *Ell3a-Cre* transgenic mice (Holzenberger *et al.*, 2000). Animals carrying Fx and Δ alleles were screened by duplex PCR using similar primers (Fig. 1d). The viability of homozygous *Acrv1b*^{Fx/Fx} and *Acrv1b* ^{Δ/Δ} animals was subsequently assessed by mating heterozygous animal together. Whereas intercrosses of *Acrv1b*^{+/^{Fx}} animals did provide *Acrv1b*^{Fx/Fx} mice with an expected Mendelian ratio out of the 114 individuals analyzed, we could not obtain *Acrv1b* ^{Δ/Δ} animals from *Acrv1b*^{+/^{Fx}} intercrossing ($n = 0/83$) (Table 1). The lack of *Acrv1b* ^{Δ/Δ} mice at birth is consistent with the reported embryonic lethality associated with Alk4 disruption (Gu *et al.*, 1998) and further confirmed that the combined excision of exon 5 and exon 6 leads to a null and non-functional *Acrv1b* allele. Analyses from *Acrv1b*^{+/ ^{Δ}} intercrossing further confirmed that no viable *Acrv1b* ^{Δ/Δ} embryos could be found at E13.5 (data not shown). Note, that the identification of several embryo resorptions at that stage further supports the lack of functionality of the Δ allele and the potent use of our model to address the function of Alk4 in embryonic development.

Next, we further addressed the possibility to disrupt Alk4 in adult tissues. Ubiquitous temporal regulation of Cre recombination in mice can be achieved by expressing a Cre estrogen receptor fusion protein mutant (CreERT2) from the *Rosa26* locus (Feil *et al.*, 1997). This model responded efficiently to 4-OH-tamoxifen (4-OHT) administrations, providing, therefore, a useful tool to induce temporal recombination in embryonic and adult tissues (Haigis *et al.*, 2008; Ventura *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011). *Acrv1b*^{Fx/Fx} animals were, therefore, bred with *Rosa26-CreERT2* mice to generate *Acrv1b*^{Fx/Fx}; *Rosa26-CreERT2* mice, to evaluate Alk4 targeted disruption in adult tissues upon 4-OHT administrations. Cohorts of *Acrv1b*^{Fx/Fx}; *Rosa26-CreERT2*, *Acrv1b*^{Fx/Fx}, and *Rosa26-CreERT2* were treated during four consecutive days with 4-OHT to induce an efficient Cre recombination. Tissues collected 15 days after the last injection were used for DNA, RNA, and protein preparation as well as histological inclusion. Note that we did not find treated animals to have lost weight or developed any gross defect in dissected organs at the time of sacrifice. The recombination efficiency was first

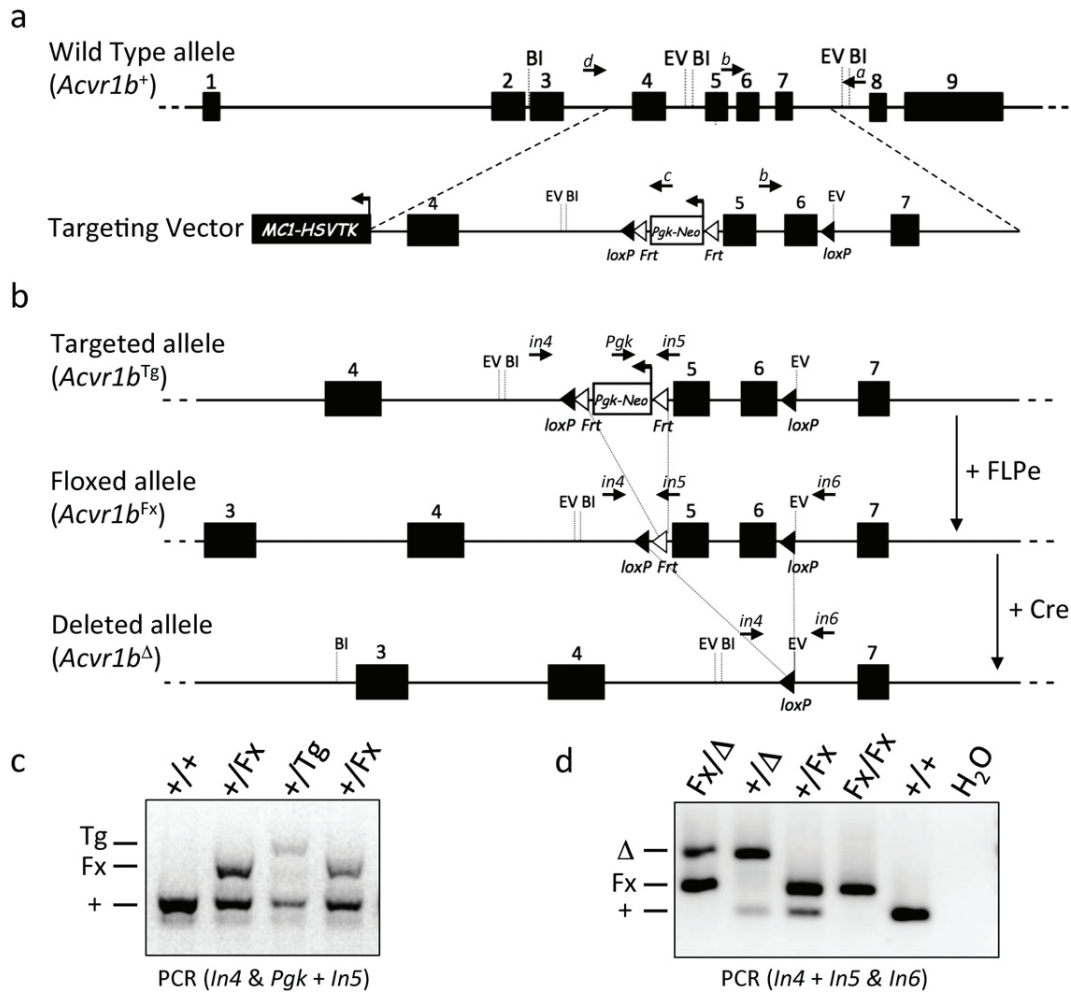


FIG. 1. Gene targeting and FLPe/Cre-mediated recombination of the *Acvr1b* locus. **(a)** Schematic view of the *Acvr1b* genomic locus on chromosome 15 and of the designed targeted vector. Exons are indicated by black boxes with numbers. Primers and restriction enzyme-site positions used for the long-range PCR screening are indicated by arrows (a, b, c, and d), or by abbreviations (EV: *EcoRV*; BI: *BamHI*). **(b)** Schematic representation of the different *Acvr1b* alleles. Vertical arrows indicate which recombinase was used to obtain the designated alleles. Primers used to genotype the different alleles are indicated by arrows (*in4*, *in5*, *in6*, and *Pgk*). **(c)** A representative example of a PCR done to genotype the Targeted (Tg) allele and to identify the floxed (Fx) allele following the FLPe recombination. PCR primers are indicated below picture, (+): wild-type allele. **(d)** representative PCR results for the identification of the deleted (Δ) allele and for the genotyping of the *Acvr1b*^{+/ Δ} and *Acvr1b*^{+/*Fx*} heterozygous intercrosses. Primers used for the PCR are indicated below the picture.

Table 1
Mendelian Repartition of *Acvr1b*^{+/*Fx*} and *Acvr1b*^{+/ Δ} Intercrosses

Breeding schemes	Expected genotypes	Number/total analyzed	Calculated ratio (%)	Expected Mendelian ratio (%)
<i>Acvr1b</i> ^{+/<i>Fx</i>} x <i>Acvr1b</i> ^{+/<i>Fx</i>}	<i>Acvr1b</i> ^{+/+}	29/114	25.4	25
	<i>Acvr1b</i> ^{+/<i>Fx</i>}	58/114	50.9	50
	<i>Acvr1b</i> ^{Fx/<i>Fx</i>}	27/114	23.7	25
<i>Acvr1b</i> ^{+/Δ} x <i>Acvr1b</i> ^{+/Δ}	<i>Acvr1b</i> ^{+/+}	30/83	36.2	25
	<i>Acvr1b</i> ^{+/Δ}	53/83	64.8	50
	<i>Acvr1b</i> ^{Δ/Δ}	0/83	0	25

determined by PCR performed on genomic DNA isolated from a subset of selected organs. Overall, we found the 4-OHT treatment to work convincingly, yet it showed a variable efficiency in tested-tissues when

compared with sunflower-oil-injected controls. Recombination was found to be almost complete in lungs, spleen, pancreas, and to a lesser extent liver whereas a partial recombination occurred in skin, heart, kidneys,

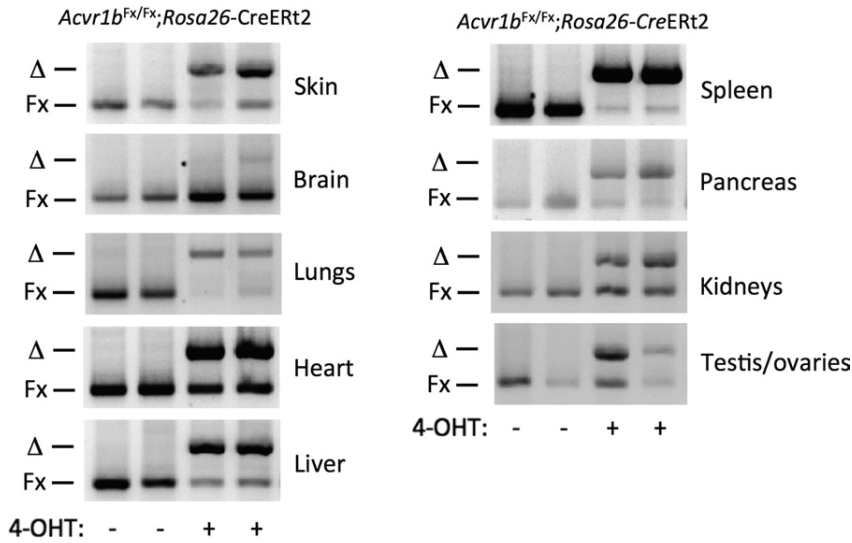


FIG. 2. Induced tissue recombination of the *Acvr1b*^{Fx} locus upon 4-OH-tamoxifen treatment. Six-week-old *Acvr1b*^{Fx/Fx};*Rosa26-CreERT2* mice were subjected to four consecutive daily Intra-Peritoneal (IP) injections of 1 mg of 4-OH-tamoxifen (4-OHT) or vehicle (sunflower oil) and sacrificed 2 weeks later for tissue sampling. Three animals 4-OHT- or oil-treated were randomly selected to collect indicated tissues (skin, brain, lung, heart, liver, spleen, pancreas, kidneys, testis, or ovaries). Genomic DNA was extracted and used to run genotyping duplex PCRs using a combination of the in4, in5, and in6 primers. A representative PCR result of two of the three independent tissue analyzed-samples is shown for each tested organ.

and ovaries/testis (Fig. 2). Out of the nine tissues tested brain was the only one showing a modest if not an absence of recombination. Note that this observation is consistent with the weak *Rosa26* expression reported in post-mitotic neurons (Hameyer *et al.*, 2007). Thus, it suggests that, despite a faint band corresponding the Δ *Acvr1b* allele seen in one of the three samples tested, Alk4 disruption in neuronal postnatal tissues should be better performed with a brain selective inducible Cre driver line.

Next, we aimed to quantify *Acvr1b* transcript by real-time PCR in tissues that had undergone recombination. As expected, most of the analyzed tissues showed a reduced *Acvr1b* expression, yet lungs surprisingly did not reveal any changes in *Acvr1b* transcript level upon 4-OHT treatments (Fig. 3a). Analysis of cDNA obtained from skin, liver, spleen, pancreas, and kidneys revealed a robust transcript reduction, whereas, as expected, the expression of *Acvr1b* was not affected in brain tissues (Fig. 3a). These results were further validated at the protein level by western blot analysis of liver protein extracts (Fig. 3b) and histological analysis. We found Alk4 protein expression to be significantly reduced in liver extract yet the presence of a weak residual band suggests that the disruption was not complete in analyzed samples. To the same extend, immunohistochemistry performed on paraffin-embedded tissues sections demonstrated a massive reduction of Alk4 expression in the liver of 4-OHT treated mice compared with matching oil-treated controls that were showing a well-delineated

Alk4 staining at the hepatocyte cell surface (Fig. 4a). Consistent with our western blot analysis we did find some liver areas where an Alk4 staining was still present, suggesting recombination was not achieved in those regions. In kidney, we also noticed the presence of large areas lacking Alk4 expression whereas some tubules within the kidney of 4-OHT-treated animals were still expressing Alk4 following induced recombination (Fig. 4b).

Together, these results validated the use of the *Acvr1b*^{Fx/Fx} mice as a novel conditional model to disrupt Alk4 receptor during embryonic development and in various adult tissues. Our work also demonstrated that the Δ allele generated upon exons 5/6 excision results in a null allele comparable of the Knock-Out allele previously reported (Gu *et al.*, 1998). This model provides, therefore, a useful tool to delineate Alk4 adult and embryonic functions and to identify novel phenotypes and biological consequences caused by its inactivation. To that extend, aging studies following 4-OHT treatments might help to precise the consequences associated with Alk4 disruption in kidneys and hepatic pathologies. More importantly, pathologies with reported *Acvr1b* mutations such as pituitary adenoma (Danila *et al.*, 2002) and pancreatic ductal adenocarcinoma (Su *et al.*, 2001) will benefit from the use of the model we report here.

In conclusion, we have produced a novel conditional *Acvr1b* floxed allele that can be ablated in embryonic and adult tissues with the help of inducible or tissue specific driven Cre transgenic line. We confirmed that

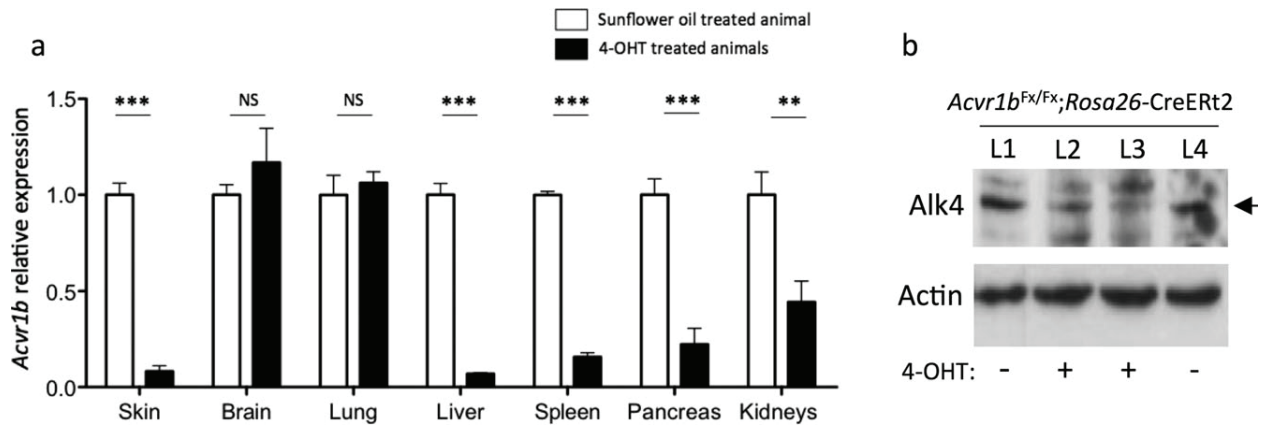


FIG. 3. Conditional 4-OH-tamoxifen (4-OHT) inactivation of *Acvr1b* reduces Alk4 transcript and protein expression in various organs. **(a)** Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis of *Acvr1b* expression performed on a subset of dissected tissues from *Acvr1b^{Fx/Fx}; Rosa26-CreERT2* 4-OHT (black box), or sunflower oil (white box) treated animals. Results were normalized against *Tbp* expression. Tissue samples from three independent animals were analyzed per organ and per treatment. The data shown as means \pm SEM were compared using a student's *t* test (** <0.01 ; *** <0.001 ; NS: not significant). **(b)** Western blot analysis of Alk4 protein expression in liver tissues following mice treatment with 4-OHT or sunflower oil. An arrowhead shows the Alk4 band. A duplicate of protein extracts from independent livers of *Acvr1b^{Fx/Fx}; Rosa26-CreERT2* animals are represented as indicated [L1 and L4, oil-treated controls (-); L2 and L3, 4-OHT-treated individuals (+)].

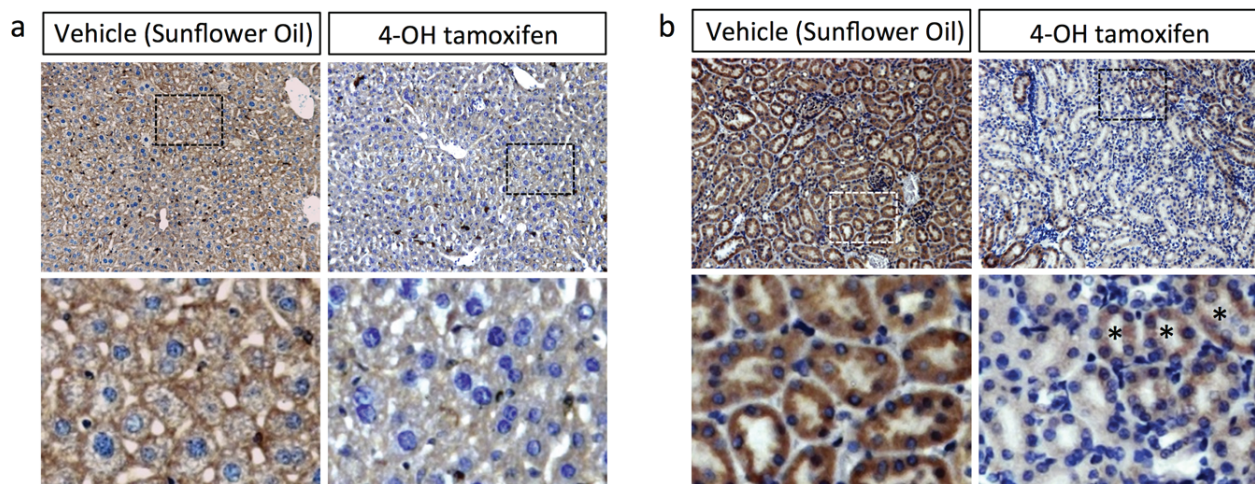


FIG. 4. 4-OH-tamoxifen treatment efficiently disrupts Alk4 expression in liver and kidneys of *Acvr1b^{Fx/Fx}; Rosa26-CreERT2* treated animals. Alk4 expression was analyzed by immunohistochemistry on liver **(a)** and kidneys **(b)** paraffin-embedded tissue sections. A representative picture-set of liver and kidney staining from vehicle- or 4-OHT treated *Acvr1b^{Fx/Fx}; Rosa26-CreERT2* mice are shown. Note the residual positive Alk4 staining that could be seen in a subset of kidney tubules (*) where 4-OHT treatment appeared to be less efficient. Lower panels represent higher magnification of dashed areas.

the deleted allele obtained after recombination is null and non-functional as confirmed by the embryonic lethality that occurred in animal carrying homozygous Δ alleles. Thus, *Acvr1^{Fx/Fx}* mice provide a novel and promising mouse model that will be complementary to the conditional *Acvr1b* model developed by Qiu *et al.* (2011) to study Alk4 receptor functions during adult life as well as embryonic development. This model will help to better understand the unexplored functions of this receptor in tissues homeostasis and human diseases associated with its mutation.

METHODS

Generation of *Acvr1b* Mutant Mice

All animal maintenance and experiments were performed in accordance with the animal care guidelines of the European Union and French laws and were validated by the local Animal Ethic Evaluation Committee. *Acvr1b* conditional targeting vector was produced from a mouse 129/J clone library. A *Bam*HI-*Xba*I 5 kb DNA genomic fragment containing exon 4 was first cloned in

a pL253 vector that provided the *MCI* promoter-herpes simplex virus-thymidine kinase cassette (*MCI-HSVTK*) at the 5' terminus of the gene targeting vector for negative selection. A *Bam*HI 6 kb DNA fragment containing exon 5, 6, and 7 was also recovered and cloned in a pBS-KS for further modification. Right and left homology arms were 3 and 3.5 kb, respectively. A *Frt-PgkNeo-Frt-LoxP* neomycin selection cassette flanked by two *Frt* sites and containing one *LoxP* site at one end was obtained from a pL451 vector and cloned was inserted 489 bp upstream of exon 5. A second *LoxP* site followed by an *EcoRV* site for screening purpose was inserted 273 bp following the end of exon 6. The integrity of the entire targeting vector was verified by sequencing prior to homologous recombination. The *Clal*-linearized targeting vector was subsequently electroporated in CK35 (129/Sv) ES cells. Five hundred G418-resistant clones were handpicked and screened by digestion of long-range PCR products. Left arm was screened by a *Bam*HI digestion of the PCR product obtained from c: (Fw-*Neo*) 5'-TCGCATTGTCTGAGTAGGTG-3' and d: (Rev-ExtLeft) 5'-ACTTTATATGCCTCAGTATGG-3' whereas right arm was screened by an *EcoRV* digestion of the PCR product obtained from a: (Fw-ExtRight) 5'-CACTGATGATGGCATCTGGA-3' and b: (Rev.int6) 5'-GAGCATGGCTCACTGTTTGA-3' amplicons. Two ES clones were selected and injected in C57BL/6 blastocyst to get chimeras that were subsequently checked for germline transmission of the targeted (Tg) allele by PCR. Genotyping of F1 mice were done using duplex PCR with In4: 5'-CAGTGGTTAAGAACTAGTGC-3'; In5: 5'-GTAGTGTTATGTGTTATTGCC-3' and *Pgk*: 5'-CTACCGGTGGATGTGGAATGTG-3' primers combination. *Acvr1b*^{Fx} and *Acvr1b*^Δ alleles were respectively generated by crossing mice carrying the *Acvr1b*^{Tg} allele with *ACT-FLPe* (Rodriguez *et al.*, 2000) or *EIIa-Cre* (Holzenberger *et al.*, 2000) driver mice. Mice carrying those Fx or Δ alleles can be requested and provided for research use upon acceptance of the present manuscript. The following primers were used for duplex PCR genotyping: In4: 5'-CAGTGGTTAAGAACTAGTGC-3'; In5: 5'-GTAGTGTTATGTGTTATTGCC-3'; and In6: 5'-GAGCAAGAGTTTCTCTATGTAG-3'.

Tamoxifen Administration

Rosa26-CreERT2 mice (Ventura *et al.*, 2007) were bred with *Acvr1b*^{Fx/Fx} to generate cohorts of mice for 4-OH-tamoxifen (4-OHT) treatments. To activate the CreERT2 recombinase, 6-week-old mice were subjected to intraperitoneal (IP) injection with 100 μL of a 10 mg/mL 4-OHT solution (Sigma Aldrich) prepared in 10% ethanol/90% sunflower oil (Sigma Aldrich). A subset group of animals was solely subjected to vehicle IP injections for control purposes. For each group, injections were done every day, 4 days in a row prior to the sacrifice of the mice

2 weeks after the first injection. Cohorts were as follow: 4-OHT-treated *Acvr1b*^{Fx/Fx}; *Rosa26-CreERT2* (*n* = 5); sunflower oil-treated *Acvr1b*^{Fx/Fx}; *Rosa26-CreERT2* (*n* = 4); 4-OHT-treated *Acvr1b*^{Fx/Fx} (*n* = 3); sunflower oil-treated *Acvr1b*^{Fx/Fx} (*n* = 2).

Tissues Recombination Analysis

Genomic DNA was isolated from freshly dissected tissues 2 weeks after the first 4-OHT/vehicle injection for PCR analysis using a duplex combination of primers to detect *Acvr1b* wild-type (204 bp), floxed (294 bp) and deleted (473 bp) alleles in the same PCR reaction. Primers sequences are as follow, In4: 5'-CAGTGGTTAAGAACTAGTGC-3'; In5: 5'-GTAGTGTTATGTGTTATTGCC-3'; and In6: 5'-GAGCAAGAGTTTCTCTATGTAG-3'.

Recombination efficiency was assessed from individual tissues collected from three tamoxifen- and three oil-treated animals.

Quantitative Analysis of Transcript Expression

RNA was extracted from freshly dissected tissues as following. Isolated tissues (skin, brain, liver, kidney, lung, pancreas, and spleen) were homogenized using a Bio-Gen Pro200 homogenizer (Pro Scientific Inc.) in a 5 M guanidine solution. Total RNA was further purified by RNeasy mini kit plus (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was transcribed using SuperScriptII reverse transcriptase (Invitrogen). Comparable amounts of tissue-cDNA from 4-OHT (*n* = 3) or sunflower oil (*n* = 3) treated *Acvr1b*^{Fx/Fx}; *Rosa26-CreERT2* mice were analyzed in duplicate for real-time PCR analysis. Primers for *Acvr1b* expression analyses were as follow *Acvr1b*-ex4Fw: 5'-GGTCCGTGAAGCAGAGATC-3', *Acvr1b*-ex5Rev: 5'-CAGTGAGCCATGCTCGTGAT-3' and all real-time PCR results were normalized to the expression of the *Tbp* housekeeping gene, *Tpb*-Fw: 5'-TGGTGTGCACAGGAGCCAAG-3', *Tpb*-Rev: 5'-TTCACATCACAGCTCCCCAC-3'. Real-time PCR analyses were carried out on a Step-One Real-Time System (Applied-Biosystem) using SYBR-Green reagent (Life Technologies). Statistical tests were done using a paired Student's *t*-test (Prism4, GraphPad). A *P* < 0.05 was considered significant.

Protein Expression and Western Blot Analysis

Proteins were extracted with a RIPA buffer from freshly dissected and Bio-Gen Pro200-homogenized livers. Proteins were quantified by the Lowry protein assay (DC-assay kit, Biorad). Twenty μg of protein per sample were separated using SDS-PAGE with a 10% resolving gel and transferred onto a PVDF membrane (GE Healthcare). Primary antibodies (rabbit anti-ALK4, Genetex; mouse anti-Actin, Santa Cruz BioTechnology) were incubated overnight at 4°C, followed by HRP-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) and detected using a Lumi-Light ECL solution (Roche).

Immunohistochemical Analysis of Liver and Kidney Tissues

Livers and kidneys were collected from mice 2 weeks after they received their last 4-OHT or sunflower-oil IP injection. Dissected tissues were rinsed and immediately fixed in 4% neutral-buffered formaldehyde for at least 24 h, followed by dehydration and paraffin embedding. Immunohistochemical staining was carried out on 3- μ m-thick paraffin sections. Briefly, sections were rehydrated and subjected to a pH 8.0/high temperature antigen retrieval in a Tris-EDTA-Tween20 solution followed by a block of endogenous peroxidase activity. Tissue sections were incubated overnight with an anti-Alk4 antibody (rabbit polyclonal, Epitomics) followed by a detection using a biotin-streptavidin coupled secondary anti-rabbit antibody (Vector) and a DAB revelation according to the manufacturer's instructions (DAB-Kit, Vector).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Christelle Martin and the Service d'Expérimentation Animale et de Transgénèse (SEAT, CNRS UPS 44, Villejuif, France) for their help during the generation of transgenic mice. They also thank ALECS-SFP (Lyon) and ANICAN (CRCL, Lyon) animal staffs for maintenance of the different mouse strains used for this project.

LITERATURE CITED

- Andersson O, Bertolino P, Ibáñez CF. 2007. Distinct and cooperative roles of mammalian Vg1 homologs GDF1 and GDF3 during early embryonic development. *Dev Biol* 311:500–511.
- Armes NA, Smith JC. 1997. The ALK-2 and ALK-4 activin receptors transduce distinct mesoderm-inducing signals during early *Xenopus* development but do not co-operate to establish thresholds. *Development* 124:3797–3804.
- Bertolino P, Holmberg R, Reissmann DM, Andersson O, Berggren PO, Ibáñez CF. 2008. Activin B receptor ALK7 is a negative regulator of pancreatic beta-cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:7246–7251.
- Chen Y, Mironova E, Whitaker LL, Edwards L, Yost HJ, Ramsdell AF. 2004. ALK4 functions as a receptor for multiple TGF beta-related ligands to regulate left-right axis determination and mesoderm induction in *Xenopus*. *Dev Biol* 268:280–294.
- Danila DC, Zhang X, Zhou Y, Haidar JN, Klibanski A. 2002. Overexpression of wild-type activin receptor alk4-1 restores activin antiproliferative effects in human pituitary tumor cells. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4741–4746.
- Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. 1997. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 237:752–757.
- Gu Z, Nomura M, Simpson BB, Lei H, Feijen A, Van Den Eijnden-Van Raaij J, Donahoe PK, Li E. 1998. The type I activin receptor ActRIB is required for egg cylinder organization and gastrulation in the mouse. *Genes Dev* 12:844–857.
- Haigis KM, Kendall KR, Wang Y, Cheung A, Haigis MC, Glickman JN, Niwa-Kawakita M, Sweet-Cordero A, Sebolt-Leopold J, Shannon KM, Settleman J, Giovannini M, Jacks T. 2008. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat Genet* 40:600–608.
- Hameyer D, Loonstra A, Eshkind L, Schmitt S, Antunes C, Groen A, Bindels E, Jonkers J, Krimpenfort P, Meuwissen R, Rijswijk L, Bex A, Berns A, Bockamp E. 2007. Toxicity of ligand-dependent Cre recombinases and generation of a conditional Cre deleter mouse allowing mosaic recombination in peripheral tissues. *Physiol Genomics* 31:32–41.
- Holzenberger M, Lenzner C, Leneuve P, Zaoui R, Hamard G, Vaulont S, Bouc YL. 2000. Cre-mediated germline mosaicism: a method allowing rapid generation of several alleles of a target gene. *Nucleic Acids Res* 28:E92.
- Jörnvall H, Reissmann DM, Andersson O, Mehrkash M, Ibáñez CF. 2004. ALK7, a receptor for nodal, is dispensable for embryogenesis and left-right patterning in the mouse. *Mol Cell Biol* 24:9383–9389.
- Kemaladewi DU, de Gorter DJ, Aartsma-Rus A, van Ommen GJ, ten Dijke P, t Hoen PA, Hoogaars WM. 2012. Cell-type specific regulation of myostatin signaling. *FASEB J* 26:1462–1472.
- Lee YJ, Hong KH, Yun J, Oh SP. 2006. Generation of activin receptor type IIB isoform-specific hypomorphic alleles. *Genesis* 44:487–494.
- Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R. 1986. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 321:779–782.
- Matzuk MM, Kumar TR, Bradley A. 1995. Different phenotypes for mice deficient in either activins or activin receptor type II. *Nature* 374:356–360.
- Oh SP, Li E. 1997. The signaling pathway mediated by the type IIB activin receptor controls axial patterning and lateral asymmetry in the mouse. *Genes Dev* 11:1812–1826.
- Oh SP, Yeo C, Lee Y, Schrewe H, Whitman M, Li E. 2002. Activin type IIA and IIB receptors mediate Gdf11 signaling in axial vertebral patterning. *Genes Dev* 16:2749–2754.
- Qiu W, Li X, Tang H, Huang AS, Panteleyev AA, Owens DM, Su GH. 2011. Conditional activin receptor type 1B (*Acvr1b*) knockout mice reveal hair loss abnormality. *J Invest Dermatol* 131:1067–1076.

- Roberts VJ, Barth SL. 1994. Expression of messenger ribonucleic acids encoding the inhibin/activin system during mid- and late-gestation rat embryogenesis. *Endocrinology* 134:914-923.
- Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, Sequerra R, Kasper J, Ayala R, Stewart AF, Dymecki SM. 2000. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet* 25:139-140.
- Smith JC, Armes NA, Conlon FL, Tada M, Umbhauer M, Weston KM. 1997. Upstream and downstream from Brachyury, a gene required for vertebrate mesoderm formation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 62:337-346.
- Song J, Oh SP, Schrewe H, Nomura M, Lei H, Okano M, Gridley T, Li E. 1999. The type II activin receptors are essential for egg cylinder growth, gastrulation, and rostral head development in mice. *Dev Biol* 213:157-169.
- Su GH, Bansal R, Murphy KM, Montgomery E, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. 2001. ACVR1B (ALK4, activin receptor type1B) gene mutations in pancreatic carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3254.
- Sulyok S, Wankell M, Alzheimer C, Werner S. 2004. Activin: An important regulator of wound repair, fibrosis, and neuroprotection. *Mol Cell Endocrinol* 225:127-132.
- Ten Dijke P, Ichijo H, Franzen P, Schulz P, Saras J, Toyoshima H, Heldin CH, Miyazono K. 1993. Activin receptor-like kinases: A novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity. *Oncogene* 8:2879-2887.
- Ventura A, Kirsch DG, McLaughlin ME, Tuveson DA, Grimm J, Lintault L, Newman J, Reczek EE, Weissleder R, Jacks T. 2007. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature* 445:661-665.
- Wang J, Kumar RM, Biggs VJ, Lee H, Chen Y, Kagey MH, Young RA, Abate-Shen C. 2011. The Msx1 homeoprotein recruits polycomb to the nuclear periphery during development. *Dev Cell* 21:575-588.
- Windelinckx A, De Mars G, Huygens W, Peeters MW, Vincent B, Wijmenga C, Lambrechts D, Delecluse C, Roth SM, Metter EJ, Ferrucci L, Aerssens J, Vlietinck R, Beunen GP, Thomis MA. 2011. Comprehensive fine mapping of chr12q12-14 and follow-up replication identify activin receptor 1B (ACVR1B) as a muscle strength gene. *Eur J Hum Genet* 19:208-215.
- Xia Y, Schneyer AL. 2009. The biology of activin: recent advances in structure, regulation and function. *J Endocrinol* 202:1-12.
- Yeo C, Whitman M. 2001. Nodal signals to Smads through Cripto-dependent and Cripto-independent mechanisms. *Mol Cell* 7:949-957.
- Zhou X, Wang JL, Lu J, Song Y, Kwak KS, Jiao Q, Rosenfeld R, Chen Q, Boone T, Simonet WS, Lacey DL, Goldberg AL, Han HQ. 2010. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell* 142:531-543.

V. Activation du TGF β latent par le domaine « Fibrinogen-like » de la Ténascine X

Tenascin-X promotes epithelial-to-mesenchymal transition by activating latent TGF- β .

Lindsay B. Alcaraz, Jean-Yves Exposito, Nicolas Chuvin, Roxane M. Pommier, Caroline Cluzel-Grangeasse, Sylvie Martel, Stéphanie Sentis, Laurent Bartholin, Claire Lethias, Ulrich Valcourt.

J. Cell Biol. (2014). 205(3), 409-28.

Tenascin-X promotes epithelial-to-mesenchymal transition by activating latent TGF- β

Lindsay B. Alcaraz,^{1,2,4,5,6} Jean-Yves Exposito,^{3,4,5} Nicolas Chuvin,^{1,2,4,5,6} Roxane M. Pommier,^{1,2,4,5,6} Caroline Cluzel,^{3,4,5} Sylvie Martel,^{1,2,4,5,6} Stéphanie Sentis,^{1,2,4,5,6,7} Laurent Bartholin,^{1,2,4,5,6} Claire Lethias,^{3,4,5} and Ulrich Valcourt^{1,2,4,5,6}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U1052, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France

²Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 5286, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, F-69000 Lyon, France

³Institut de Biologie et Chimie des Protéines, FR3302, CNRS UMR 5305, F-69367 Lyon, France

⁴Université de Lyon, F-69000 Lyon, France

⁵Université Lyon 1, F-69000 Lyon, France

⁶Centre Léon Bérard, F-69000 Lyon, France

⁷Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Faculté de Pharmacie de Lyon, F-69000 Lyon, France

Transforming growth factor β (TGF- β) isoforms are secreted as inactive complexes formed through non-covalent interactions between the bioactive TGF- β entity and its N-terminal latency-associated peptide prodomain. Extracellular activation of the latent TGF- β complex is a crucial step in the regulation of TGF- β function for tissue homeostasis. We show that the fibrinogen-like (FBG) domain of the matrix glycoprotein tenascin-X (TNX) interacts physically with the small latent TGF- β complex *in vitro* and *in vivo*, thus regulating the bioavailability of mature

TGF- β to cells by activating the latent cytokine into an active molecule. Activation by the FBG domain most likely occurs through a conformational change in the latent complex and involves a novel cell adhesion-dependent mechanism. We identify $\alpha 11\beta 1$ integrin as a cell surface receptor for TNX and show that this integrin is crucial to elicit FBG-mediated activation of latent TGF- β and subsequent epithelial-to-mesenchymal transition in mammary epithelial cells.

Introduction

Dynamic cross talk between cells and the surrounding ECM is essential to tissue homeostasis (Nelson and Bissell, 2006). The ECM is a network of highly organized macromolecules that are generally large and complex, with multiple distinct domains arranged with specific juxtapositions. Some of these domains interact with cell surface receptors, such as integrins, which mediate cell–matrix adhesion and signal transduction into cells (Kim et al., 2011). Matrix molecules can also interact with cell–surface growth factor receptors or sequester growth factors in the ECM and activate them when needed (Hynes, 2009). The ECM thus acts as an epigenetic informational entity capable of integrating various extracellular cues so as to regulate multiple cell phenotypes and behaviors (Kim et al., 2011).

The glycoprotein tenascin-X (TNX) is an example of a matrix protein with such a structural and informational role. It belongs to the tenascin family, whose members (TNC, TNR, TNX, and TNW) share a similar domain pattern: an N-terminal assembly domain allowing tenascin oligomerization followed by a series of EGF-like domains, a variable number of FNIII (fibronectin type III) modules, and a C-terminal fibrinogen-like (FBG) domain (Tucker et al., 2006). TNX is a disulfide-linked trimeric protein found in numerous adult tissues. This protein has been shown to interact with ECM components, such as fibrillar (types I, III, and V) and fibril-associated (types XII and XIV) collagens, and the small proteoglycan decorin (Elefteriou et al., 2001; Lethias et al., 2006; Veit et al., 2006; Egging et al., 2007a). Its impact in ECM network formation and three-dimensional collagen matrix stiffness (Margaron et al., 2010) is supported by the symptoms of the TNX deficiency-related Ehlers–Danlos syndrome, a human

L. Bartholin, C. Lethias, and U. Valcourt contributed equally to this paper.

Correspondence to Ulrich Valcourt: ulrich.valcourt@lyon.unicancer.fr

Abbreviations used in this paper: EMT, epithelial-to-mesenchymal transition; FBG, fibrinogen-like; LAP, latency-associated peptide; MMP, matrix metalloproteinase; NMuMG, normal murine mammary gland; SLC, small latent complex; TNX, tenascin-X; TRE, TGF- β -responsive element; TSP-1, thrombospondin 1.

© 2014 Alcaraz et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons license (Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

Supplemental Material can be found at:
<http://jcb.rupress.org/content/suppl/2014/05/09/jcb.201308031.DC1.html>

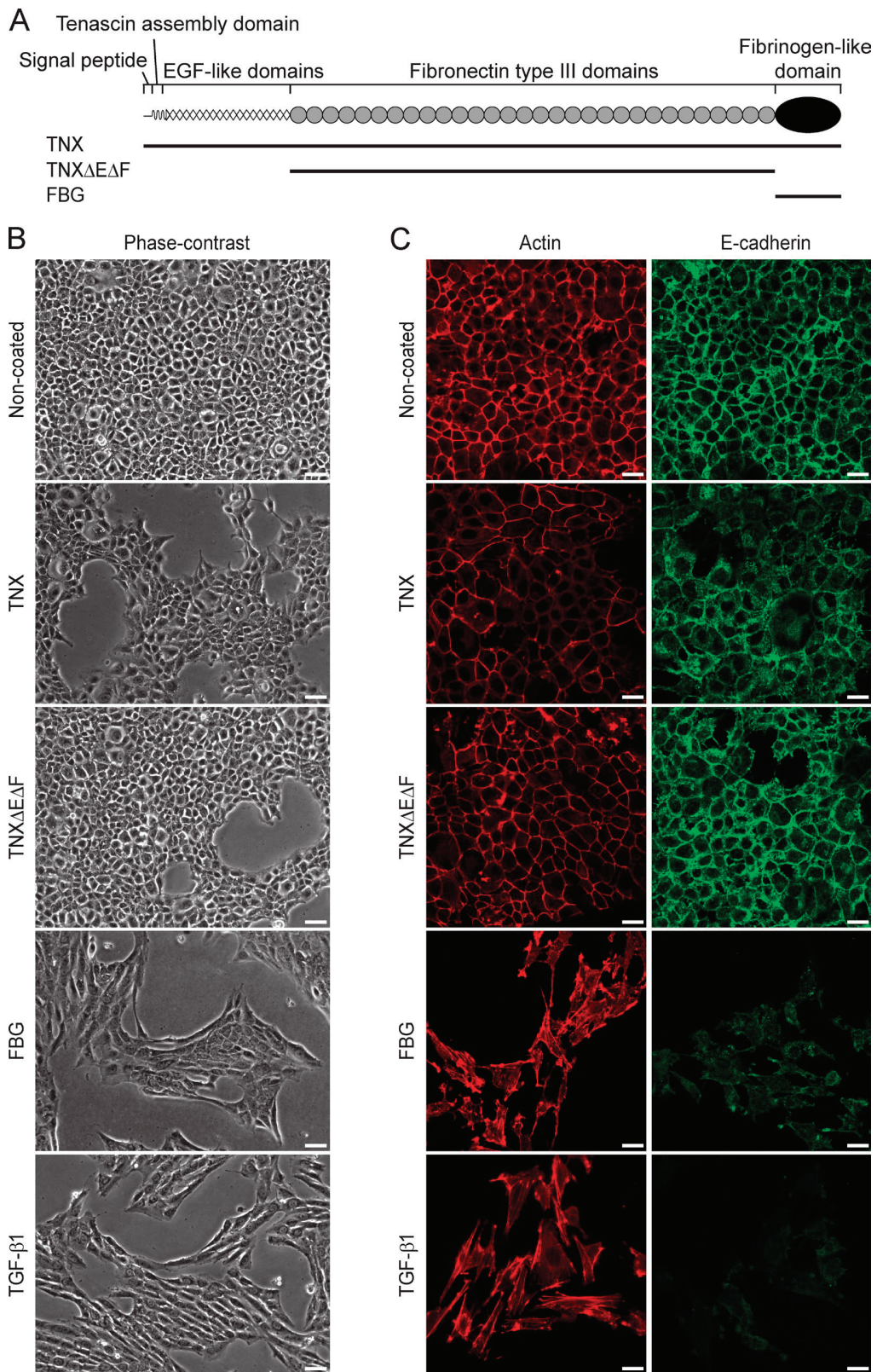


Figure 1. **Recombinant TNX fragments differentially regulate EMT in mammary epithelial cells.** (A) The recombinant TNX fragments (solid lines) are depicted below the schematic diagram representing the full-length TNX monomer. (B) Phase-contrast images of NMuMG cells cultured for 48 h either in the presence of soluble recombinant human TGF- β 1 (2 ng/ml) or after seeding onto noncoated dishes or dishes coated (111 μ mol/cm²) with recombinant full-length TNX, TNX Δ E Δ F fragment, or FBG domain. Bars, 30 μ m. (C) F-actin direct fluorescence and E-cadherin indirect immunofluorescence were performed in NMuMG cells cultured as described in B. Bars, 15 μ m.

heritable disorder characterized mainly by joint laxity and skin hyperextensibility (Schalkwijk et al., 2001). TNX has also been described as a matricellular protein, i.e., a protein modulating cell–matrix interactions. It interacts with cells via two main adhesion sites: a heparin binding site comprising two adjacent FNIII modules, which is a putative ligand for heparan sulfate proteoglycan receptors (Lethias et al., 2001), and the C-terminal FBG domain, which is the major cell adhesion site of the whole molecule and involves an unidentified β 1-containing integrin receptor (Elefteriou et al., 1999). TNX has also been shown to regulate cell adhesion/deadhesion (Fujie et al., 2009) and thus to inhibit cell spreading in vitro (Elefteriou et al., 1999). In orthotopic experiments conducted on wild-type and TNX-deficient mice, TNX was found to restrain tumor cell invasion and metastasis formation in vivo (Matsumoto et al., 2001). The mechanisms by which TNX exerts these biological activities are not well understood.

To gain further insights into the molecular and cellular mechanisms through which TNX regulates cell invasion and migration, we focused on epithelial cell plasticity. Indeed, several ECM molecules have been shown to induce the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), a cell process allowing conversion of polarized, adherent epithelial cells into motile, mesenchymal-like cells (Thiery et al., 2009). For instance, type I collagen induces EMT by regulating diverse signaling cues (Koenig et al., 2006; Shintani et al., 2006, 2008a) and notably the TGF- β pathway (Shintani et al., 2008b; DeMaio et al., 2012).

TGF- β family members (TGF- β 1, 2, and 3) are synthesized as proproteins and form disulfide-linked homodimers that are proteolytically processed before secretion. Upon cleavage, the prodomain, called the latency-associated peptide (LAP), remains noncovalently bound to the mature (bioactive) TGF- β moiety, maintaining it in a latent state by inhibiting its exposure to cell surface receptors (Moustakas and Heldin, 2009; Wu and Hill, 2009). Latent TGF- β can be found as a soluble entity, called the small latent complex (SLC; Miyazono et al., 1991), but it is also secreted as a large latent complex in which the SLC is covalently bound to a latent TGF- β -binding protein (Miyazono et al., 1991). In some physiological or pathological contexts, mature TGF- β is released from the latent complex, a process called latent TGF- β activation. The mechanisms described for latent TGF- β activation (ten Dijke and Arthur, 2007) include proteolytic cleavage of the LAP and release of TGF- β (Mu et al., 2002) and/or a conformational change in the LAP, allowing exposure of the TGF- β entity. Depending on the cell context, the latter mechanism might involve either various cell surface receptors, such as RGD-dependent integrins (Wipff and Hinz, 2008), or the ECM protein thrombospondin 1 (TSP-1; Schultz-Cherry and Murphy-Ullrich, 1993). Once activated, mature TGF- β initiates a signal via the type I (T β RI) and the type II (T β RII) transmembrane serine/threonine kinase TGF- β receptors. T β RII propagates signals by phosphorylating the T β RI receptor. Activated T β RI phosphorylates and activates Smad2 and Smad3 proteins, which then interact with Smad4. This complex then translocates into the nucleus and binds to the chromatin to regulate TGF- β -responsive genes (Massagué, 2012). As an alternative to this canonical signaling pathway, TGF- β receptors can propagate signals via other intracellular routes (MAPK,

phosphoinositide 3-kinase, and RhoA) to elicit regulation of other sets of genes (Kang et al., 2009).

In this study, we analyze how full-length TNX and individual domains of this matricellular protein might affect the regulation of epithelial cell plasticity. We show that the C-terminal FBG domain of TNX triggers an EMT in mammary epithelial cells by stimulating TGF- β signaling activity. We demonstrate that this domain physically interacts with the SLC complex, thereby further activating the latent cytokine into a bioactive molecule. This FBG-mediated activation most likely occurs through a conformational change in the latent complex and involves a novel cell adhesion-dependent mechanism. Indeed, we identify α 1 β 1 integrin as a cell receptor for TNX and show that this integrin is crucial to FBG-triggered TGF- β activation and subsequent EMT.

Results

The FBG domain of TNX induces EMT in mammary epithelial cells

The full-length recombinant TNX protein and various fragments thereof used in this study (Fig. 1 A) were produced in mammalian cells and purified (Fig. S1 A) as previously described (Lethias et al., 2001, 2006). To explore whether TNX regulated epithelial cell plasticity, we first compared the phenotype of normal murine mammary gland (NMuMG) epithelial cells seeded onto noncoated dishes (control) or dishes coated with recombinant full-length TNX. In the control condition, epithelial cells adopted a cuboidal shape and formed compact colonies with established cell–cell contacts, as shown by phase-contrast microscopy (Fig. 1 B). In contrast, NMuMG cells seeded onto full-length TNX displayed an altered epithelial morphology, some of them adopting an elongated shape (Fig. 1 B). To determine which TNX domain was responsible for the cell shape changes, we analyzed the morphology of NMuMG cells seeded onto dishes coated with equimolar amounts of TNX fragments, either a derivative consisting only of the FNIII domains (TNX Δ E Δ F) or the C-terminal FBG domain (Fig. 1 A). Cells seeded onto TNX Δ E Δ F protein-coated culture dishes maintained a cuboidal shape and cell–cell contacts (Fig. 1 B). However, NMuMG cells seeded onto the FBG domain or in the presence of TGF- β 1, a potent inducer of EMT (Valcourt et al., 2005), adopted an elongated morphology, lost their close contacts, and scattered (Fig. 1 B). EMT in the presence of the FBG domain was confirmed by the rearrangement of actin cytoskeleton into stress fibers and the loss of E-cadherin from adherens junctions (Fig. 1 C). Concomitantly, quantitative gene expression analyses revealed a decrease of epithelial cell markers (*E-cadherin*, *Keratin-19*, and *Mucin-1*) and a gain of mesenchymal cell markers (*N-cadherin*, *Vimentin*, and *Fibronectin-1*), as well as of EMT inducers (*Hmga2*, *Snail1*, and *Zeb1*), when cells were seeded onto the FBG domain (Fig. S1 B). Immunoblotting analyses confirmed the decrease of E-cadherin and the increase of N-cadherin (Fig. S1 C). Recombinant TGF- β 1 gave similar results to the FBG domain (Figs. 1 C and S1, B and C). Interestingly, the EMT process was milder in the presence of the full-length TNX, as only a partial loss of actin and E-cadherin was observed at cell–cell junctions (Fig. 1 C). Moreover, only a decrease of epithelial markers, but not a gain of mesenchymal ones or EMT

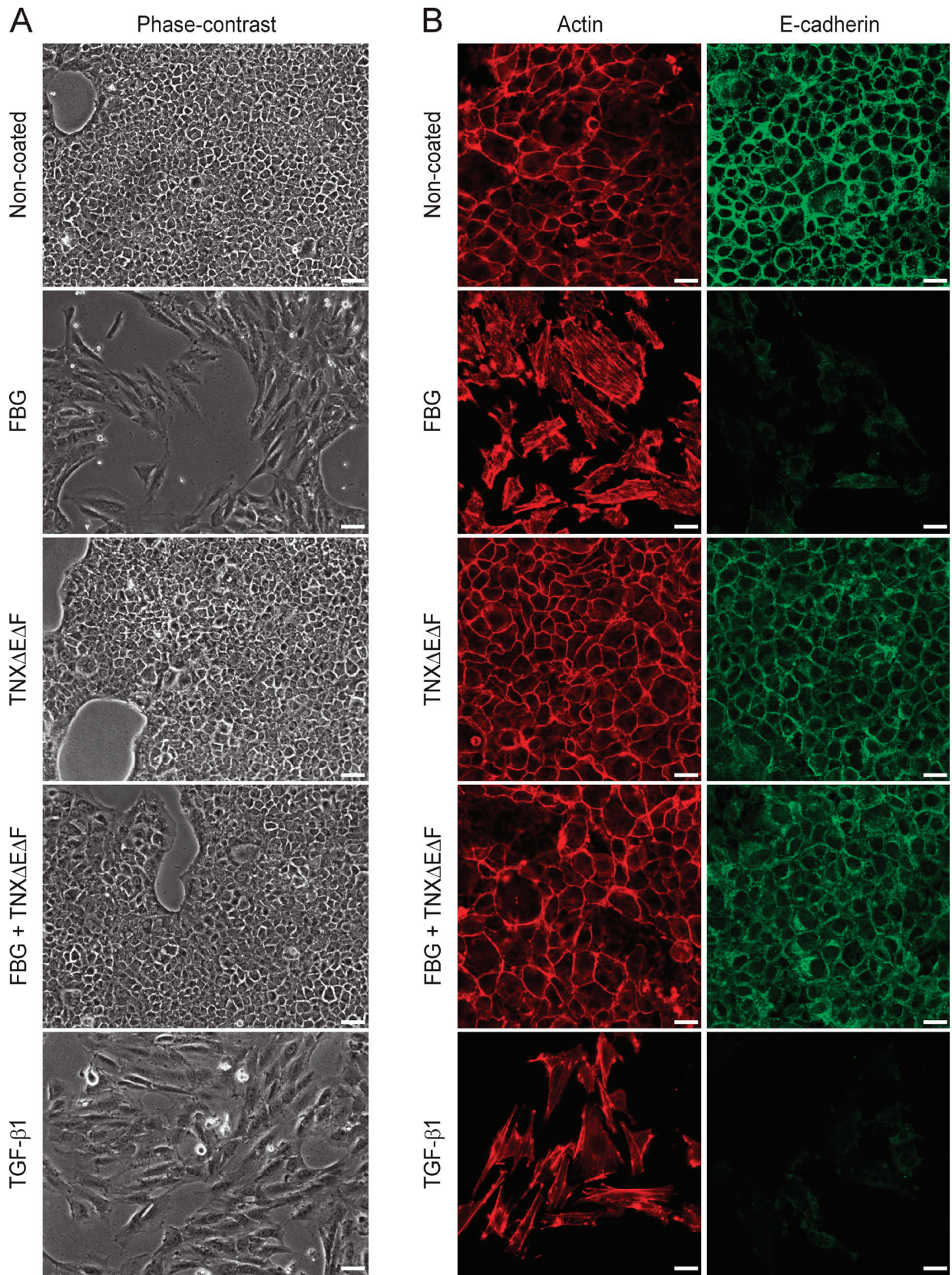


Figure 2. **The FNIII repeats of TNX molecule inhibit the EMT induced by the FBG domain in mammary epithelial cells.** (A) Phase-contrast images of NMuMG cells cultured for 48 h either in the presence of soluble recombinant human TGF- β 1 (2 ng/ml) or after seeding onto noncoated dishes or dishes coated (111 pmol/cm²) with the TNX Δ E Δ F fragment, the FBG domain, or both recombinant proteins. Bars, 30 μ m. (B) F-actin direct fluorescence and E-cadherin indirect immunofluorescence were performed in NMuMG cells cultured as described in A. Bars, 15 μ m.

inducers, was seen in the presence of the full-length TNX (Fig. S1, B and C). In contrast, NMuMG cells remained fully epithelial when seeded onto the TNX Δ E Δ F protein, as judged by the overall analyses of the markers (Figs. 1 C and S1, B and C).

As full-length TNX caused a milder EMT response compared with the FBG domain, recombinant proteins being used in an immobilized (Fig. 1, B and C) or a soluble form (Fig. S2 A), we then determined whether the FNIII repeat-containing region (TNX Δ E Δ F fragment) could negatively regulate the activity induced by the FBG domain comprised in the native TNX molecule. Compared with the FBG domain alone, the scattering of NMuMG cells was fully abolished when dishes were coated with equimolar quantities of both TNX Δ E Δ F and FBG proteins, as observed by phase-contrast microscopy (Fig. 2 A). Analyses of epithelial and mesenchymal markers clearly indicated that the TNX Δ E Δ F fragment inhibited the FBG-induced EMT (Figs. 2 B and S2 B). Altogether, these experiments show that the FBG domain of TNX is able to cause an EMT when acting as a separate entity but that the FNIII repeats exert an inhibitory activity over the FBG domain when contained in the intact TNX.

The FBG domain activates the TGF- β -Smad signaling pathway

Because the FBG domain triggered an EMT response almost as potent as TGF- β in NMuMG cells, we investigated whether this TNX domain stimulated the TGF- β signaling pathway. SB431542, a T β RI kinase inhibitor (Inman et al., 2002), completely abolished the EMT response induced by recombinant human TGF- β 1 or the coated FBG domain in NMuMG cells, as judged by the epithelial morphology and the F-actin staining at the vicinity of cell junctions (Fig. 3 A). The FBG domain thus causes EMT by stimulating the TGF- β signaling pathway. Moreover, immobilized FBG domain or recombinant TGF- β 1 led to a marked increase of the transcriptional activity of an artificial TGF- β -responsive element (TRE) reporter construct (TRE-Luc [luciferase]) in stably transfected human mammary epithelial (MCF10A) cells (Fig. 3 B). These transcriptional responses were sensitive to SB431542 (Fig. 3 B). These results confirm that the TGF- β signaling pathway is stimulated upon cell exposure to the FBG domain.

To confirm whether the FBG domain activated the canonical Smad pathway, we monitored the phosphorylation status of Smad2 in NMuMG cells over time (Fig. 3 C). NMuMG cells seeded onto the coated FBG domain displayed phosphorylation of the two C-terminal serine residues of Smad2, whereas cells seeded onto noncoated dishes showed no phosphorylated Smad2. Interestingly, this experiment showed strong phosphorylation of Smad2 as early as 1 h after seeding, at which time cells were starting to adhere to the coated FBG domain, and the phospho-Smad2 signal remained high, although gradually decreasing after 3 h (Fig. 3 C). As expected, the SB431542 inhibitor fully abolished the FBG-induced Smad2 phosphorylation (Fig. 3 D). Likewise, adenovirus-mediated overexpression of Smad7, a natural inhibitor of Smad signaling (Nakao et al., 1997), impaired both TGF- β 1- and FBG-induced phosphorylation of Smad2 (Fig. S3 A) and prevented the FBG domain from inducing EMT in NMuMG cells, as observed by phase-contrast microscopy (Fig. S3 B) and the impaired decrease of *E-cadherin* gene expression (Fig. S3 C).

Altogether, these results indicate that, in mammary epithelial cells, the FBG domain of TNX activates the TGF- β -Smad signaling pathway to elicit EMT.

The FBG domain of TNX regulates the bioavailability of mature TGF- β

The induction of TGF- β signaling by the FBG domain did not require protein synthesis because the presence of the translation inhibitor cycloheximide did not impair Smad2 phosphorylation triggered by the FBG domain or mature TGF- β 1 (Fig. 4 A). To test the hypothesis that the FBG domain might exert its effects by increasing the bioavailability of mature TGF- β to cell surface receptors, we analyzed the effects of the FBG domain on the TGF- β signaling pathway in the presence of a neutralizing anti-TGF- β 1/2/3 antibody directed against the active TGF- β entity. In mammary epithelial cells, the blocking antibody significantly compromised Smad2 phosphorylation (Fig. 4 B) and subsequent reporter gene activity (Fig. 4 C) induced by either soluble mature TGF- β 1 or the coated FBG domain, as compared with control IgG. This anti-pan-TGF- β antibody also fully abolished the EMT response (*E-cadherin* internalization and actin stress fiber formation) that was induced by mature TGF- β 1 and the FBG domain in NMuMG cells (Fig. 4 D). Altogether, these results suggest that the TNX FBG domain induces Smad signaling by increasing the bioavailability of mature TGF- β .

The FBG domain of TNX interacts physically with the SLC

As the recombinant FBG domain was produced in mammalian cells and secreted into the conditioned medium, we tested whether endogenously synthesized TGF- β might have copurified along with this TNX domain, using an immunoassay detecting mature TGF- β 1. As shown in Fig. 5 A, FBG-enriched fractions displayed a weak, but nonnegligible, signal for mature TGF- β 1. When these fractions were subjected to physicochemical conditions known to activate latent TGF- β , i.e., heat denaturation and acid treatment (Brown et al., 1990), the signal was much higher (Fig. 5 A). Interestingly, mature TGF- β 1 reactivity was also associated with the intact TNX molecule, whereas almost no signal was detected in fractions containing the recombinant TNX lacking the FBG domain (TNX Δ E Δ F; Fig. 5 A). These results suggest that the purified recombinant proteins comprising, or consisting solely of, the FBG domain contain latent TGF- β molecules that can be activated under certain physical conditions. Immunoblotting performed on the purified full-length TNX and FBG proteins confirmed the presence of both the mature TGF- β 1 and the LAP(β 1) entities (Fig. 5 B). Conversely, almost no signal was detected for LAP and the mature TGF- β 1 on purified TNX Δ E Δ F protein (Fig. 5 B). This experiment confirmed that the FBG domain of TNX could associate with the SLC not only as a soluble entity but also when comprised in the intact TNX. Moreover, the coated or soluble full-length TNX, but not the TNX Δ E Δ F fragment, also stimulated mature TGF- β bioavailability, as shown by the induction of Smad2 phosphorylation in NMuMG cells (Figs. 5 C and S3 D). This result suggests that the weak alteration of epithelial cell morphology induced by the native TNX also relies on TGF- β -Smad signaling.

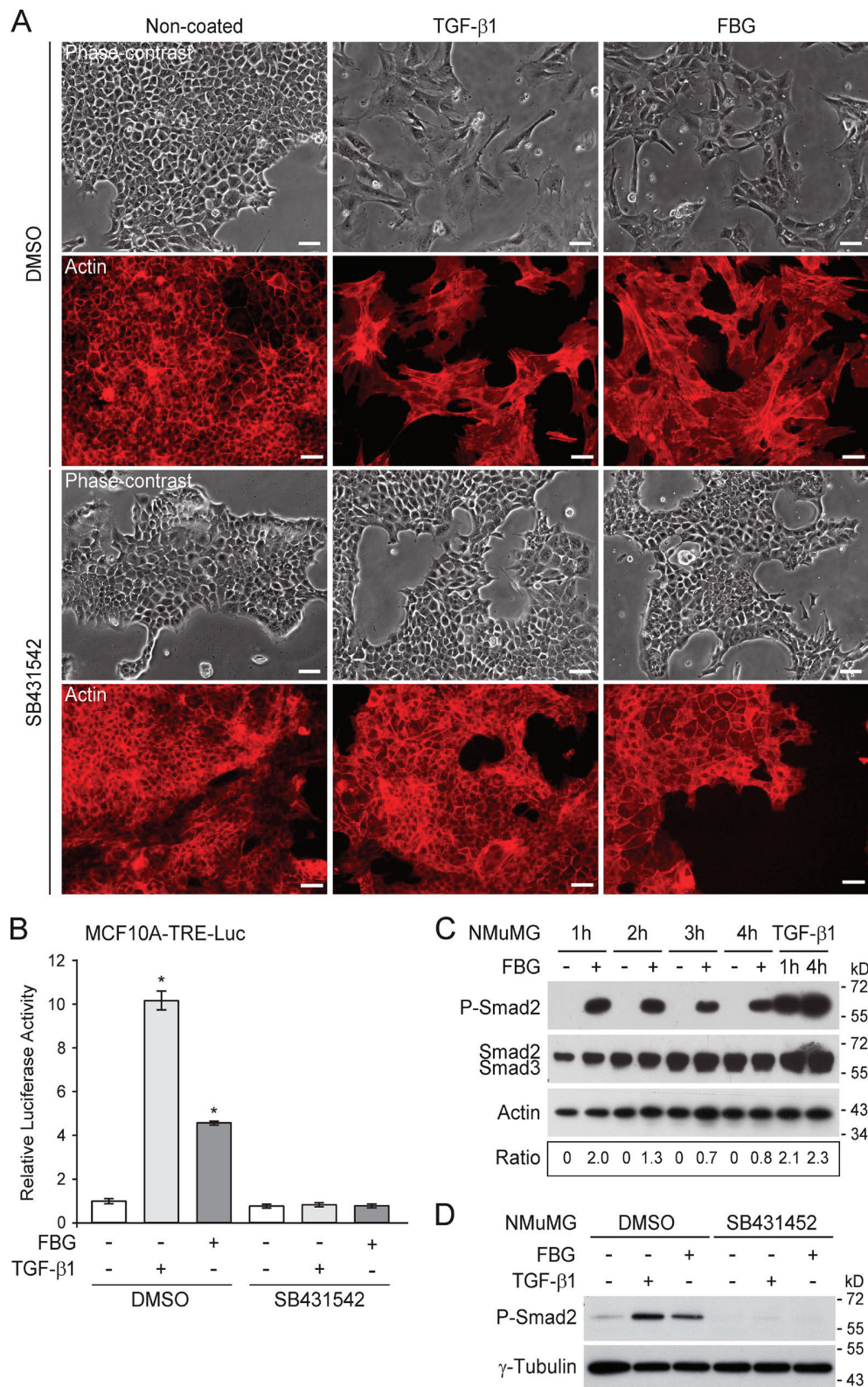


Figure 3. The FBG domain of TNX stimulates the TGF-β-Smad signaling pathway. (A) Phase-contrast microscopy (top) and F-actin direct fluorescence (bottom) applied to NMuMG cells cultured for 36 h on noncoated or 222 pmol/cm² FBG-coated dishes, or stimulated with 5 ng/ml of soluble TGF-β1, in the presence of 10 μM SB431542 or vehicle (DMSO). Bars, 30 μm. (B) Firefly luciferase activity in MCF10A-TRE-Luc cells cultured for 16 h as described in A. *, P < 0.05 versus control condition. Error bars are means ± SD. (C) Immunoblot analyses showing levels of phosphorylated Smad2 (P-Smad2) and total Smad2/3 in NMuMG cells cultured in noncoated (-) or 222 pmol/cm² FBG-coated (+) dishes or stimulated with 5 ng/ml of mature TGF-β1 for the indicated time. Ratio of phospho-Smad2 to total Smad2/3 levels is indicated below. (D) Phospho-Smad2 levels in NMuMG cells cultured for 3 h as described in A.

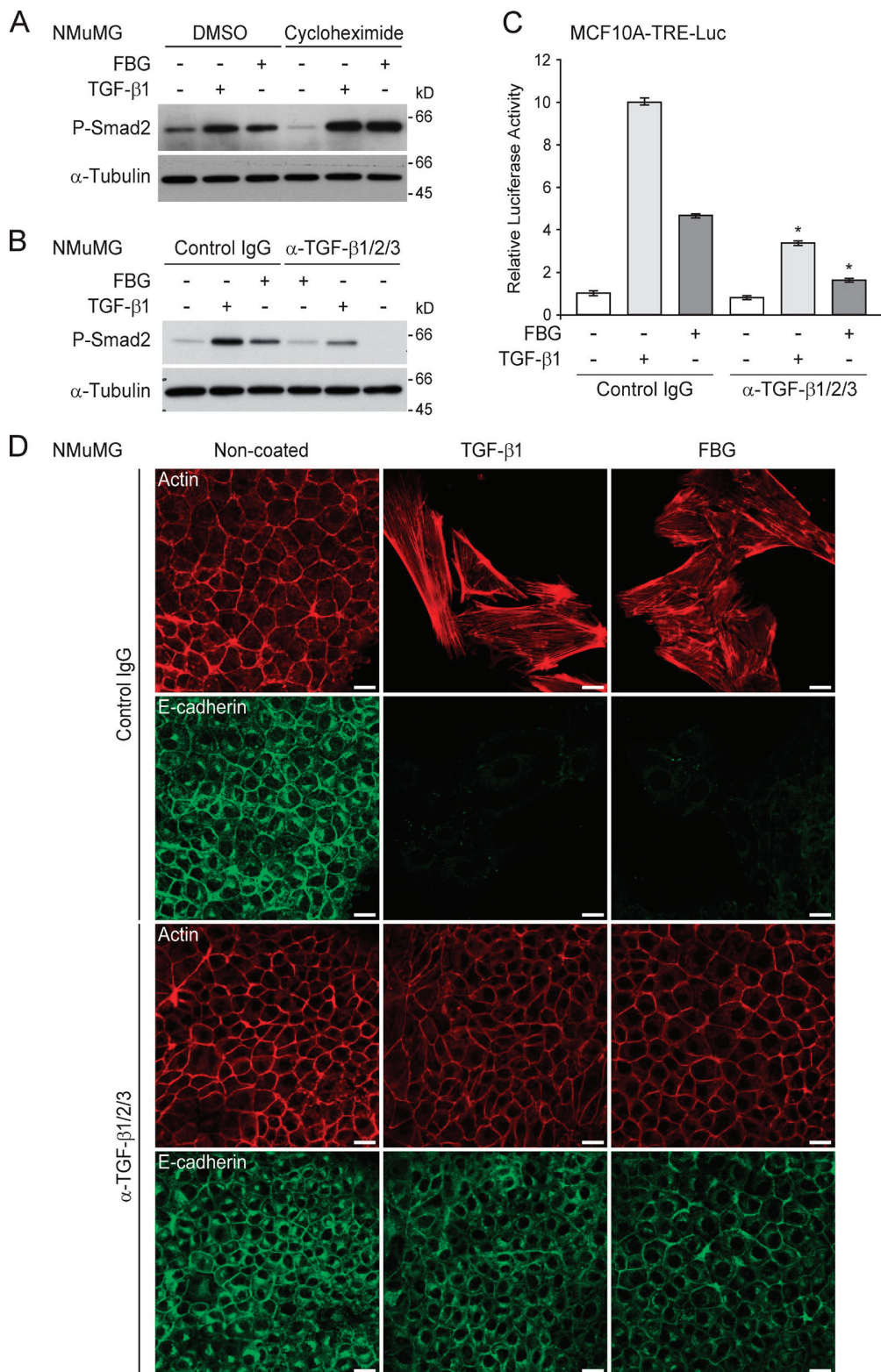


Figure 4. **The FBG domain of TNX activates latent TGF- β in vitro.** (A) Immunoblots showing phospho-Smad2 (P-Smad2) levels in NMuMG cells incubated for 3 h on either noncoated (-) or 222 pmol/cm² FBG-coated (+) dishes or stimulated for 3 h with 5 ng/ml of soluble human TGF- β 1 in the presence of 10 μ g/ml cycloheximide or the corresponding vehicle (DMSO). (B) Immunoblots showing levels of phospho-Smad2 in NMuMG cells incubated for 3 h on either noncoated (-) or 222 pmol/cm² FBG-coated (+) dishes or stimulated for 3 h with 5 ng/ml TGF- β 1 in the presence of a control IgG or 10 μ g/ml anti-pan-TGF- β antibody. (C) Firefly luciferase activity in MCF10A-TRE-Luc cells cultured for 16 h under the same conditions as described in B. *, P < 0.05 versus control IgG. Error bars are means \pm SD. (D) F-actin direct fluorescence (top) and indirect immunofluorescence staining of E-cadherin (bottom) performed in NMuMG cells cultured for 36 h under the same conditions as described in B. Bars, 15 μ m.

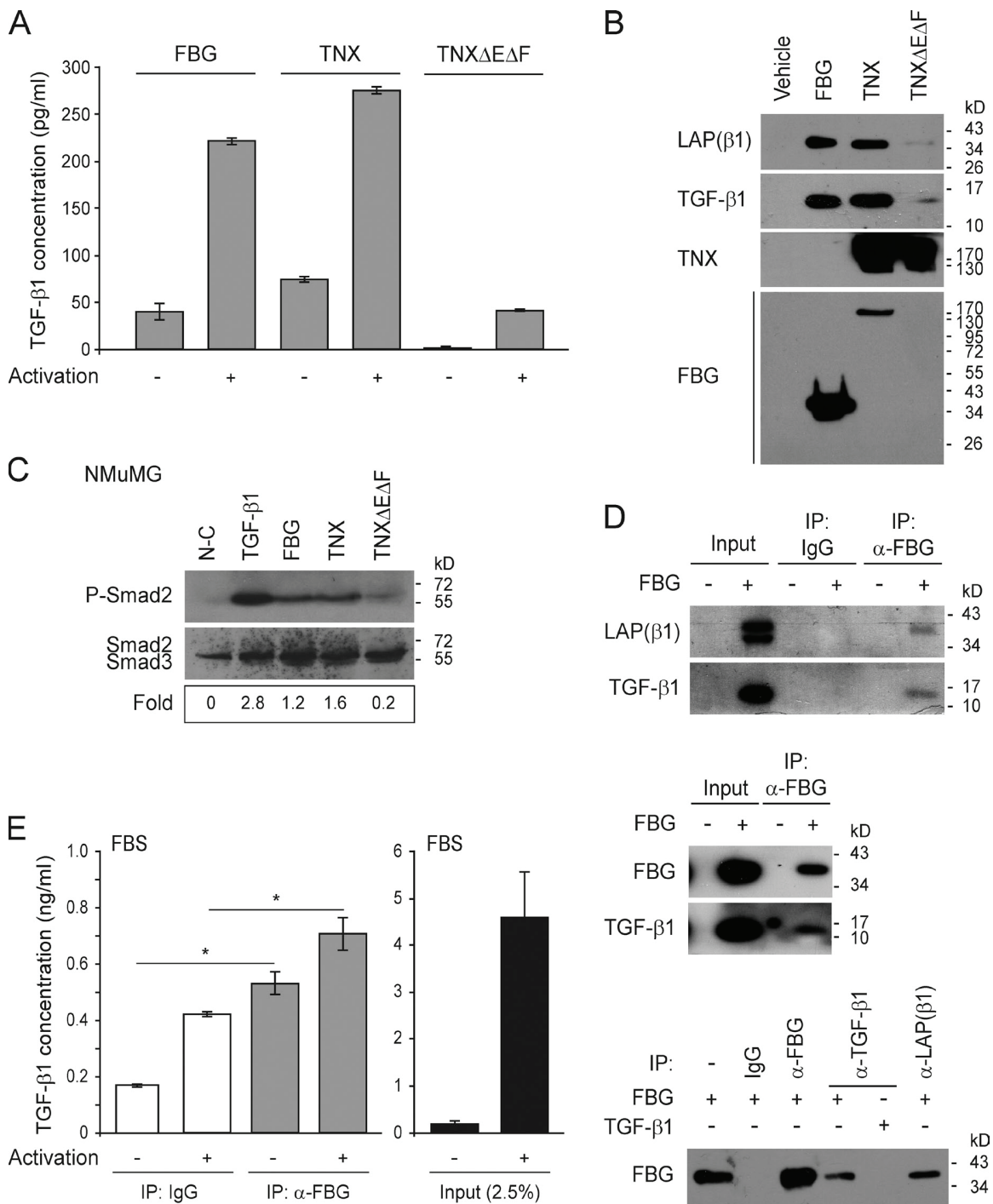


Figure 5. The FBG domain of TNX interacts physically with the SLC in vitro and in vivo. (A) Quantitative (ELISA) analysis of mature human TGF-β1 associated with equimolar concentrations (111 nM) of purified recombinant FBG domain, full-length TNX, or TNXΔEΔF fragment, subjected (+) or not subjected (-) to conditions activating latent TGF-β (heat and acid treatments). (B) Levels of mature human TGF-β1 and of its LAP(β1) propeptide associated with equimolar concentrations (111 nM) of purified recombinant FBG domain, full-length TNX, or TNXΔEΔF protein were determined by immunoblotting. The monoclonal anti-TNX antibody recognizes the 10th FNIII domain. (C) Levels of phospho-Smad2 (P-Smad2) in NMuMG cells cultured for 3 h on noncoated dishes (N-C) or dishes coated with the different recombinant TNX variants (111 pmol/cm²) or stimulated with 5 ng/ml of soluble TGF-β1. Ratio of phospho-Smad2 to total Smad2/3 levels is indicated below. (D) Coimmunoprecipitation of the mature TGF-β1 entity and of its LAP(β1) propeptide with the purified recombinant FBG domain. Immunoprecipitations were performed with anti-FBG (α-FBG), anti-human TGF-β1 (α-TGF-β1), or anti-human LAP(β1) antibodies or with control IgG. (E) Quantitative detection (ELISA) of mature TGF-β1 associated with the FBG domain of bovine TNX immunoprecipitated from FBS with either anti-FBG domain (α-FBG) antibody or control IgG. Samples were subjected (+) or not subjected (-) to activating conditions before the ELISA. An FBS fraction corresponding to 2.5% of the total volume used for the immunoprecipitation was also subjected to ELISA. *, P < 0.05. Error bars are means ± SD. IP, immunoprecipitation.

Coimmunoprecipitation experiments using a monoclonal antibody directed against the FBG domain confirmed a physical interaction between this purified TNX domain and the latent TGF- β 1 complex *in vitro*, as we detected both TGF- β 1 and LAP(β 1) (Fig. 5 D). In immunoprecipitates obtained with antibody raised against mature TGF- β 1 or the LAP propeptide, the FBG domain was weakly detected, indicating that the mature cytokine moiety is partially masked within the SLC-FBG complex (Fig. 5 D). To ascertain the biological relevance of this observation, we sought to detect TGF- β 1 interaction with the endogenous FBG domain. As multiple TNX fragments are found in serum (Schalkwijk et al., 2001; Egging et al., 2007b), we immunoprecipitated TNX molecules comprising the C-terminal FBG domain from FBS with the anti-FBG antibody and used an ELISA to detect mature TGF- β 1 associated with the precipitates (Fig. 5 E). Compared with IgG-treated control samples, immunoprecipitated fractions containing the FBG domain showed a significantly higher signal for mature TGF- β 1 under both basal (threefold) and activated (1.7-fold) conditions. These results indicate that the FBG domain present in serum *in vivo* associates physically with the SLC.

FBG domain devoid of TGF- β 1 retains the ability to activate cell-secreted latent TGF- β 1

To obtain an FBG fraction devoid of TGF- β , the recombinant FBG protein was further purified by affinity chromatography performed under alkaline conditions (pH 11), a procedure described to dissociate the TSP-1-TGF- β complex (Murphy-Ullrich et al., 1992; Schultz-Cherry and Murphy-Ullrich, 1993). In contrast to the untreated FBG domain (input condition), the FBG protein purified under alkaline conditions (bound fractions) displayed no signal for mature TGF- β 1 in immunoassays or on immunoblots (Fig. 6 A). TGF- β 1 dissociation from the FBG domain at pH 11.0 was confirmed by the presence of mature TGF- β 1 in the unbound (Fig. 6 A) and wash (not depicted) fractions. These data suggest that the FBG domain and TGF- β 1 can form a complex held together by noncovalent interactions that are disrupted at pH 11. The FBG domain, once stripped of associated TGF- β 1 activity, maintained the ability to form complexes with cell-secreted TGF- β and to induce its activation, as a clear Smad2 phosphorylation was seen in NMuMG cells seeded onto dishes coated with stripped FBG domain (i.e., the bound fraction), in contrast to the cells seeded onto noncoated dishes (Fig. 6 B). This phospho-Smad2 signal was almost as intense as those observed in positive controls, i.e., on dishes coated with the unstripped FBG domain (input) or with unbound and wash fractions obtained after alkaline treatment (Fig. 6 B). Even though alkaline conditions are known to cause cysteine disulfhydryl bond reduction (Hogg, 2003), the FBG-mediated latent TGF- β activation was specific, as alkaline-treated BSA did not show an enhancement of the Smad signaling compared with the untreated BSA (Fig. 6 B). The ability of the FBG domain devoid of TGF- β to activate latent TGF- β and promote subsequent intracellular Smad signaling was confirmed in NMuMG transiently transfected with the (CAGA)₉-Luc reporter construct (Dennler et al., 1998), in which gene transcription was stimulated ninefold in the presence of the stripped

FBG domain, as compared with cells cultured in noncoated dishes (Fig. 6 C).

To obtain a recombinant protein devoid of TGF- β , we eventually produced the FBG domain of TNX in a prokaryotic system and determined whether it could activate exogenous latent TGF- β when presented to cells in a soluble form. Although the bacteria-produced FBG domain did not contain any LAP or TGF- β 1 (FBG*; Fig. 6 D), it induced the phosphorylation of Smad2 in NMuMG cells (Fig. 6 E) and stimulated the transcriptional activation of the TGF- β -responsive promoter in MCF10A-TRE-Luc cells (Fig. 6 F), as potently as the soluble FBG domain produced in mammalian cells. The bacterially expressed FBG domain induced an EMT as observed by the delocalization of E-cadherin from adherens junctions and the partial reorganization of the actin filaments (Fig. 6 G). These experiments conclusively prove that the FBG domain devoid of TGF- β is able to interact with the pool of latent TGF- β secreted by the cells and leads to its activation.

FBG-induced activation of latent TGF- β is a protease-independent process

Proteolytic cleavage of the LAP prodomain is one of the mechanisms allowing latent TGF- β activation (Wipff and Hinz, 2008). We tested the ability of different broad-spectrum protease inhibitors to block latent TGF- β activation in the presence of the FBG domain to examine whether one or more proteolytic events were required for this process. Inhibitors of serine (leupeptin and aprotinin), cysteine (leupeptin and E-64), and aspartyl (pepstatin A) proteases and a matrix metalloproteinase (MMP) inhibitor (GM6001) all failed to prevent Smad2 phosphorylation in the presence of the FBG domain (Fig. 7 A). Hence, the FBG-mediated activation of latent TGF- β does not involve the activity of any of these proteases. Using a reporter assay (Fig. 7 B), we found that TGF- β activation by the FBG domain did not result in the production of a diffusible mature polypeptide, as the medium conditioned by donor NMuMG cells seeded onto the FBG domain failed to induce any luciferase activity in the recipient MCF10A-TRE-Luc reporter cells (Fig. 7 C). In contrast, the medium conditioned by TGF- β 1-treated donor cells did induce luciferase activity in the recipient cells (Fig. 7 C). As expected, donor cells exposed to FBG domain or mature TGF- β 1 displayed a high level of Smad2 phosphorylation (Fig. 7 C). These results suggest that TGF- β activation requires intimate contact of the FBG domain with cells. This conclusion was supported by similar results obtained in co-culture experiments in which soluble molecules were allowed to diffuse from donor cells cultured in coated inserts to reporter cells (Fig. 7, D and E). Altogether, these data indicate that FBG-mediated activation of latent TGF- β is a protease-independent process occurring in the cell vicinity and most likely involving a conformational change in the LAP prodomain to cause local exposure of the mature TGF- β entity.

FBG-induced activation of latent TGF- β does not involve TSP-1 activity

The matricellular protein TSP-1 has been well documented to bind and activate latent TGF- β by triggering a conformational change in the latent complex (Schultz-Cherry and Murphy-Ullrich, 1993;

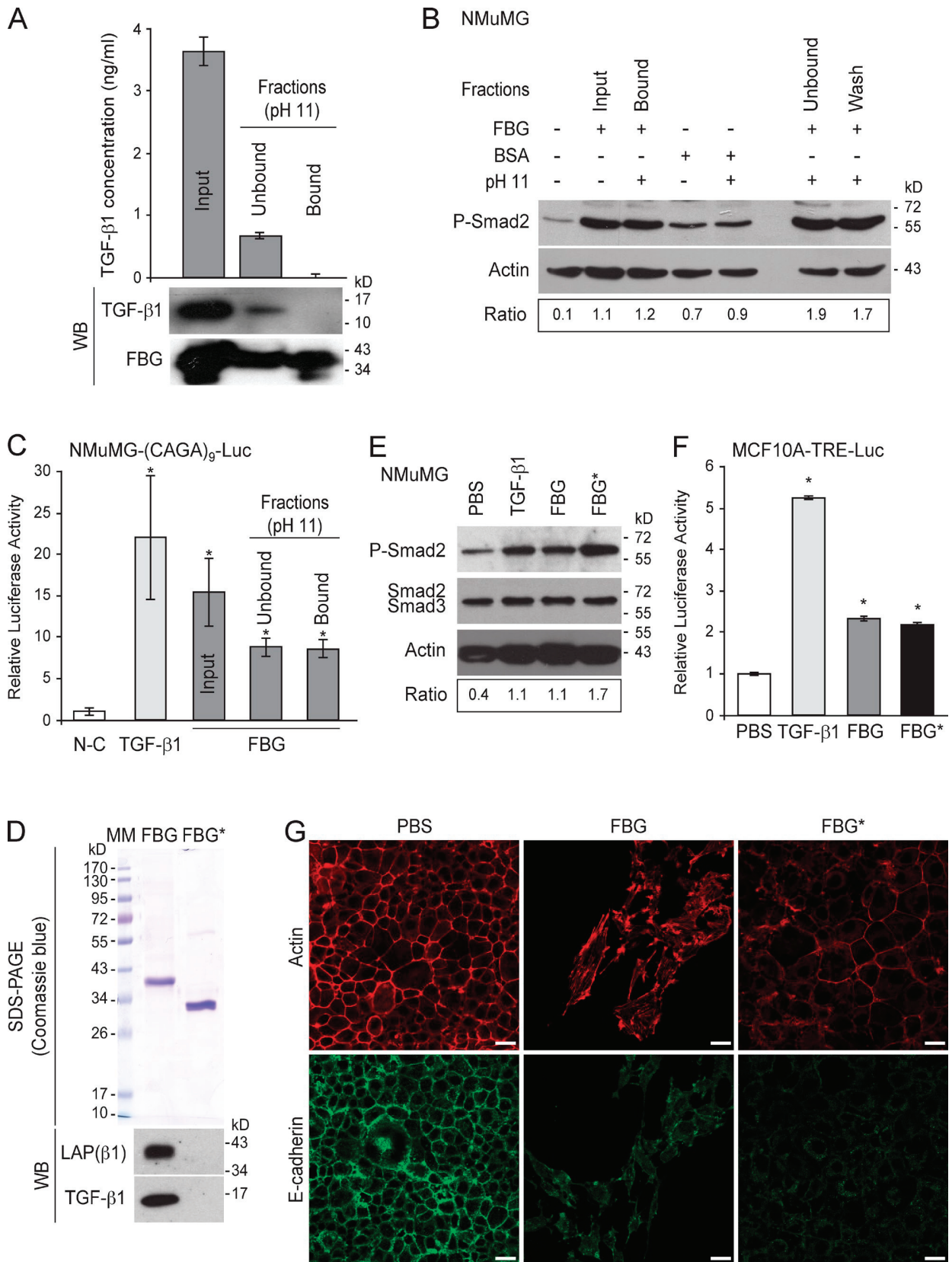


Figure 6. **The FBG domain of TNX devoid of TGF-β activity retains the ability to activate cell-secreted latent TGF-β1.** (A) The FBG domain was stripped of TGF-β1-associated activity under alkaline conditions. (top) ELISA quantitation of total active human TGF-β1 was performed with 2.5 μg protein from untreated FBG domain (input fraction) or from unbound and bound fractions of purified FBG domain under alkaline conditions. (bottom) Immunoblot analyses

Schultz-Cherry et al., 1994). As the TNX FBG domain might interact with TSP-1 in a specific matrix microenvironment, we tested whether TSP-1 was involved in FBG-mediated latent TGF- β activation. Using phospho-Smad2 as a marker for TGF- β activation, we first confirmed that purified TSP-1 could trigger activation of latent TGF- β (Fig. 8, A and C), a process inhibited by TSP-1–neutralizing antibody (Fig. 8 A; Schultz-Cherry and Murphy-Ullrich, 1993) and by competing LSKL peptide (Fig. 8 C; Ribeiro et al., 1999). The scrambled peptide SLLK (Fig. 8 C) did not affect TSP-1–induced activation of latent TGF- β . In contrast, neither the anti–TSP-1 antibody (Fig. 8 B) nor the LSKL peptide (Fig. 8 D) had any effect on the level of phosphorylated Smad2 induced by the FBG domain as compared with the IgG or scrambled peptide control. These results indicate that the FBG domain does not require TSP-1 to activate latent TGF- β .

FBG-induced activation of latent TGF- β requires a cell adhesion receptor but not the action of RGD-dependent integrins

FBG-induced activation of latent TGF- β must either involve an intrinsic activity of this domain or require a cell surface adhesion receptor. To discriminate between these hypotheses, we monitored the TGF- β –Smad signaling activity in the TGF- β reporter Burkitt's lymphoma (BL41-(CAGA)₉-Luc) cell line (Rogier et al., 2005), which did not adhere to the coated FBG domain (Fig. 9 A). Although this cell line did respond to mature TGF- β 1, it displayed no luciferase activity when incubated in the presence of coated FBG domain (Fig. 9 B), suggesting that cell adhesion to the FBG domain must play a crucial role in its mediated activation of latent TGF- β .

A subset of integrins (α v β 3, α v β 5, α v β 6, and α v β 8) has been reported to activate latent TGF- β , through interaction with an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence present at the N termini of the LAP(β 1) and LAP(β 3) prodomains (Wipff and Hinz, 2008). Using two different sets of RGD-containing competitor peptides, we demonstrated that the RGD sequence contained in the LAP and the associated RGD-dependent integrins are not required for activation of latent TGF- β by the FBG domain of TNX (Fig. S4, A–D). These observations were confirmed by the ability of the FBG domain to activate exogenous latent TGF- β 2, an isoform lacking the RGD sequence (Fig. S4 E). Moreover, cytochalasin B–induced F-actin depolymerization did not inhibit TGF- β activation by the FBG domain (Fig. S4, F and G). Thus, cell traction, mediated by an intact cytoskeleton coupled to certain RGD-dependent integrins (Wipff and Hinz, 2008), is

not required for this activation. Collectively, our results indicate that the FBG-mediated activation of latent TGF- β requires a cell adhesion receptor other than an RGD-dependent integrin and does not involve actin-mediated cell traction.

The integrin α 11 β 1, a new cell surface receptor for TNX, is required for activation of latent TGF- β by the FBG domain

It has been previously shown that the FBG domain is the main cell adhesion site on TNX. A β 1 chain–containing integrin emerged as a possible receptor of TNX, but the associated α chain remained unidentified (Elefteriou et al., 1999). To identify the integrin receptor potentially involved in FBG-mediated activation of latent TGF- β , we performed cell adhesion assays coupled to RNA interference–based screening of a subset of α chains known to associate with the β 1 subunit. We found that integrin α 11 β 1 was a cell surface receptor for the FBG domain of TNX. Indeed, knockdown of *ITGA11* gene, encoding the integrin subunit α 11, with two independent shRNA, resulted in a markedly impaired adhesion of HT-1080 cells to the FBG domain as compared with a scrambled shRNA control (Fig. 9 C). This integrin receptor specifically binds to the FBG domain in the intact TNX molecule, as the two shRNA also markedly decreased HT-1080 cell adhesion to the full-length molecule but not to the TNX Δ E Δ F fragment (FNIII repeats; Fig. 9 C). To monitor a direct interaction between the α 11 integrin subunit and the FBG domain, we performed a solid-phase assay using the inserted (I) domain of the α 11 chain fused to the GST. The I domain is closely related to the von Willebrand factor A domain, which mediates binding to native collagens. As expected, the recombinant GST– α 11-I protein interacted with triple-helical, but not denatured, type I collagen (Fig. 9 D; Zhang et al., 2003). GST– α 11-I also specifically associated to the FBG domain and to the full-length TNX. On the contrary, a very weak interaction was shown with the TNX Δ E Δ F protein (FNIII repeats). Altogether, these experiments demonstrate that the I domain of α 11 chain directly associates with the FBG domain, confirming that the α 11 β 1 integrin is a receptor for the C-terminal domain of TNX.

Down-regulation of *ITGA11* expression in HT-1080 cells caused a marked decrease in phosphorylated Smad2 in the presence of the FBG domain, when compared with the scramble control (Fig. 9 E). Furthermore, knockdown of *ITGA11* expression in an HT-1080 cell–based Smad reporter construct ((CAGA)₉-Luc)

of TGF- β 1 and the FBG domain were performed in parallel on the same fractions (2.5 μ g protein). (B) Western blot analysis of phospho-Smad2 (P-Smad2) in NMuMG cells cultured for 3 h with the different fractions (50 μ g/ml) containing the FBG domain stripped of TGF- β 1–associated activity (bound fraction) or unbound (flow through) and wash fractions as described in A. As a control, untreated or alkaline-treated BSA was used instead of FBG domain. Ratio of phospho-Smad2 to actin levels is indicated below. (C) Firefly luciferase activity in NMuMG cells transiently transfected with the Smad-responsive (CAGA)₉-Luc reporter construct. The cells were incubated for 24 h with either recombinant TGF- β 1 (5 ng/ml) or the different fractions (50 μ g/ml) containing the FBG domain subjected or not subjected to alkaline treatment described in A. N-C, noncoated. (D, top) SDS-PAGE analysis of purified FBG domain produced in mammalian cells (FBG) and in *E. coli* (FBG*). MM, molecular mass markers. (bottom) Immunoblot analysis of the levels of mature human TGF- β 1 and of its LAP(β 1) propeptide associated with purified FBG domain (111 nM each). (E) Immunoblot analysis of phospho-Smad2 in NMuMG cells cultured for 3 h with 5 ng/ml TGF- β 1, soluble purified FBG domain (111 nM) produced in mammalian cells (FBG) or in *E. coli* (FBG*), or the corresponding vehicle (PBS). Ratio of phospho-Smad2 to total Smad2/3 levels is indicated below. (F) Firefly luciferase activity of MCF10A-TRE-Luc cells incubated for 24 h as described in E. (G) F-actin direct fluorescence (top) and indirect immunofluorescence staining of E-cadherin (bottom) performed in NMuMG cells cultured for 48 h with soluble FBG domains produced in eukaryotic (FBG) or prokaryotic (FBG*) system (111 nM). Bars, 15 μ m. *, P < 0.05 versus control condition. Error bars are means \pm SD. WB, Western blot.

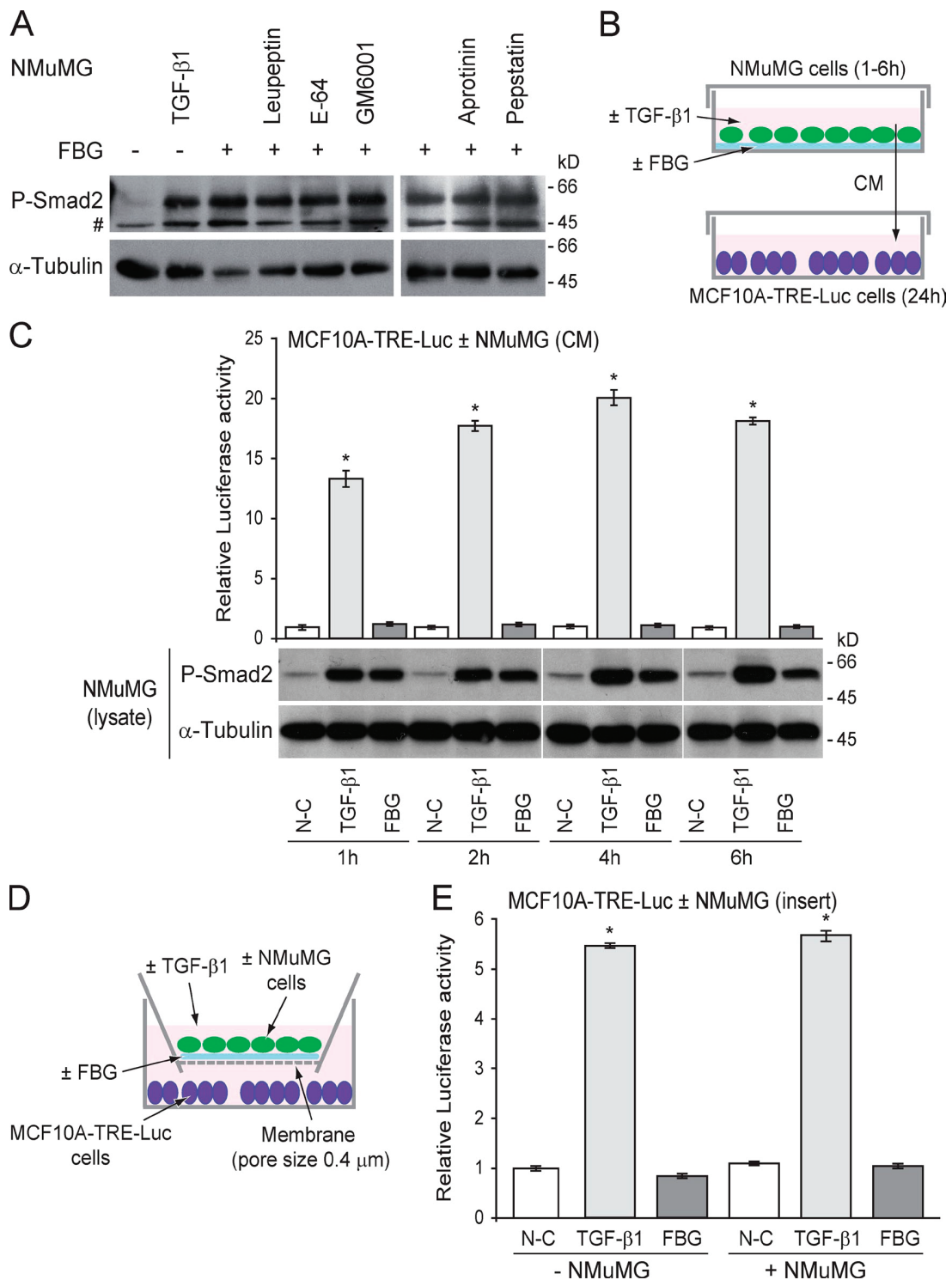


Figure 7. **Mature TGF-β activated by the FBG domain of TNX is not diffusible, and its activation does not require any proteolytic event.** (A) Phosphorylated Smad2 (P-Smad2) level in NMuMG cells seeded onto 222 pmol/cm² FBG-coated (+) or uncoated (-) dishes and cultured for 3 h in the absence (vehicle) or presence of the indicated protease inhibitor (10 μM) or recombinant TGF-β1 (5 ng/ml). #, nonspecific band. (B) Culture of recipient MCF10A-TRE-Luc reporter cells with conditioned medium (CM) from donor NMuMG cells seeded onto a noncoated (N-C) or a 222 pmol/cm² FBG-coated dish or treated with 5 ng/ml of mature TGF-β1 for 1–6 h. (C) Firefly luciferase activity of MCF10A-TRE-Luc cells cultured for 24 h with NMuMG cell-conditioned medium (top) and phospho-Smad2 levels in the donor NMuMG cells (bottom). White lines indicate that intervening lanes have been spliced out. (D) Co-culture assay of recipient MCF10A-TRE-Luc reporter cells (bottom well) with donor NMuMG cells (top well) seeded onto a porous membrane (pore size of 0.4 μm) coated or not coated with 222 pmol/cm² of recombinant FBG domain or treated with 5 ng/ml of mature TGF-β1. (E) Firefly luciferase activity of MCF10A-TRE-Luc cells co-cultured for 24 h with or without NMuMG cells in the presence or absence of FBG domain or TGF-β1 as described in D. *, P < 0.05 versus uncoated condition. Error bars are means ± SD.

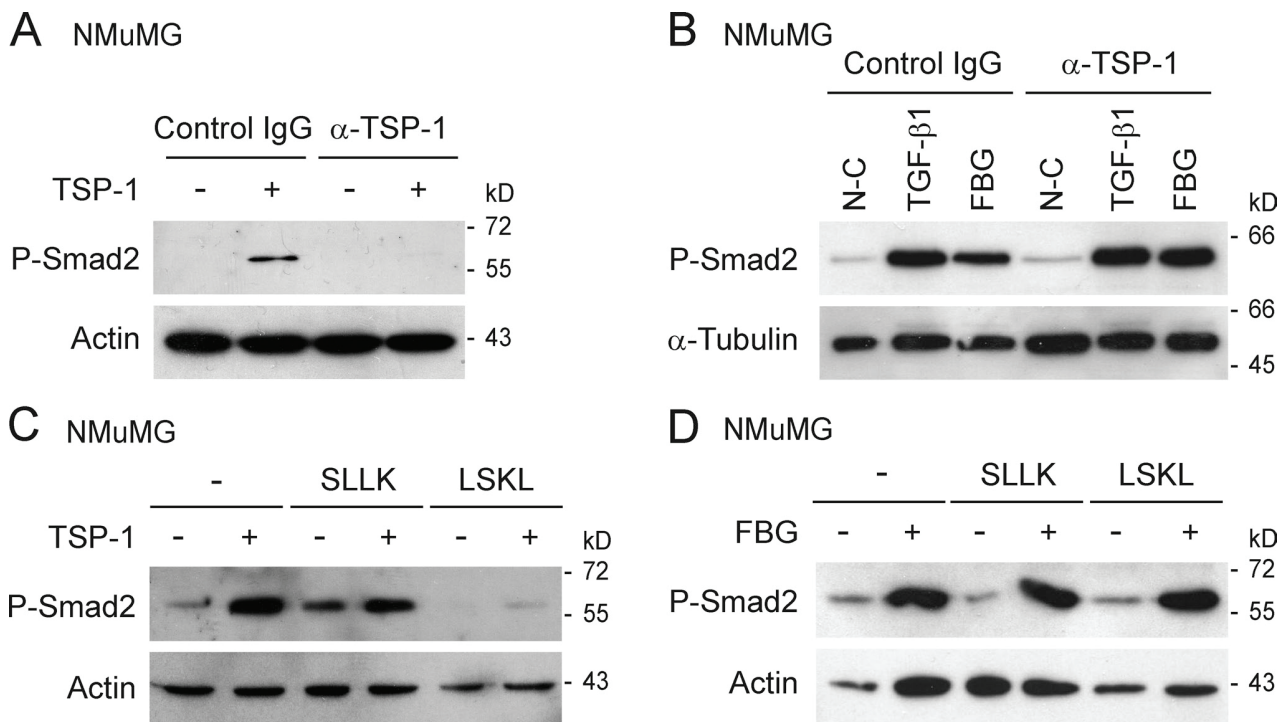


Figure 8. TSP-1 is not required for FBG-mediated activation of latent TGF- β . (A) Immunoblots showing phospho-Smad2 (P-Smad2) levels in NMuMG cells cultured for 3 h with (+) or without (–) soluble purified TSP-1 (11 nM) in the presence of neutralizing anti-TSP-1 antibody (α -TSP1) or normal serum IgG (10 μ g/ml). (B) Levels of phosphorylated Smad2 in NMuMG cells cultured for 3 h on noncoated (N-C) or 222 pmol/cm² FBG-coated dishes or treated with 5 ng/ml of mature TGF- β 1 in the presence of neutralizing anti-TSP-1 antibody as described in A. (C) Levels of phospho-Smad2 in NMuMG cells cultured for 3 h with (+) or without (–) 11 nM of soluble purified TSP-1 in the presence of a competing (LSKL) or control (SLLK) peptide (10 μ M). (D) Phospho-Smad2 levels in NMuMG cells cultured for 3 h on noncoated (–) or FBG-coated (+) dishes, in the absence (–) or presence (+) of competing or control peptide as described in C.

was found to compromise FBG-induced transcriptional activation (Fig. 9 F). These results were confirmed in MCF10A-TRE-Luc cells showing a loss of adhesion to the FBG domain in the presence of *ITGA11* shRNA (Fig. S5 A) and subsequent impairment of FBG-induced luciferase activity (Fig. S5 B) and Smad2 phosphorylation (Fig. S5 C). Conversely, overexpression of α 11 integrin subunit enhanced the phosphorylation of Smad2 triggered by the FBG domain (Fig. 10 A). Moreover, transient expression of both α 11 and β 1 integrin chains in BL41-(CAGA)₉-Luc cells induced a significant transcriptional activation of the TGF- β -responsive promoter in the presence of the FBG domain but not in response to recombinant TGF- β 1 (Fig. 10 B). Our data indicate that the α 11 β 1 integrin is crucial for activation of latent TGF- β by the FBG domain of TNX. Furthermore, the formation of actin stress fibers in MCF10A cells seeded onto the FBG domain was almost entirely abolished in the presence of *ITGA11* shRNA (Fig. 10 C), indicating that the knockdown of α 11 integrin subunit impaired the EMT induced by coated FBG domain. In conclusion, α 11 β 1 integrin-mediated cell adhesion to the FBG domain is a prerequisite to activation of latent TGF- β and subsequent Smad signaling and gene responses leading to EMT.

Discussion

Secreted TGF- β isoforms are mainly sequestered in the ECM (Taipale et al., 1994, 1996; Nunes et al., 1997) and constitute a reservoir of signaling molecules that are activated when required.

Consequently, extracellular regulation of latent TGF- β activation is crucial for tissue homeostasis. TSP-1 is the only matrix molecule described so far to bind and activate latent TGF- β in vitro (Schultz-Cherry and Murphy-Ullrich, 1993; Schultz-Cherry et al., 1994) and in vivo (Crawford et al., 1998). Here, we find that the C-terminal FBG domain of TNX interacts with the TGF- β SLC in vitro and in vivo and that this molecular association promotes the presentation of mature TGF- β to cells to induce specific responses such as EMT. We also provide evidence that FBG-mediated TGF- β activation occurs independently of TSP-1, and to our knowledge, the FBG domain of TNX is the second example of a matrix protein that is able to activate latent TGF- β .

Although the full-length TNX molecule does interact with the SLC and activate latent TGF- β (Fig. 5, A–C), it induces a mild EMT response, in contrast to the FBG domain alone, which causes a full EMT in mammary epithelial cells (Fig. 1, B and C). This result was explained by the fact that the FNIII-containing TNX region, when used as a separate protein, acted negatively on the soluble FBG domain in inducing EMT (Fig. 2). Unexpectedly, the FNIII repeat-containing region does not prevent the FBG domain in the intact TNX molecule from activating latent TGF- β and inducing Smad signaling (Fig. 5 C). Our results suggest that the FNIII repeat-comprising region and the FBG domain regulate EMT through distinct signaling pathways in the intact molecule. The cell surface receptor and the molecular mechanisms by which the central region of the TNX inhibits EMT have not yet been identified and are under investigation in

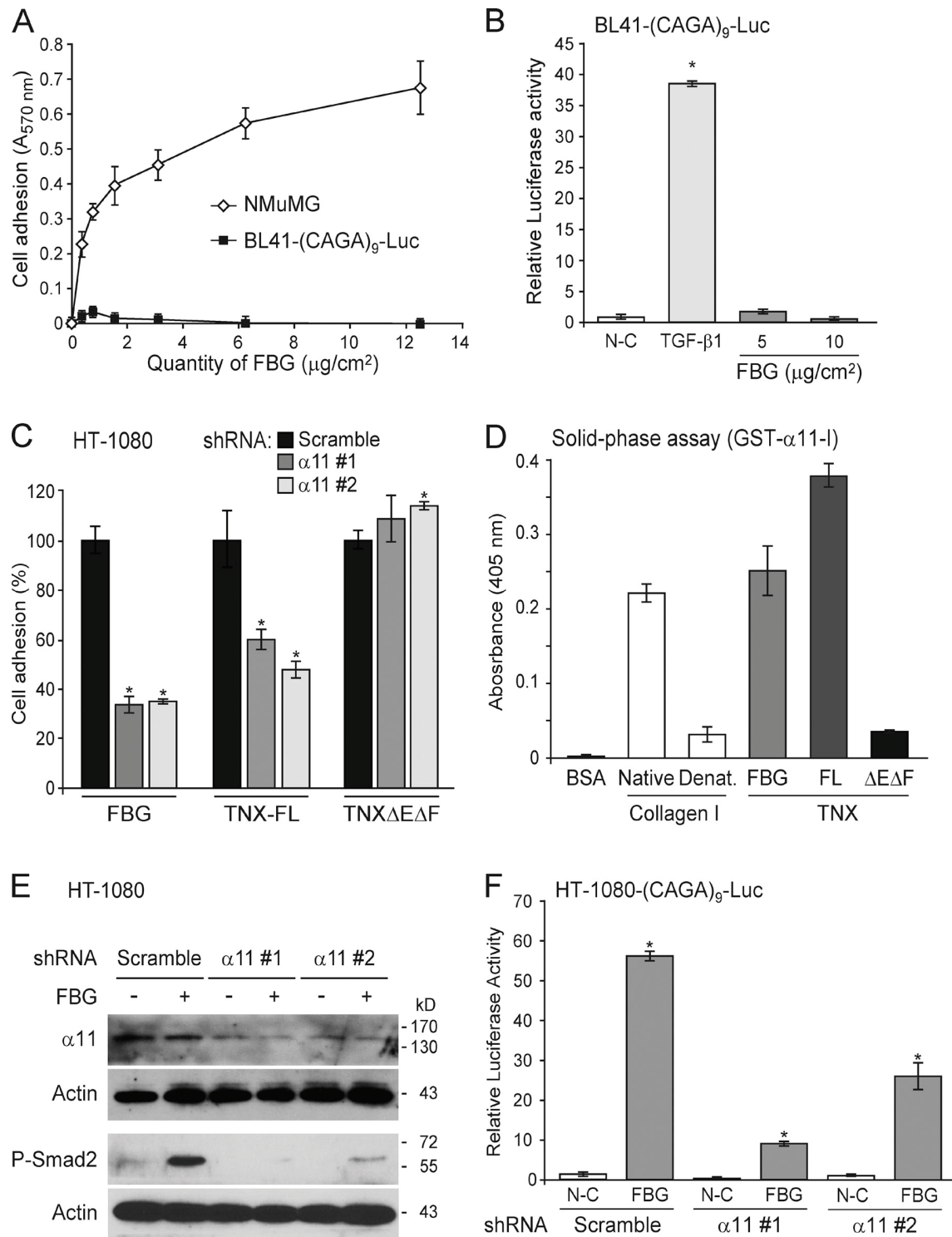


Figure 9. **Activation of latent TGF-β by the FBG domain requires cell adhesion and the α11β1 integrin.** (A) Adhesion of NMuMG and BL41-(CAGA)₉-Luc cells to an increasing quantity of recombinant FBG domain. (B) Luciferase activity of BL41-(CAGA)₉-Luc reporter cells cultured for 24 h on coated FBG domain or treated with 5 ng/ml TGF-β1. (C) Adhesion analysis of HT-1080 fibrosarcoma cells transiently expressing a scrambled shRNA or one of two shRNAs (#1 and #2) targeting different sequences of the *ITGA11* mRNA and cultured for 30 min onto coated recombinant FBG domain or other TNX fragments (111 pmol/cm²). Results represent the percentage of cell adhesion relative to the scramble shRNA condition for each recombinant protein analyzed. (D) Solid-phase assay of the interaction between the inserted domain of α11 integrin chain in fusion with GST (1 μM) and 5 μg/ml of native or denatured (Denat.) type I collagen or the different TNX derivatives (111 nM). FL, full length. (E) Immunoblotting analysis of phospho-Smad2 and the α11 integrin chain in HT-1080 cells transiently transfected as in C and seeded for 3 h onto uncoated (-) or 222 pmol/cm² FBG-coated (+) dishes. (F) Firefly luciferase activity of HT-1080 cells transiently cotransfected with the Smad-responsive (CAGA)₉-Luc reporter construct and a scrambled or an *ITGA11*-targeting shRNA and cultured for 24 h in noncoated (N-C) or 222 pmol/cm² FBG-coated wells. *, P < 0.05 versus control condition. Error bars are means ± SD.

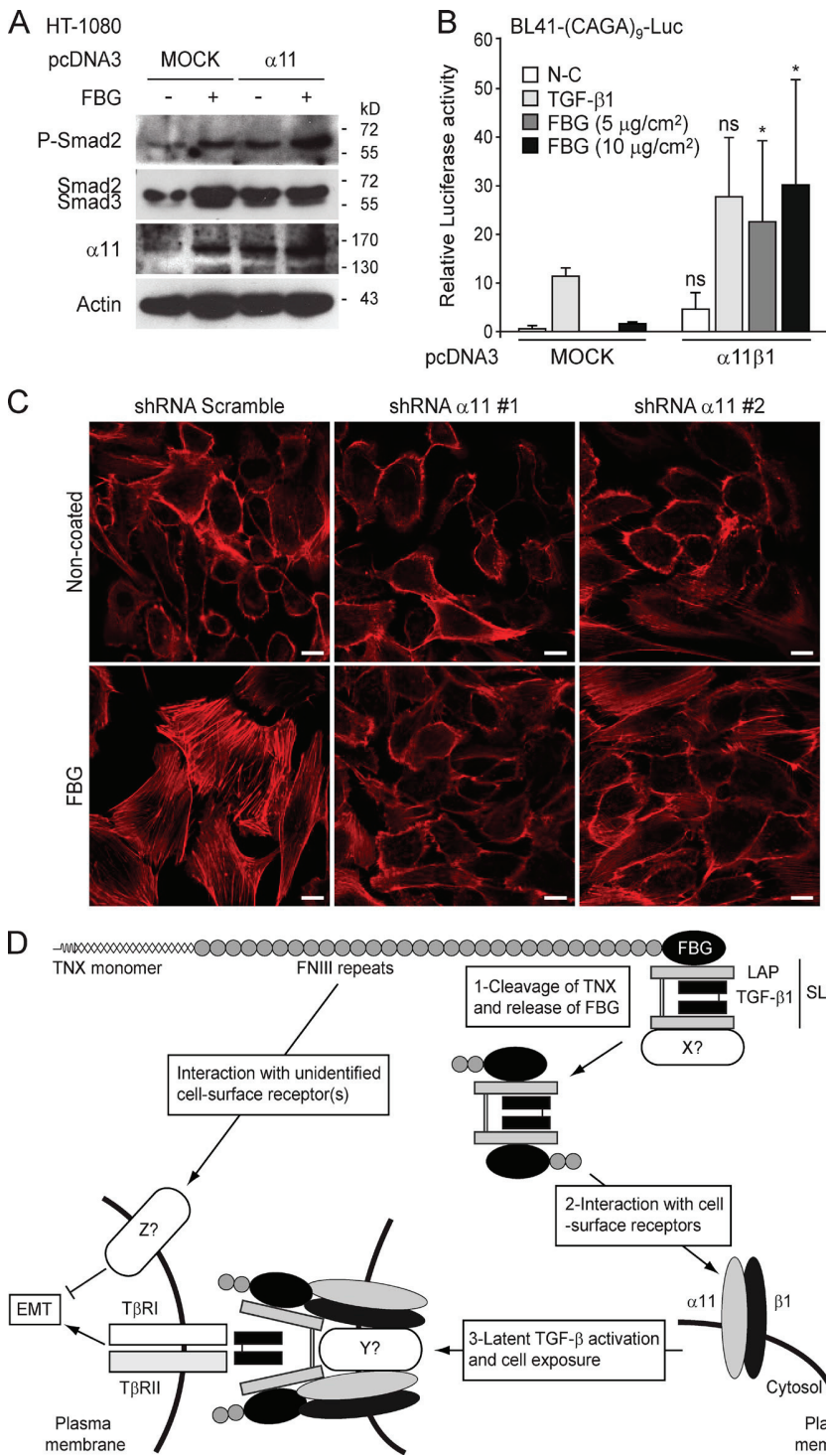


Figure 10. $\alpha 11\beta 1$ integrin is required for the induction of EMT by the FBG domain of TNX. (A) Immunoblot analysis of phospho-Smad2 (P-Smad2), total Smad2/3, and the $\alpha 11$ integrin chain in HT-1080 cells transiently expressing, or not expressing (MOCK), $\alpha 11$ integrin subunit and seeded for 3 h onto uncoated (-) or 222 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ FBG-coated (+) dishes. (B) Luciferase activity of BL41-(CAGA)₉-Luc reporter cells transiently cotransfected or not transfected (MOCK) with plasmids encoding $\alpha 11$ or $\beta 1$ integrin chain and cultured for 24 h on coated FBG domain (222 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) or treated with 2 ng/ml TGF- β . Significant (*, $P < 0.05$) or nonsignificant (ns) difference versus the mock counterpart is indicated for each condition. Error bars are means + SD. N-C, not coated. (C) Direct fluorescence actin staining in MCF10A cells transiently transfected with a scrambled or an *ITGA11*-targeting shRNA and incubated for 48 h on either a noncoated or 222 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$ FBG-coated coverslips. Bars, 10 μm . (D) Model of TGF- β activation by the FBG domain of TNX.

our laboratory. More importantly, our results indicate that the FBG domain has to be separated from the region containing the FNIII repeats to exert a biological response, such as a full EMT.

Several lines of evidence suggest that TNX C-terminal fragments comprising the FBG domain exist in vivo. Serum TNX forms of different molecular weights have been found in human and mouse (Schalkwijk et al., 2001; Matsumoto et al., 2006; Egging et al., 2007b). These proteolysis-derived forms

are suggested to arise through tissue matrix clearance. For example, the TNX molecule present in human arteries has recently been identified in vitro as a potential substrate of MMP-3, -9, and -14 (Stegemann et al., 2013). Interestingly, a 75-kD C-terminal fragment of TNX is the predominant form detected in human serum (Egging et al., 2007b) and among the MMP substrates identified in human arteries in vitro (Stegemann et al., 2013). These studies, however, have not demonstrated the integrity of

the FBG domain in these TNX fragments. TNC, the most studied member of the tenascin family, is cleaved *in vitro* by meprin- β , releasing a 40–55-kD fragment containing the FBG domain along with two to three FNIII repeats (Ambort et al., 2010). Meprin- β -mediated release of the C-terminal fragment fully abolishes the adhesion-modulating property of TNC (Ambort et al., 2010). Whether MMPs or meprins cleave the TNX molecule to release a fragment comprising the FBG domain is under investigation in our laboratory.

FBG-dependent activation of latent TGF- β appears to involve a conformational change in the LAP-TGF- β complex, allowing local exposure of the mature entity to cells. This conclusion rests first on our observation that broad spectrum protease inhibitors fail to impair FBG-mediated TGF- β activation, indicating that this process does not require a proteolytic event. Second, we show in two independent assays that the unmasked mature TGF- β in the SLC-FBG complex is not diffusible, suggesting that activation of latent TGF- β occurs in the cell vicinity. Accordingly, cell adhesion to the FBG domain is required for activation of latent TGF- β . Although some RGD-dependent integrins have been shown to mediate a conformational change in the latent complex, causing bioactive TGF- β to be exposed to cells (Munger et al., 1999; Asano et al., 2005, 2006; Wipff et al., 2007), we found that FBG-mediated TGF- β activation does not require those integrins. Using an RNA interference-based functional screen for the integrin α -chain, we here identify α 11 β 1 integrin as a cell receptor for the FBG domain. The α 11 β 1 integrin was previously shown to specifically interact with several collagens, such as type I and IV collagens (Velling et al., 1999; Tiger et al., 2001), by binding to a GFOGER motif (Zhang et al., 2003). Though the FBG domain does not contain this motif, we show that the α 11 integrin chain interacts directly with the recombinant FBG domain both as a separate entity or comprised in the full-length TNX molecule. More importantly, we show that cell adhesion to the FBG domain through α 11 β 1 integrin is a prerequisite to subsequent activation of latent TGF- β .

Although a link between TNX, α 11 β 1 integrin receptor, and latent TGF- β activation has not yet been reported *in vivo*, we cannot exclude that such physical and functional interactions occur. Indeed, the TGF- β pathway has been recently shown to be abnormal in patients suffering from congenital adrenal hyperplasia associated with TNX deficiency (Morissette et al., 2014). Moreover, deficiency or haploinsufficiency of TNX both in patients and mice is correlated with a decreased content of collagen and elastic fibers in connective tissues, thus compromising their biomechanical properties (Mao et al., 2002; Zweers et al., 2004). As TGF- β is a potent actor in matrix protein synthesis and ECM remodeling (Verrecchia and Mauviel, 2002), it will be of interest to determine whether a local impairment of latent TGF- β activation in TNX-deficient conditions would account for the observed decrease of ECM molecules. Moreover, α 11-deficient mice displayed a defect in incisor tooth eruption as a result of a defective matrix organization of the periodontal ligament (Popova et al., 2007). Authors observed a decreased expression of many matrix protein-encoding genes in mutant periodontal ligaments (Popova et al., 2007), but a putative defect of TGF- β activation has not been addressed. A deeper analysis of TNX- and α 11-deficient

mice in physiological (wound healing) or pathological (fibrosis or tumor progression) conditions requiring activation of latent TGF- β will provide a functional link between the TNX- α 11 β 1 axis and the regulation of mature TGF- β bioavailability.

On the basis of the present observations, we propose the following model (Fig. 10 D): Under physiological or pathological conditions ultimately inducing ECM remodeling, we speculate that proteases cleave the TNX molecule to release a fragment comprising at least the FBG domain. In this fragment, the FBG domain might already be associated with SLC or might interact with free cell-secreted SLC. Upon recruitment to the cell surface and subsequent interaction with the α 11 β 1 integrin, the FBG domain would trigger a conformational change in the SLC, allowing the presentation of mature TGF- β to the T β RII-I receptor complex and subsequent intracellular signaling liable to induce an EMT response. The next challenge will be to unravel the precise molecular mechanisms by which the FBG- α 11 β 1 integrin complex activates latent TGF- β .

Materials and methods

Cell culture, adenoviruses, and reagents

Normal murine (NMuMG) and human (MCF10A) mammary gland epithelial cells and the human fibrosarcoma (HT-1080) cell line were obtained from the ATCC and maintained as recommended by the ATCC. MCF10A cells expressing firefly luciferase under the control of a TRE were donated by I. Mikaelian (Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France). The Burkitt's lymphoma cell line BL41 expressing the firefly luciferase under the control of nine Smad-binding elements ((CAGA)₉) was a gift from M.-F. Bourgeade (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 785, Villejuif, France) and was used as previously described (Rogier et al., 2005). Adenoviruses expressing the control protein β -galactosidase (Ad-LacZ) or N-terminally FLAG-tagged Smad7 were donated by A. Moustakas (Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala, Sweden) and amplified and titrated as previously described (Piek et al., 1999).

Recombinant mature human TGF- β 1 was obtained from PeproTech and dissolved in 0.1% (wt/vol) BSA in 4 mM HCl buffer. SB431542, a small molecular weight inhibitor of the TGF- β (T β R1), Activin (ALK-4), and Nodal (ALK-7) type I receptors (Inman et al., 2002), was purchased from Sigma-Aldrich. The protein synthesis inhibitor cycloheximide and the protease inhibitors (leupeptin, aprotinin, and pepstatin) were purchased from Sigma-Aldrich. The compounds E64 and GM6001 were obtained from EMD Millipore. For neutralization experiments, mouse monoclonal anti-TGF- β 1/ β 2/ β 3 (1D11) antibody was purchased from R&D Systems. The mouse monoclonal anti-TSP-1 (mAB133) antibody and competing (LSKL) and control (LLSK) peptides were obtained from J.E. Murphy-Ullrich (University of Alabama, Tuscaloosa, AL). Purified human platelet thrombospondin was purchased from Athens Research & Technology, Inc. The RGD peptides GRGDNP and cyclo(RGDVF) and the control peptide GRADSP were obtained from Enzo Life Sciences. The RGD peptides GRGDTP and GRGDS, the control peptide SDGRRG, and cytochalasin B were obtained from Sigma-Aldrich.

Recombinant protein purification and adsorption

Recombinant full-length TNX (from Gly²³ to Gly^{4,135} residues according to the GenBank reference NM_174703) and its variants, the TNX Δ EDF fragment (consisting of FNIII modules only, from Gly⁷⁴⁵ to Thr^{3,910} residues) and the FBG domain (C-terminal FBG domain, from Gly^{3,911} to Gly^{4,135} residues), were produced in stably transfected HEK-293 cells using the pSec-Tag2/hygromycin expression vector (Invitrogen) and purified as described previously (Lethias et al., 2001, 2006). In brief, recombinant proteins were purified from the conditioned medium by means of two chromatographic steps. The first chromatography was performed on heparin-Sepharose (GE Healthcare) for full-length TNX and TNX Δ EDF or on a nickel-chelating column [Ni-nitrilotriacetic acid agarose; QIAGEN] for the FBG domain. Eluted proteins were dialyzed against 50 mM Tris, pH 8.0. A second chromatography was performed on a Q-Sepharose column (GE Healthcare), and elution was performed with a linear gradient of NaCl in 50 mM Tris, pH 8.0. After dialysis against PBS, fractions enriched in recombinant proteins

were stored at -80°C . For preparations of "stripped" FBG domain (free of TGF- β activity), a further nickel-affinity chromatography step was performed in 50 mM Tris at pH 11.0. The stripped FBG domain was eluted with 300 mM NaCl, 50 mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, and 200 mM imidazole, pH 11.0, and then dialyzed against PBS. The FBG domain (from Gly^{3,911} to Gly^{4,135} residues) containing a C-terminal hexahistidine tag was also produced in *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) using the pT7-7 vector (United States Biochemical Corp.) as described previously (Elefteriou et al., 1999). The FBG domain, produced in an insoluble form, was extracted from inclusion bodies using 8 M urea in 100 mM *N*-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid, pH 11.0, buffer before purification on a Ni-nitrilotriacetic acid agarose column. Elution was performed with the same purification buffer containing 100 mM imidazole, pH 8.0. The purified FBG domain was renatured by dialysis against 100 mM *N*-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid, pH 11.0 buffer (without urea).

The purity of the recombinant proteins was assessed by SDS-PAGE with Coomassie blue staining (Bio-Rad Laboratories), and protein concentrations were determined with the bicinchoninic acid assay kit (Quantipro; Sigma-Aldrich). The lower molecular mass of the bacterially produced FBG domain, compared with the FBG domain produced in HEK-293 cells, is a result of the absence of glycosylation in the prokaryotic system used.

Recombinant TNX fragments were diluted in PBS and allowed to immobilize on (adsorb onto) cell culture coverslips or dishes or wells overnight at 4°C . When the different TNX derivatives were used within the same experiment, the quantity of coating recombinant protein was 111 pmol/cm², whereas in the experiments in which the FBG domain was used independently, the quantity of coating recombinant protein was 222 pmol/cm² (corresponding to 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), unless specified otherwise in the figure legends. Nonspecific interaction sites were saturated with 1% (wt/vol) BSA for 1 h at 37°C . Cells were seeded onto immobilized recombinant TNX fragments after three washes of the substrates with sterile PBS. In this study, the noncoated condition means that the cell culture support was incubated in the presence of vehicle (PBS) instead of recombinant protein.

The cDNA encoding the inserted (I) domain of $\alpha 11$ integrin chain (from Gln¹⁶⁰ to Asn³⁵⁸ residues according to the GenBank reference NM_001004439) was generated by PCR using the PrimeSTAR HS DNA Polymerase (Takara Bio Inc.) and the following forward, 5'-CGCG-GATCCCAGACCTACATGGACATCGTC-3', and reverse, 5'-CCCAAGCTT-CAGTTCITGTTGGTGCCTTC-3', oligonucleotides. Inserts were cloned into a derivative of the pGEX-KT vector (GE Healthcare) between the BamHI and HindIII sites to generate recombinant GST fusion protein of $\alpha 11$ -I. DNA sequence was checked by sequencing the whole insert. Competent *E. coli* BL21 (DE3) cells were transformed with the pGEX-KT-WT or pGEX-KT- $\alpha 11$ -I plasmids for protein production. Clones were grown in 500 ml lysogeny broth medium (Sigma-Aldrich) containing 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin (Sigma-Aldrich) at 37°C until the absorbance at 600 nm of the suspension reached 0.7–0.8, and protein expression was induced with 0.4 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside and allowed to grow for an additional 3 h before harvesting by centrifugation. Pelleted cells were resuspended in PBS, pH 7.4, buffer and then lysed by sonication followed by the addition of Triton X-100 to a final concentration of 2%. After incubation for 30 min on ice, suspensions were centrifuged. Soluble proteins were purified on glutathione-Sepharose columns (GE Healthcare). After extensive washes of the columns with PBS, fusion proteins were eluted using 30 mM glutathione. Purified recombinant GST fusion proteins were dialyzed against PBS before solid-phase assays.

Cell transduction and plasmids

Cells were either transiently transfected with plasmids by means of Lipofectamine 2000 (Invitrogen; MNuMG and HT-1080 cells) or microporated (MCF10A and BL41-(CAGA)₉-Luc cells) with the Neon Transfection System (Invitrogen) and an MP-100 microporator (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. shRNAs targeting expression of the human *ITGA11* gene (NM_001004439) were obtained by cloning the corresponding sequence ($\alpha 11\#1$, 5'-CCGGCCATCCAAGTCAACATCTTCTCGAGAA-GATGTTGATCTTGGATGGCTTTTG-3'; or $\alpha 11\#2$, 5'-CCGGGCTGGAGA-GATACGATGGTATCTCGAGATACCATCGTATCTCTCCAGCTTTTG-3') into the pLKO.1 TRC cloning vector (plasmid #10878; Addgene) between the EcoRI and AgeI sites. The pLKO.1 scramble shRNA vector (plasmid #1864; Addgene) was used as a control. The cDNA encoding the open reading frame of the human *ITGA11* gene was amplified from human dermal fibroblast mRNA by RT-PCR using the PrimeSTAR HS DNA Polymerase and the following forward, 5'-AAAAAGCTTCGGGCCACTGGCC-3', and reverse, 5'-TTGTAATCTCACTCCAGCAGCATTTGGGGG-3', oligonucleotides and cloned into the pcDNA3 vector (Invitrogen) between the

HindIII and EcoRI sites. The integrity of the cloned sequences was checked by direct sequencing.

The retroviral vectors encoding human integrins $\beta 8$ (pBABE-Puro- $\beta 8$) and $\beta 6$ (pBABE-Puro- $\beta 6$) were gifts from S. Nishimura (University of California, San Francisco, San Francisco, CA; Mu et al., 2002) and D. Sheppard (University of California, San Francisco, San Francisco, CA; plasmid #13596; Addgene), respectively. NMuMG cells were infected with murine retroviral particles containing a wild-type (pBABE-Puro) or an integrin-expressing vector and further cultured in the presence of puromycin (PAA Laboratories) to obtain stable cell lines. The mammalian expression vectors encoding the human latent TGF- $\beta 1$ (pcDNA3-LAP- $\beta 1$), TGF- $\beta 2$ (pcDNA-LAP- $\beta 2$), and TGF- $\beta 3$ (pcDNA-LAP- $\beta 3$) isoforms were a gift from A. Moustakas.

Quantitative analysis of TGF- $\beta 1$ and cell reporter assays

For cell reporter assays, 10^5 MCF10A-TRE-Luc or 10^5 BL41-(CAGA)₉-Luc cells were seeded into 24-well plates (coated or not coated with recombinant FBG domain) or stimulated or not stimulated with recombinant mature TGF- $\beta 1$ for 16–24 h. Alternatively, HT-1080 or NMuMG cells were cotransfected with the pGL3-basic reporter plasmid (Promega) encoding firefly luciferase under the control of TGF- β -responsive elements ((CAGA)₉-Luc; Denler et al., 1998) together with the pRLCMV vector (Promega) encoding *Renilla* luciferase under the control of the cytomegalovirus ubiquitous promoter to determine the transfection efficiency and to normalize firefly luciferase values. Medium conditioned by NMuMG cells cultured for the indicated time in 6-well plates (4×10^5 cells/well) containing immobilized FBG domain or soluble recombinant mature TGF- $\beta 1$ was collected, clarified, transferred to serum-starved recipient MCF10A-TRE-Luc cells (500 μl), and incubated for 24 h. In co-culture experiments, 5×10^4 NMuMG cells were seeded into an insert of a Transwell support (pore size of 0.4 μm ; Corning) containing or not containing the immobilized FBG domain. The lower part of the well contained 10^5 MCF10A-TRE-Luc recipient cells. Recombinant mature TGF- $\beta 1$ was added in the insert, and recipient cells were cultured for 24 h. Total protein was extracted in Passive Lysis Buffer (Promega) as recommended by the manufacturer. Luciferase activity in MCF10A-TRE-Luc and BL41-(CAGA)₉-Luc cells was measured with the Luciferase Assay System (Promega), whereas the transcriptional responses in HT-1080 cells were determined with the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) using a luminometer (TD-20/20; Turner BioSystems) as described previously (Pommier et al., 2012). If not stated otherwise, all results were corrected for luciferase production in cells grown in noncoated dishes and/or in the presence of the vehicle (conditions arbitrarily set at 1) and are presented as means \pm SD of one representative experiment performed in triplicate.

Levels of mature human and bovine TGF- $\beta 1$ were estimated with the human TGF- $\beta 1$ ELISA kit (Quantikine; R&D Systems) in accordance with the manufacturer's instructions. Determination of the latent TGF- β fraction was performed by subjecting samples to heat denaturation at 60°C for 10 min followed by acid treatment in 1 N HCl for 10 min at room temperature. Samples were then neutralized with an equal volume of 1.2 N NaOH–0.5 M Hepes as recommended in the manufacturer's protocol before performing the immunoassay.

Coimmunoprecipitation and immunoblotting

Total protein was extracted from stimulated and/or transfected cells using radioimmunoprecipitation assay buffer (150 mM NaCl, 1% [vol/vol] Nonidet P-40, 0.5% [vol/vol] sodium deoxycholate, 0.1 [wt/vol] SDS, and 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing protease and phosphatase inhibitor cocktail tablets (Roche), subjected to SDS-PAGE, and analyzed by Western blotting. Rabbit monoclonal antiphospho-Smad2 (Ser465/467; 138D4) and polyclonal anti-Smad2/3 antibodies were purchased from Cell Signaling Technology, rat monoclonal anti- α -tubulin antibody (YL1/2) was obtained from Abcam, goat polyclonal anti-human LAP (TGF- $\beta 1$) and anti- $\alpha 11$ integrin antibodies were obtained from R&D Systems, rat monoclonal anti-mouse, -human, and -pig TGF- $\beta 1$ antibodies were obtained from BD, and mouse monoclonal anti- β -actin (AC15) and anti- γ -tubulin (GTU-88) antibodies were obtained from Sigma-Aldrich. Mouse monoclonal anti-FBG (TNX; clone 12B12) antibody was produced in house against the purified recombinant FBG domain of TNX. The mouse monoclonal antibody (clone 8F2) recognizing the 10th FNIII domain of TNX was previously described (Lethias et al., 2001). Secondary anti-mouse IgG and anti-rabbit IgG antibodies coupled to HRP were purchased from Bio-Rad Laboratories, anti-rat IgG-HRP was purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., and anti-goat IgG-HRP was obtained from Dako. The electrochemiluminescence detection system (ECL Plus) was purchased from GE Healthcare. For coimmunoprecipitation analyses, 2.5 μg purified recombinant FBG domain or 2 ml FBS was precleared by incubation with

Table 1. Oligonucleotide primers used for quantitative real-time RT-PCR

Gene	Primer sequence (strand)	Product size	Temperature	PCR cycles	Reference or accession no.
		bp	°C		
E-cadherin (<i>Cdh1</i>)	5'-CTGCGCTGGATAGTGTGT-3' (+) 5'-TGGCATGCACCTAAGAATCA-3' (-)	187	58	40	NM_009864
Keratin-19 (<i>Krt19</i>)	5'-GATCAGCGGTTTTGAAGCCC-3' (+) 5'-GTCTCGCTGGTAGCTCAGAT-3' (-)	195	58	40	NM_008471
Mucin-1 (<i>Muc1</i>)	5'-AGACCCCAGCTCCAACACT-3' (+) 5'-TGACTTCACGTCAGAGGCAC-3' (-)	178	58	40	NM_013605
N-cadherin (<i>Cdh2</i>)	5'-GAGAGGCCTATCCATGCTGA-3' (+) 5'-CGCTACTGGAGGAGTTGAGG-3' (-)	204	58	40	NM_007664
Vimentin (<i>Vim</i>)	5'-GTGCGCCAGCAGATGAAAG-3' (+) 5'-GCATCGTTGTTCCGGTTGG-3' (-)	110	58	40	NM_011701
Fibronectin (<i>Fn1</i>)	5'-CCCAGACTTATGGTGCCAATTC-3' (+) 5'-AATTCCCGCCTCGAGTCTGA-3' (-)	200	58	40	NM_010233
<i>Hmga2</i>	5'-AGCAAAAACAAGAGCCCCTCTA-3' (+) 5'-ACGACTTGTGTGGCCATTC-3' (-)	100	58	40	Thuault et al., 2006
<i>Snail1</i> (<i>Snai1</i>)	5'-CCACTGCAACCGTCTTTT-3' (+) 5'-CACATCCGAGTGGGTTGG-3' (-)	66	58	40	Thuault et al., 2008
<i>Zeb1</i>	5'-ACAAGACACCGCGTCATT-3' (+) 5'-GCAGGTGAGCAACTGGGAAA-3' (-)	120	58	40	Thuault et al., 2008
<i>Gapdh</i>	5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3' (+) 5'-CCTGCTTACCACCTTCTGA-3' (-)	76	58	40	Valcourt et al., 2007

Accession numbers were obtained from GenBank.

protein G-Sepharose (GE Healthcare) at 4°C for 1 h. The precleared samples were incubated overnight at 4°C with either anti-FBG (12B12) antibody, anti-TGF-β1 antibody, anti-LAP(β1) antibody, or species-specific control IgG (Dako), and the immunocomplexes were precipitated with protein G-Sepharose, washed four times with lysis buffer (300 mM NaCl, 10% [vol/vol] glycerol, 2% [vol/vol] Triton X-100, and 20 mM Tris-HCl, pH 7.4), dissolved in Laemmli SDS-PAGE loading buffer, and analyzed by immunoblotting. Relative protein levels were quantified by using the densitometric software of ImageJ (National Institutes of Health). Ratios of band intensities of the tested proteins over the control protein were calculated.

Direct fluorescence and indirect immunofluorescence microscopy

Cells were treated as indicated in the figure legends, fixed with 4% (vol/vol) paraformaldehyde for 20 min at ambient temperature, and permeabilized using 0.5% (vol/vol) Triton X-100 in PBS. For direct fluorescence analysis, fixed cells were stained with tetramethylrhodamine isothiocyanate-labeled phalloidin (Sigma-Aldrich). Indirect immunofluorescence experiments were performed using mouse monoclonal anti-E-cadherin (clone 13; BD) and Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG (Life Technologies). Observations were conducted at ambient temperature with an oil immersion objective (Plan Neofluar 40x, 1.3 NA oil Ph3; Carl Zeiss) mounted on a microscope (Axioplan 2 Imaging; Carl Zeiss) equipped with a digital camera (CoolSNAP fx; Photometrics) and Metavue (Molecular Devices) imaging software or with an oil immersion objective (Plan APOchromat 40x/1.3 NA oil differential interference contrast M27; Carl Zeiss) mounted on an inverted confocal microscope (LSM 780; Carl Zeiss) equipped with ZEN (Carl Zeiss) imaging software. Image memory content was reduced, and brightness contrast was adjusted with Photoshop CS5 (Adobe).

Cell adhesion assays

Cell adhesion to the recombinant FBG domain or TNX variants was assessed as previously described (Elefteriou et al., 1999). In brief, 96-well plates (MaxiSorp; Thermo Fisher Scientific) were coated overnight at 4°C with recombinant FBG domain or TNX derivatives. Dose-response curves were obtained by coating with dilution series of protein solutions. The wells were then saturated with 1% BSA. Cells suspended in serum-free medium were added to the wells (30,000 cells per well) and incubated for 1 h at 37°C unless specified otherwise in the figure legends. Nonadherent cells were removed, and adherent cells were fixed (10% [vol/vol] glutaraldehyde) using of the buoyancy method (Goodwin and Pauli, 1995). Cells were stained with crystal violet, and the absorbance was read at 570 nm. For inhibition experiments, NMuMG cells were incubated for 10 min at

ambient temperature with RGD or control peptides before seeding onto 10 µg/cm² of recombinant FNIII domains 9 and 10 of TNX (Elefteriou et al., 1999).

Solid-phase assays

In vitro protein interaction analysis was assessed as previously described (Lethias et al., 2006). 96-well plates (MaxiSorp) were coated with 5 µg/ml BSA, 5 µg/ml type I collagen, or the different recombinant TNX fragments (111 nM) diluted in water. Acid-soluble collagen, mainly consisting of type I collagen, was extracted from tail tendons of young rats using standard procedures. In brief, dilacerated tendons were incubated for 48 h in 0.5 M acetic acid in 0.2 M NaCl. Acid-soluble extract was centrifuged at 20,000 g for 20 min. The supernatant was dialyzed against 0.5 M acetic acid in 0.9 M NaCl and centrifuged at 20,000 g for 20 min. The dried pellet was dissolved in 1 mM HCl, and collagen concentration was determined with the QuantiPro bicinchoninic acid assay kit (Margaron et al., 2010). In some assays, collagen was denatured by heating the solution for 30 min at 95°C before being added to the wells. Wells were then saturated with T-PBS-BSA (0.1% Tween and 1% BSA in PBS) for 2 h and incubated for a further 2 h with purified recombinant GST or GST-α111 (1 µM) diluted in T-PBS-BSA in the presence of 2 mM MgCl₂. Wells were rinsed with T-PBS (0.1% Tween in PBS), incubated for 1 h with an anti-GST antibody diluted 1:500 in T-PBS-BSA. Bound antibodies were further revealed with anti-rabbit IgG antibody conjugated to peroxidase (Dako) for 30 min. After a final series of washes, bound peroxidase was detected with H₂O₂ and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), and the absorbance was read at 405 nm. Each data point represents the mean of triplicate determinations for GST-α111, corrected for GST alone values, and interaction data are presented as bar plots of mean values ± SD. BSA was used as a negative control.

Quantitative real-time RT-PCR

Total RNA was extracted from NMuMG cells with the RNeasy kit (QIAGEN) and digested with DNase I (RQ1 RNase-free DNase; Promega) to remove any contaminating genomic DNA. Reverse transcription was performed with 1 µg RNA and 12.5 ng/µl anchored oligo-dT₂₃ primer (5'-dT₂₃VVV-3', in which V represents an A, C, or G nucleotide) in the presence of 200 U of a reverse transcriptase kit (SuperScript II; Invitrogen). Quantitative real-time PCR reactions were performed from a dilution (1:10) of cDNA solution in a PCR detection system (iCycler iQ; Bio-Rad Laboratories) and with specific primers designed according to sequences available in databanks or published by other authors (Table 1). Gene expression levels

were determined by the comparative threshold cycle method with the *Gapdh* gene as a reference [Schmittgen and Livak, 2008]. The basal condition was set at 1, and expression data are presented as bar plots of mean values \pm SD.

Data and statistical analysis

Each result shown is from an experiment representative of at least three independently repeated experiments. Statistical analysis of the different assays was performed by two-tailed paired Student's *t* test. A value of $P < 0.05$ was considered significant (asterisks in figures).

Online supplemental material

Fig. S1 consists in the characterization of the mouse mammary epithelial cell plasticity regulated by the different domains of TNX. Fig. S2 shows that the central region of TNX (comprising the FNIII repeats) inhibits the EMT induced by the FBG domain. Fig. S3 illustrates that the FBG domain of TNX employs the Smad signaling pathway to trigger an EMT in mouse mammary epithelial cells. Fig. S4 demonstrates that FBG-mediated activation of latent TGF- β does not require either RGD-dependent integrins or an intact cytoskeleton. Fig. S5 shows that down-regulation of *ITGA11* impairs FBG-mediated activation of latent TGF- β in mammary epithelial cells. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201308031/DC1>.

We thank I. Mikaelian, G. Murphy-Ullrich, M.-F. Bourgeade, and A. Moustakas for valuable reagents and the Centre d'Imagerie Quantitative Lyon-Est and past members of our research group for their help in this work. We thank A. Moustakas and G. Fourel for critical reading of the manuscript.

This work was supported by the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale and the Ligue Nationale Contre le Cancer-Comité du Rhône. L.B. Alcaraz was supported by a fellowship from the Ligue Nationale Contre le Cancer.

The authors declare no competing financial interests.

Submitted: 6 August 2013

Accepted: 9 April 2014

References

- Ambort, D., F. Brellier, C. Becker-Pauly, W. Stöcker, S. Andrejevic-Blant, M. Chiquet, and E.E. Sterchi. 2010. Specific processing of tenascin-C by the metalloprotease meprin beta neutralizes its inhibition of cell spreading. *Matrix Biol.* 29:31–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.matbio.2009.08.007>
- Asano, Y., H. Ihn, K. Yamane, M. Jinnin, Y. Mimura, and K. Tamaki. 2005. Involvement of α 5 β 1 integrin-mediated activation of latent transforming growth factor beta 1 in autocrine transforming growth factor beta signaling in systemic sclerosis fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 52:2897–2905. <http://dx.doi.org/10.1002/art.21246>
- Asano, Y., H. Ihn, K. Yamane, M. Jinnin, and K. Tamaki. 2006. Increased expression of integrin α 5 β 1 induces the myofibroblastic differentiation of dermal fibroblasts. *Am. J. Pathol.* 168:499–510. <http://dx.doi.org/10.2353/ajpath.2006.041306>
- Brown, P.D., L.M. Wakefield, A.D. Levinson, and M.B. Sporn. 1990. Physicochemical activation of recombinant latent transforming growth factor-beta's 1, 2, and 3. *Growth Factors.* 3:35–43. <http://dx.doi.org/10.3109/0897199009037500>
- Crawford, S.E., V. Stellmach, J.E. Murphy-Ullrich, S.M. Ribeiro, J. Lawler, R.O. Hynes, G.P. Boivin, and N. Bouck. 1998. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta 1 in vivo. *Cell.* 93:1159–1170. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81460-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81460-9)
- DeMaio, L., S.T. Buckley, M.S. Krishnaveni, P. Flodby, M. Dubourd, A. Banfalvi, Y. Xing, C. Ehrhardt, P. Minoo, B. Zhou, et al. 2012. Ligand-independent transforming growth factor- β type I receptor signalling mediates type I collagen-induced epithelial-mesenchymal transition. *J. Pathol.* 226:633–644. <http://dx.doi.org/10.1002/path.3016>
- Dennler, S., S. Itoh, D. Vivien, P. ten Dijke, S. Huet, and J.M. Gauthier. 1998. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J.* 17:3091–3100. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/17.11.3091>
- Egging, D., F. van den Berkmortel, G. Taylor, J. Bristow, and J. Schalkwijk. 2007a. Interactions of human tenascin-X domains with dermal extracellular matrix molecules. *Arch. Dermatol. Res.* 298:389–396. <http://dx.doi.org/10.1007/s00403-006-0706-9>
- Egging, D.F., A.C.T.M. Peeters, N. Grebenchtchikov, A. Geurts-Moespot, C.G.J. Sweep, M. den Heijer, and J. Schalkwijk. 2007b. Identification and characterization of multiple species of tenascin-X in human serum. *FEBS J.* 274:1280–1289. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05671.x>
- Elefteriou, F., J.Y. Exposito, R. Garrone, and C. Lethias. 1999. Cell adhesion to tenascin-X mapping of cell adhesion sites and identification of integrin receptors. *Eur. J. Biochem.* 263:840–848. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00563.x>
- Elefteriou, F., J.Y. Exposito, R. Garrone, and C. Lethias. 2001. Binding of tenascin-X to decorin. *FEBS Lett.* 495:44–47. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02361-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02361-4)
- Fujie, S., H. Maita, H. Ariga, and K. Matsumoto. 2009. Tenascin-X induces cell detachment through p38 mitogen-activated protein kinase activation. *Biol. Pharm. Bull.* 32:1795–1799. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.32.1795>
- Goodwin, A.E., and B.U. Pauli. 1995. A new adhesion assay using buoyancy to remove non-adherent cells. *J. Immunol. Methods.* 187:213–219. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00187-6](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(95)00187-6)
- Hogg, P.J. 2003. Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends Biochem. Sci.* 28:210–214. [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00057-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00057-4)
- Hynes, R.O. 2009. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science.* 326:1216–1219. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1176009>
- Inman, G.J., F.J. Nicolás, J.F. Callahan, J.D. Harling, L.M. Gaster, A.D. Reith, N.J. Laping, and C.S. Hill. 2002. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol. Pharmacol.* 62:65–74. <http://dx.doi.org/10.1124/mol.62.1.65>
- Kang, J.S., C. Liu, and R. Derynck. 2009. New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function. *Trends Cell Biol.* 19:385–394. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2009.05.008>
- Kim, S.-H., J. Turnbull, and S. Guimond. 2011. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J. Endocrinol.* 209:139–151. <http://dx.doi.org/10.1530/JOE-10-0377>
- Koenig, A., C. Mueller, C. Hasel, G. Adler, and A. Menke. 2006. Collagen type I induces disruption of E-cadherin-mediated cell-cell contacts and promotes proliferation of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.* 66:4662–4671. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2804>
- Lethias, C., F. Elefteriou, G. Parsiegla, J.Y. Exposito, and R. Garrone. 2001. Identification and characterization of a conformational heparin-binding site involving two fibronectin type III modules of bovine tenascin-X. *J. Biol. Chem.* 276:16432–16438. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M010210200>
- Lethias, C., A. Carisey, J. Comte, C. Cluzel, and J.-Y. Exposito. 2006. A model of tenascin-X integration within the collagenous network. *FEBS Lett.* 580:6281–6285. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2006.10.037>
- Mao, J.R., G. Taylor, W.B. Dean, D.R. Wagner, V. Afzal, J.C. Lotz, E.M. Rubin, and J. Bristow. 2002. Tenascin-X deficiency mimics Ehlers-Danlos syndrome in mice through alteration of collagen deposition. *Nat. Genet.* 30:421–425. <http://dx.doi.org/10.1038/ng850>
- Margaron, Y., L. Bostan, J.-Y. Exposito, M. Malbouyres, A.-M. Trunfio-Sfarghiu, Y. Berthier, and C. Lethias. 2010. Tenascin-X increases the stiffness of collagen gels without affecting fibrillogenesis. *Biophys. Chem.* 147:87–91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2009.12.011>
- Massagué, J. 2012. TGF β signalling in context. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13:616–630. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3434>
- Matsumoto, K., N. Takayama, J. Ohnishi, E. Ohnishi, Y. Shirayoshi, N. Nakatsuji, and H. Ariga. 2001. Tumour invasion and metastasis are promoted in mice deficient in tenascin-X. *Genes Cells.* 6:1101–1111. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00482.x>
- Matsumoto, K., T. Kinoshita, T. Hirose, and H. Ariga. 2006. Characterization of mouse serum tenascin-X. *DNA Cell Biol.* 25:448–456. <http://dx.doi.org/10.1089/dna.2006.25.448>
- Miyazono, K., A. Olofsson, P. Colosetti, and C.H. Heldin. 1991. A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J.* 10:1091–1101.
- Morissette, R., D.P. Merke, and N.B. McDonnell. 2014. Transforming growth factor- β (TGF- β) pathway abnormalities in tenascin-X deficiency associated with CAH-X syndrome. *Eur. J. Med. Genet.* 57:95–102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmg.2013.12.004>
- Moustakas, A., and C.-H. Heldin. 2009. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development.* 136:3699–3714. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.030338>
- Mu, D., S. Cambier, L. Fjellbirkeland, J.L. Baron, J.S. Munger, H. Kawakatsu, D. Sheppard, V.C. Broadbent, and S.L. Nishimura. 2002. The integrin α v β 8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF- β 1. *J. Cell Biol.* 157:493–507. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200109100>
- Munger, J.S., X. Huang, H. Kawakatsu, M.J.D. Griffiths, S.L. Dalton, J. Wu, J.-F. Pittet, N. Kaminski, C. Garat, M.A. Matthay, et al. 1999. The integrin α v β 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell.* 96:319–328. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80545-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80545-0)

- Murphy-Ullrich, J.E., S. Schultz-Cherry, and M. Höök. 1992. Transforming growth factor-beta complexes with thrombospondin. *Mol. Biol. Cell.* 3:181–188. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.3.2.181>
- Nakao, A., M. Afrakhte, A. Morén, T. Nakayama, J.L. Christian, R. Heuchel, S. Itoh, M. Kawabata, N.E. Heldin, C.H. Heldin, and P. ten Dijke. 1997. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature.* 389:631–635. <http://dx.doi.org/10.1038/39369>
- Nelson, C.M., and M.J. Bissell. 2006. Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22:287–309. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.cellbio.22.010305.104315>
- Nunes, I., P.E. Gleizes, C.N. Metz, and D.B. Rifkin. 1997. Latent transforming growth factor- β binding protein domains involved in activation and transglutaminase-dependent cross-linking of latent transforming growth factor- β . *J. Cell Biol.* 136:1151–1163. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.136.5.1151>
- Piek, E., A. Moustakas, A. Kurisaki, C.H. Heldin, and P. ten Dijke. 1999. TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J. Cell Sci.* 112:4557–4568.
- Pommier, R.M., J. Gout, D.F. Vincent, C.E. Cano, B. Kaniewski, S. Martel, J. Rodriguez, G. Fourel, U. Valcourt, J.C. Marie, et al. 2012. The human NUPR1/P8 gene is transcriptionally activated by transforming growth factor β via the SMAD signalling pathway. *Biochem. J.* 445:285–293.
- Popova, S.N., M. Barczyk, C.-F. Tiger, W. Beertsen, P. Zigrino, A. Aszodi, N. Miosge, E. Forsberg, and D. Gullberg. 2007. Alpha11 beta1 integrin-dependent regulation of periodontal ligament function in the erupting mouse incisor. *Mol. Cell. Biol.* 27:4306–4316. <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00041-07>
- Ribeiro, S.M., M. Poczatek, S. Schultz-Cherry, M. Villain, and J.E. Murphy-Ullrich. 1999. The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* 274:13586–13593. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.19.13586>
- Rogier, E., A. Durrbach, L. Abecassis, S. Ferlicot, R. Snanoudj, S. Baudreuil, N. Arzouk, A. Vazquez, B. Charpentier, and M.-F. Bourgeade. 2005. A novel biological assay to detect the active form of TGF-beta in urine to monitor renal allograft rejection. *Kidney Int.* 68:1875–1883. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00607.x>
- Schalkwijk, J., M.C. Zweers, P.M. Steijlen, W.B. Dean, G. Taylor, I.M. van Vlijmen, B. van Haren, W.L. Miller, and J. Bristow. 2001. A recessive form of the Ehlers-Danlos syndrome caused by tenascin-X deficiency. *N. Engl. J. Med.* 345:1167–1175. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa002939>
- Schmittgen, T.D., and K.J. Livak. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3:1101–1108. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Schultz-Cherry, S., and J.E. Murphy-Ullrich. 1993. Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor- β secreted by endothelial cells by a novel mechanism. *J. Cell Biol.* 122:923–932. (published erratum appears in *J. Cell Biol.* 1993.122:1149) <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.122.4.923>
- Schultz-Cherry, S., J. Lawler, and J.E. Murphy-Ullrich. 1994. The type 1 repeats of thrombospondin 1 activate latent transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* 269:26783–26788.
- Shintani, Y., M.J. Wheelock, and K.R. Johnson. 2006. Phosphoinositide-3 kinase-Rac1-c-Jun NH2-terminal kinase signaling mediates collagen I-induced cell scattering and up-regulation of N-cadherin expression in mouse mammary epithelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 17:2963–2975. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E05-12-1123>
- Shintani, Y., Y. Fukumoto, N. Chaika, R. Svoboda, M.J. Wheelock, and K.R. Johnson. 2008a. Collagen I-mediated up-regulation of N-cadherin requires cooperative signals from integrins and discoidin domain receptor 1. *J. Cell Biol.* 180:1277–1289. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200708137>
- Shintani, Y., M. Maeda, N. Chaika, K.R. Johnson, and M.J. Wheelock. 2008b. Collagen I promotes epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer cells via transforming growth factor-beta signaling. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 38:95–104. <http://dx.doi.org/10.1165/rcmb.2007-0071OC>
- Stegemann, C., A. Didangelos, J. Barallobre-Barreiro, S.R. Langley, K. Mandal, M. Jahangiri, and M. Mayr. 2013. Proteomic identification of matrix metalloproteinase substrates in the human vasculature. *Circ. Cardiovasc. Genet.* 6:106–117. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.112.964452>
- Taipale, J., K. Miyazono, C.H. Heldin, and J. Keski-Oja. 1994. Latent transforming growth factor- β 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF- β binding protein. *J. Cell Biol.* 124:171–181. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.124.1.171>
- Taipale, J., J. Saharinen, K. Hedman, and J. Keski-Oja. 1996. Latent transforming growth factor-beta 1 and its binding protein are components of extracellular matrix microfibrils. *J. Histochem. Cytochem.* 44:875–889. <http://dx.doi.org/10.1177/44.8.8756760>
- ten Dijke, P., and H.M. Arthur. 2007. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:857–869. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2262>
- Thiery, J.P., H. Acloque, R.Y.J. Huang, and M.A. Nieto. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 139:871–890. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>
- Thuault, S., U. Valcourt, M. Petersen, G. Manfioletti, C.-H. Heldin, and A. Moustakas. 2006. Transforming growth factor- β employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* 174:175–183. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200512110>
- Thuault, S., E.-J. Tan, H. Peinado, A. Cano, C.-H. Heldin, and A. Moustakas. 2008. HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition. *J. Biol. Chem.* 283:33437–33446. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M802016200>
- Tiger, C.F., F. Fougerousse, G. Grundström, T. Velling, and D. Gullberg. 2001. alpha1beta1 integrin is a receptor for interstitial collagens involved in cell migration and collagen reorganization on mesenchymal nonmuscle cells. *Dev. Biol.* 237:116–129. <http://dx.doi.org/10.1006/dbio.2001.0363>
- Tucker, R.P., K. Drabikowski, J.F. Hess, J. Ferralli, R. Chiquet-Ehrismann, and J.C. Adams. 2006. Phylogenetic analysis of the tenascin gene family: evidence of origin early in the chordate lineage. *BMC Evol. Biol.* 6:60. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-6-60>
- Valcourt, U., M. Kowanetz, H. Niimi, C.-H. Heldin, and A. Moustakas. 2005. TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol. Biol. Cell.* 16:1987–2002. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E04-08-0658>
- Valcourt, U., S. Thuault, K. Pardali, C.-H. Heldin, and A. Moustakas. 2007. Functional role of Meox2 during the epithelial cytotatic response to TGF-beta. *Mol. Oncol.* 1:55–71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molonc.2007.02.002>
- Veit, G., U. Hansen, D.R. Keene, P. Bruckner, R. Chiquet-Ehrismann, M. Chiquet, and M. Koch. 2006. Collagen XII interacts with avian tenascin-X through its NC3 domain. *J. Biol. Chem.* 281:27461–27470. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M603147200>
- Velling, T., M. Kusche-Gullberg, T. Sejersen, and D. Gullberg. 1999. cDNA cloning and chromosomal localization of human alpha(11) integrin. A collagen-binding, I domain-containing, beta(1)-associated integrin alpha-chain present in muscle tissues. *J. Biol. Chem.* 274:25735–25742. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.36.25735>
- Verrecchia, F., and A. Mauviel. 2002. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J. Invest. Dermatol.* 118:211–215. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.2002.01641.x>
- Wipff, P.-J., and B. Hinz. 2008. Integrins and the activation of latent transforming growth factor beta1 - an intimate relationship. *Eur. J. Cell Biol.* 87:601–615. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2008.01.012>
- Wipff, P.-J., D.B. Rifkin, J.-J. Meister, and B. Hinz. 2007. Myofibroblast contraction activates latent TGF- β 1 from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 179:1311–1323. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200704042>
- Wu, M.Y., and C.S. Hill. 2009. Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis. *Dev. Cell.* 16:329–343. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2009.02.012>
- Zhang, W.-M., J. Kapyla, J.S. Puranen, C.G. Knight, C.-F. Tiger, O.T. Pentikainen, M.S. Johnson, R.W. Farndale, J. Heino, and D. Gullberg. 2003. alpha 11beta 1 integrin recognizes the GFOGER sequence in interstitial collagens. *J. Biol. Chem.* 278:7270–7277. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M210313200>
- Zweers, M.C., I.M. van Vlijmen-Willems, T.H. van Kuppevelt, R.P. Mecham, P.M. Steijlen, J. Bristow, and J. Schalkwijk. 2004. Deficiency of tenascin-X causes abnormalities in dermal elastic fiber morphology. *J. Invest. Dermatol.* 122:885–891. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22401.x>

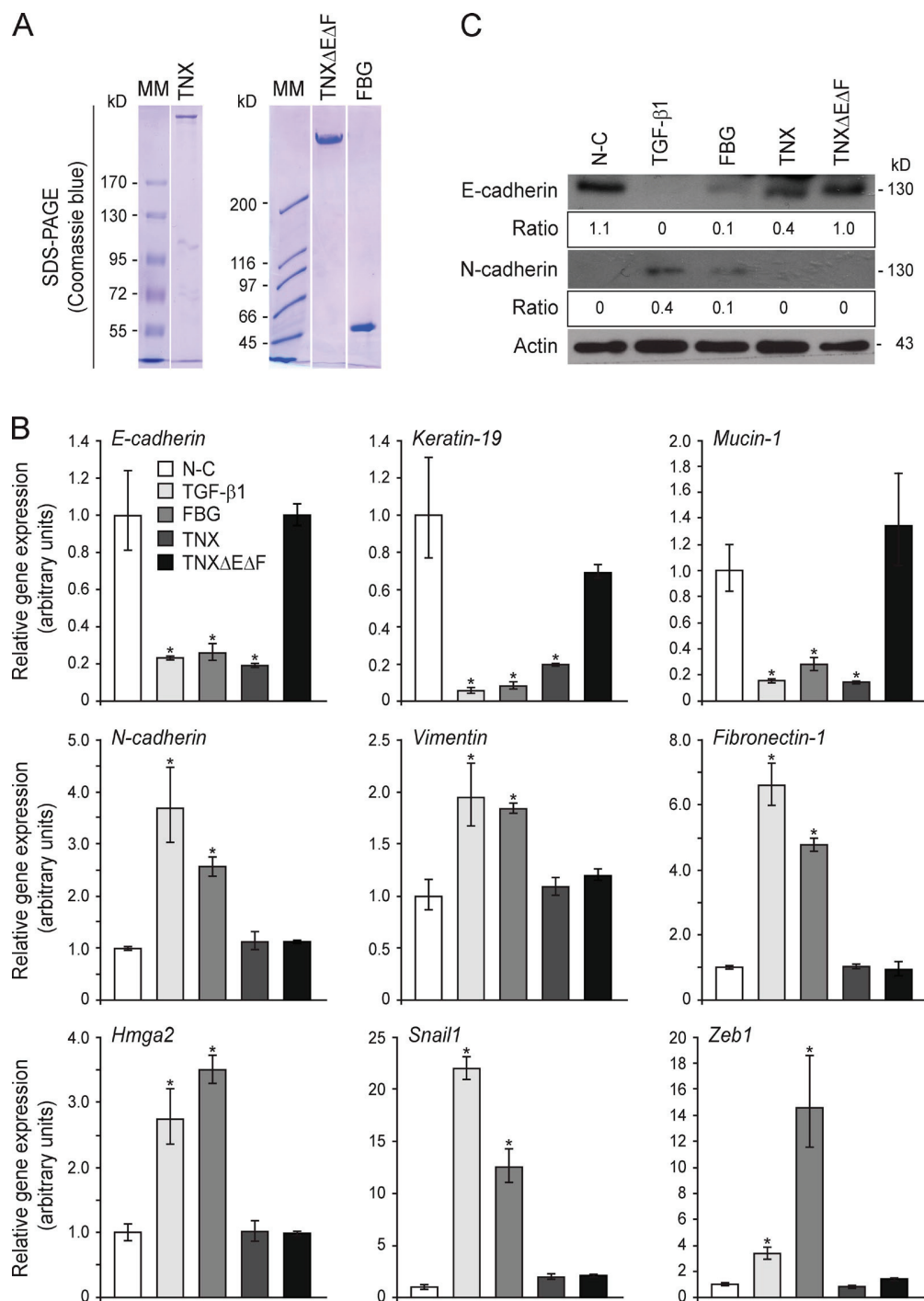
Alcaraz et al., <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.201308031/DC1>

Figure S1. **Recombinant TNX fragments differentially regulate EMT in mammary epithelial cells.** (A) SDS-PAGE analysis of the purified recombinant proteins used in this study. Purified full-length TNX, the TNXΔEΔF fragment, and the FBG domain were loaded on 8% acrylamide gels under reducing conditions. MM, molecular mass markers. (B) Quantitative real-time RT-PCR analysis of known EMT markers and regulators in NMuMG cells cultured for 48 h onto noncoated dishes (N-C) or dishes coated with one of the following (111 pmol/cm²) recombinant proteins: full-length TNX, a TNX derivative consisting of only the FNIII modules (TNXΔEΔF), or the FBG domain. As a control, NMuMG cells were stimulated for 48 h with 2 ng/ml of recombinant human TGF-β1. Error bars are means ± SD. * P < 0.05 versus noncoated condition. (C) Immunoblots showing levels of E-cadherin and N-cadherin in NMuMG cells incubated for 48 h as described in B. Ratios of E-cadherin or N-cadherin to actin levels after densitometric analyses of the corresponding signals are indicated below each lane.

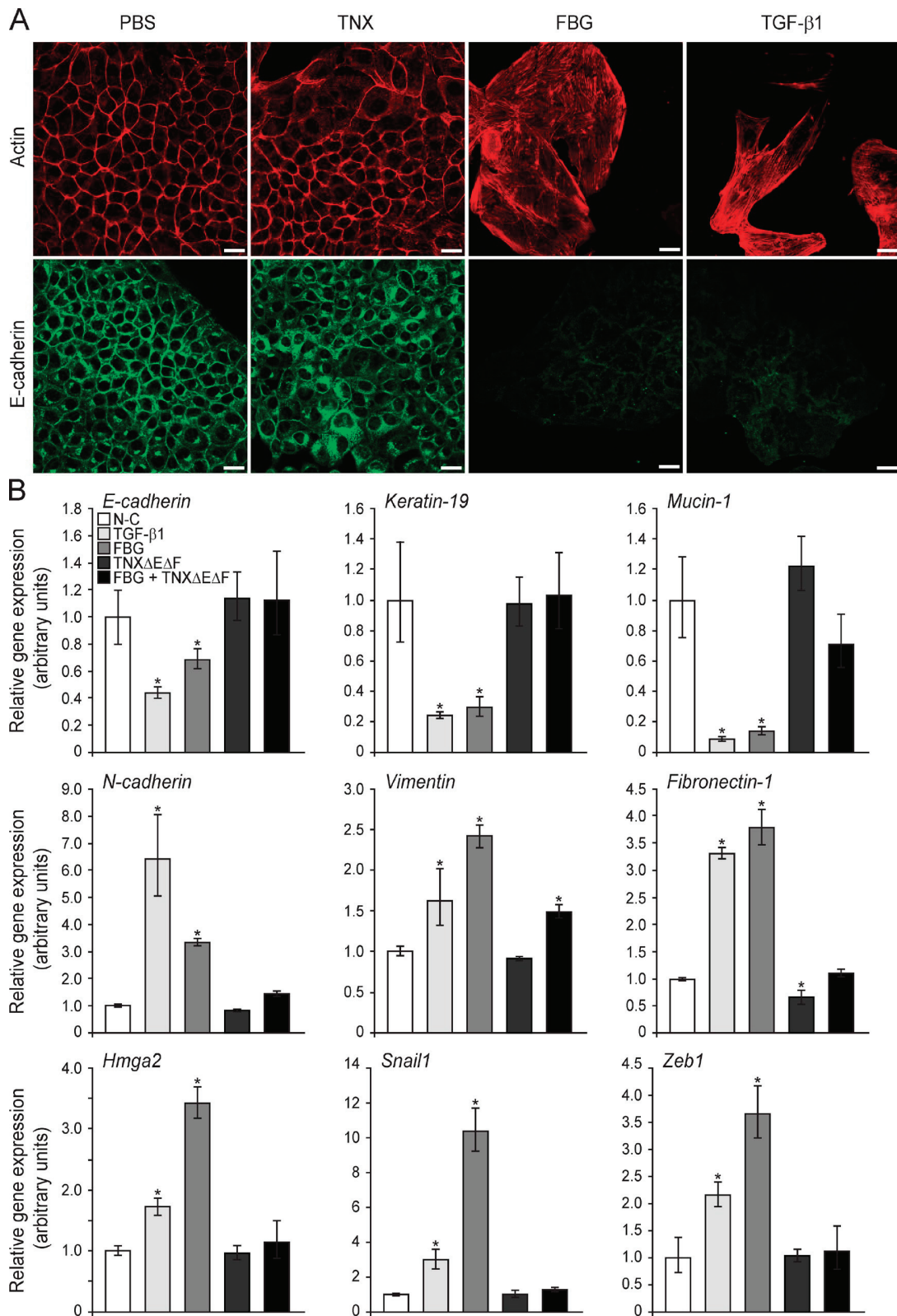


Figure S2. **The FNIII repeat-containing region of TNX molecule inhibits the EMT induced by FBG domain in mammary epithelial cells.** (A) F-actin direct fluorescence and E-cadherin indirect immunofluorescence performed in NMuMG cells cultured for 48 h in the presence of soluble recombinant TNX fragments (111 nM), the corresponding vehicle (PBS), or the recombinant human TGF-β1 (2 ng/ml). Bars, 15 μm. (B) Quantitative real-time RT-PCR analysis of known EMT markers and regulators in NMuMG cells cultured for 48 h in noncoated dishes (N-C) or dishes coated (111 pmol/cm²) with the recombinant TNXΔEΔF fragment alone, the FBG domain alone, or both recombinant proteins (111 pmol/cm² each). As a control, NMuMG cells were stimulated for 48 h with 2 ng/ml of recombinant human TGF-β1. Error bars are means ± SD. *, P < 0.05 versus noncoated condition.

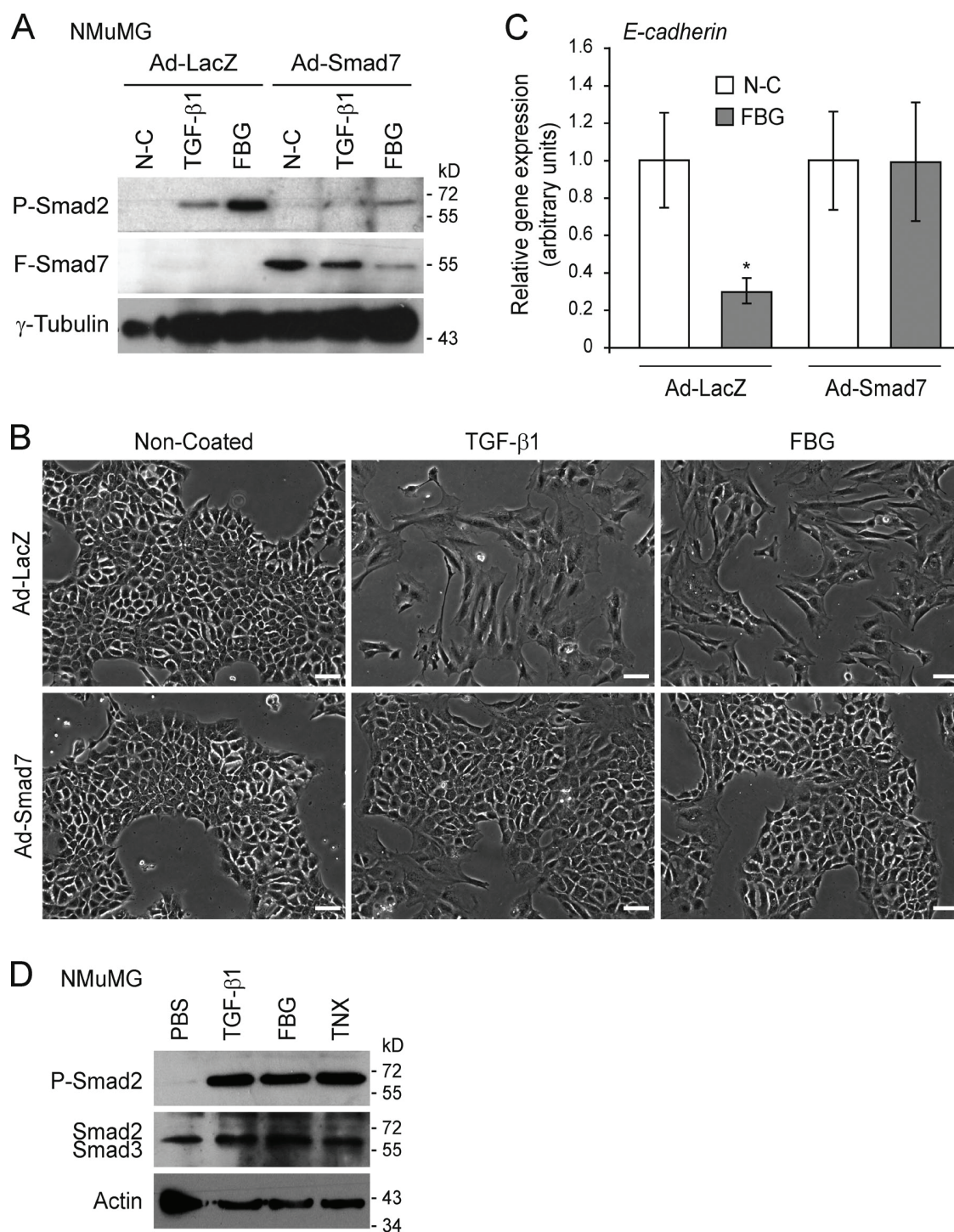


Figure S3. **The FBG domain of TNX employs the T β RI-Smad signaling pathway to trigger an EMT in mouse mammary epithelial cells.** (A) Immunoblot analyses showing levels of phospho-Smad2 (P-Smad2) and Flag-tagged Smad7 (F-Smad7) in NMuMG cells infected for 24 h with an adenovirus (multiplicity of infection 100) encoding either β -galactosidase (Ad-LacZ) or Smad7 (Ad-Smad7) and either seeded onto noncoated (N-C) dishes or dishes containing immobilized recombinant FBG domain (222 pmol/cm²) and incubated for another 24 h or treated with 5 ng/ml of soluble TGF- β 1 for the same time period. (B) Phase-contrast images of NMuMG cells infected for 24 h with LacZ- or Smad7-encoding adenovirus and either seeded onto noncoated or 222 pmol/cm² FBG-coated dishes and incubated for 36 h or treated with 5 ng/ml of soluble TGF- β 1 for the same time period. Bars, 30 μ m. (C) Quantitative real-time RT-PCR analysis of *E-cadherin* gene expression in NMuMG cells infected with LacZ- or Smad7-encoding adenovirus, seeded 24 h later onto noncoated or 222 pmol/cm² FBG-coated dishes, and cultured for another 24 h before isolation of total RNA. Error bars are means \pm SD. *, $P < 0.05$ versus noncoated condition. (D) Immunoblot analyses showing levels of phospho-Smad2 (P-Smad2) and total-Smad2/3 proteins in NMuMG cells cultured for 3 h in the presence of soluble recombinant TNX fragments (111 nM), the corresponding vehicle (PBS), or the recombinant human TGF- β 1 (2 ng/ml).

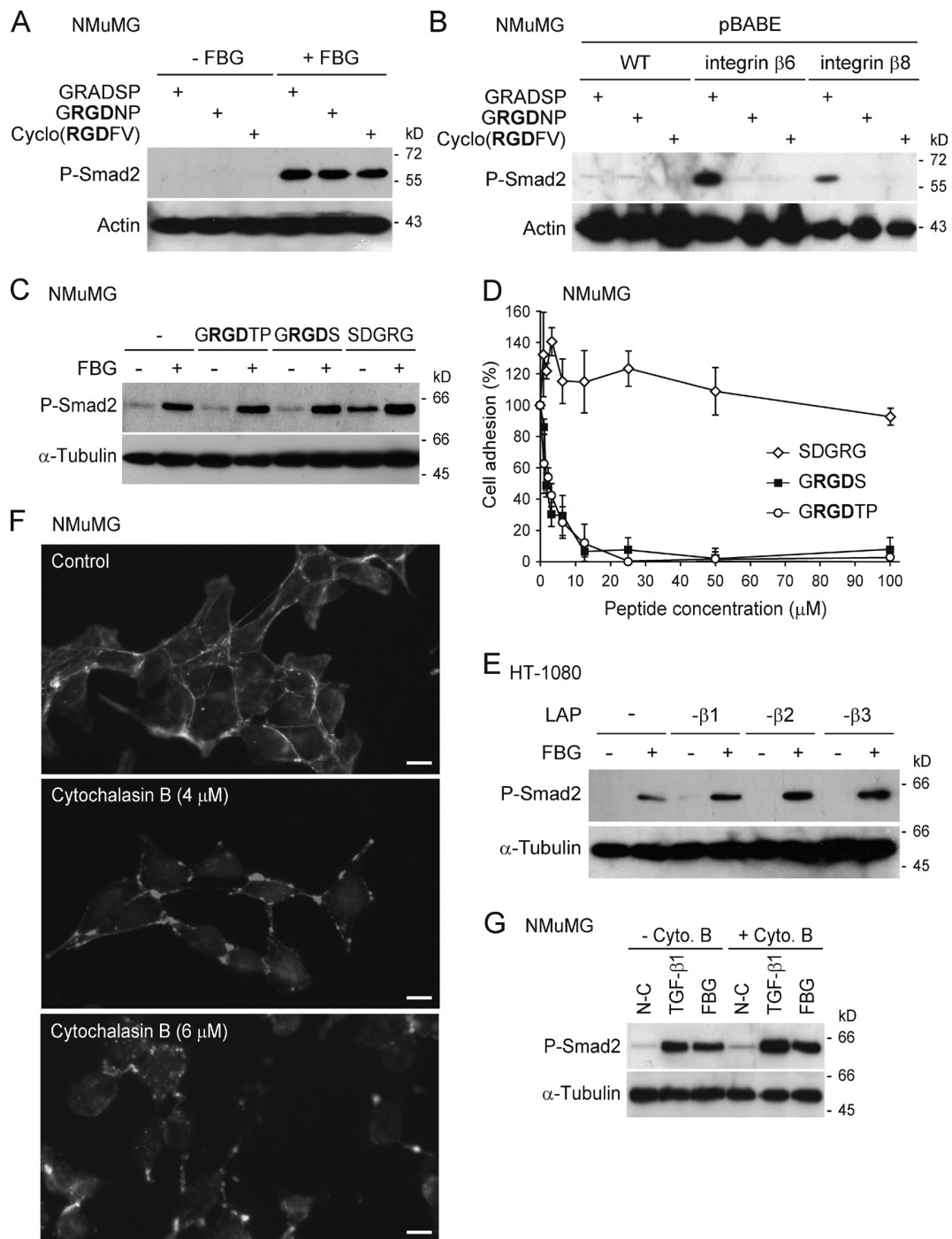


Figure S4. **FBG-mediated activation of latent TGF- β does not require either RGD-dependent integrins or an intact cytoskeleton.** (A) Level of phosphorylated Smad2 (P-Smad2) protein in NMuMG cells seeded (+) or not seeded (-) onto immobilized recombinant FBG domain (222 pmol/cm²) and cultured for 3 h in the presence of control peptide (GRADSP) or linear (GRGDNP) or cyclic (Cyclo(RGDFV)) RGD peptide (100 μ M). (B) Level of phospho-Smad2 in NMuMG cells stably infected with lentiviral particles containing either wild-type (WT) pBABE vector or a vector encoding the integrin $\beta 6$ or integrin $\beta 8$ chain and cultured for 3 h in the presence of control peptide (GRADSP) or linear (GRGDNP) or cyclic (Cyclo(RGDFV)) RGD peptide (100 μ M). (C) Level of phosphorylated Smad2 in NMuMG cells seeded (+) or not seeded (-) onto immobilized recombinant FBG domain (222 pmol/cm²) and cultured for 3 h in the absence (-) or presence of control (SDGRG) or linear (GRGDTP and GRGDS) RGD peptide (100 μ M). (D) Adhesion assay of NMuMG cells seeded onto 10 μ g/cm² of recombinant fibronectin type III domains 9 and 10 of TNX harboring an RGD sequence, in the presence of increasing concentrations of control (SDGRG) or linear RGD (GRGDTP and GRGDS) peptides. Results are expressed as the percentage of cell adhesion relative to the condition without peptide, and each point represents the mean of triplicate determinations with bars corresponding to standard error. (E) Level of phosphorylated Smad2 in HT-1080 cells transfected with the wild-type vector (-) or a vector expressing LAP($\beta 1$), LAP($\beta 2$), or LAP($\beta 3$) and cultured (+) or not cultured (-) with 25 μ g/ml of soluble FBG domain for 3 h. (F) Direct F-actin fluorescence staining of NMuMG cells cultured for 30 min in the presence of cytochalasin B (at the indicated concentration) or vehicle (DMSO; control). Bars, 10 μ m. (G) Level of phospho-Smad2 in NMuMG cells cultured for 3 h in a noncoated dish (N-C) or a dish containing immobilized recombinant FBG domain (222 pmol/cm²) or stimulated with 5 ng/ml of soluble recombinant TGF- $\beta 1$ in the presence of 1 μ M cytochalasin B (Cyto. B) or vehicle (DMSO).

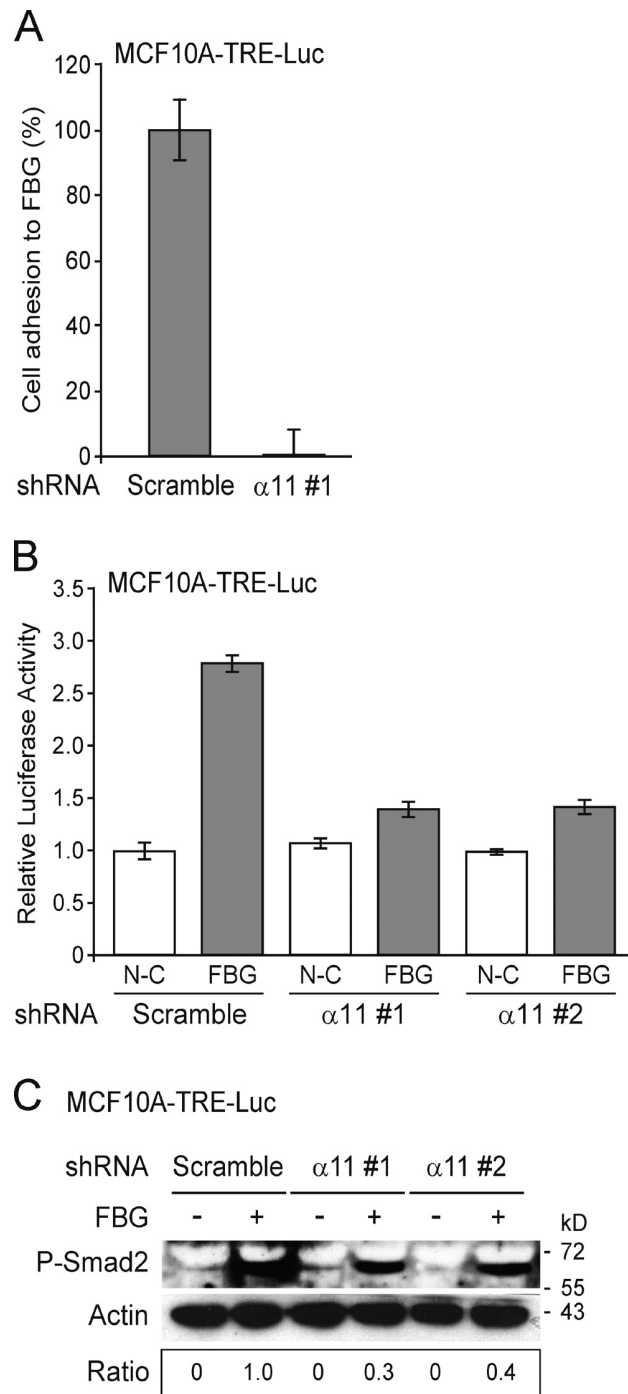


Figure S5. **Down-regulation of *ITGA11* expression impairs FBG-mediated activation of latent TGF- β in mammary epithelial cells.** (A) Adhesion analysis of MCF10A-TRE-Luc cells transiently expressing a scrambled shRNA or an shRNA targeting *ITGA11* mRNA ($\alpha 11$ #1) and cultured for 30 min after seeding onto wells coated with 222 pmol/cm² of recombinant FBG domain. Results represent percentage of cell adhesion relative to the scramble shRNA condition. (B) Firefly luciferase activity of MCF10A-TRE-Luc cells transiently transfected with a scrambled or *ITGA11*-targeting shRNA ($\alpha 11$ #1 or #2) and cultured for 16 h after seeding or not (N-C) onto coated recombinant FBG domain (222 pmol/cm²). (C) Immunoblotting of phospho-Smad2 from MCF10A-TRE-Luc cells treated for 3 h as in B. Ratios of phospho-Smad2 (P-Smad2) to actin levels after densitometric analyses of the corresponding signals are indicated below. Error bars are means \pm SD.

ANNEXES BIBLIOGRAPHIQUES

PARTIE I :
LES POINTS DE CONTROLE
DU CYCLE CELLULAIRE ET
LA PROGRESSION MITOTIQUE

A. Points de contrôle du cycle cellulaire

1. Le point de contrôle des dommages à l'ADN

Ce point de contrôle, aussi appelé DDCP (*DNA Damage CheckPoint*) intervient pendant les phases G1, S, G2 et M, afin de stopper le cycle cellulaire si une altération de l'ADN (cassure, mésappariement) est détectée (**Figure 50**). À chaque type d'altération correspond un mécanisme de réparation spécifique : **(1)** les cassures double brin, **(2)** les cassures simple brin et **(3)** les mésappariements de nucléotides.

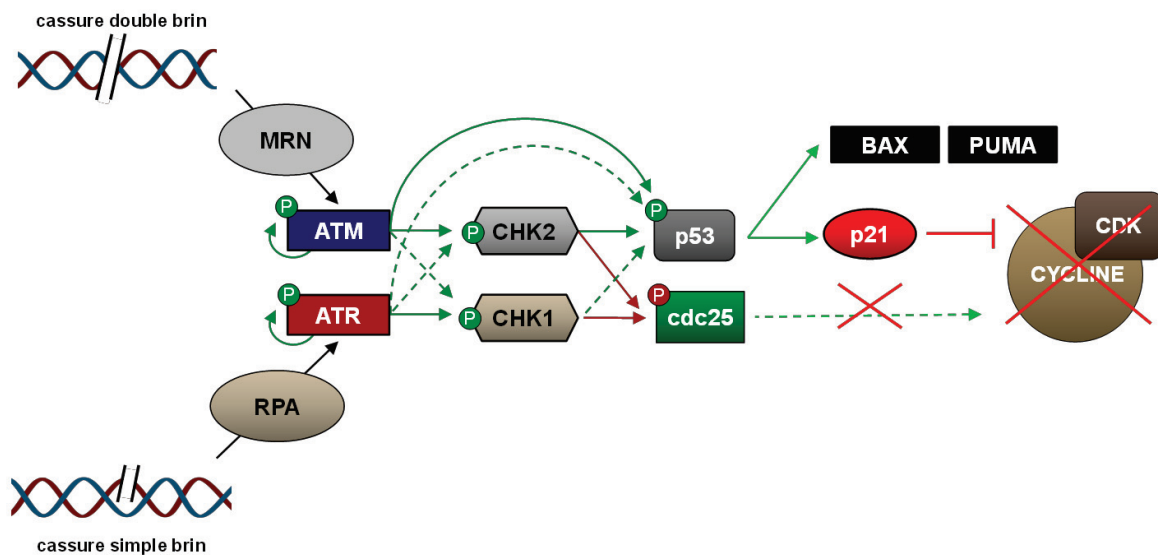


Figure 50 : Mécanismes moléculaires du point de contrôle des dommages à l'ADN (P: phosphorylation activatrice ; P: phosphorylation inhibitrice).

(1) Une cassure double brin va interagir avec le complexe MRN (*Mre11, Rad50 and Nbs*) activant ainsi la kinase ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated protein*). **(2)** Une cassure simple brin va, quant à elle, lier la protéine RPA (*Replication Protein A*) qui permettra le recrutement de la kinase ATR (*ATM and Rad3 Related protein*). ATM et ATR activeront à leur tour les kinases Chk1 et Chk2 (*Checkpoint Kinase*). ATM semble posséder une préférence d'interaction avec la kinase Chk2, à l'inverse d'ATR qui active préférentiellement la kinase Chk1. Ces kinases induisent toutes deux la phosphorylation de la phosphatase cdc25a sur son résidu Sérine 123 menant à sa dégradation. De plus, Chk1 et Chk2 phosphorylent cdc25c entraînant son inactivation et sa séquestration cytosolique par les protéines 14-3-3. Ainsi, les phosphatases cdc25 perdent leur capacité

à activer les complexes Cycline/CDK. D'autre part, Chk1 et Chk2, ainsi que les kinases ATM et ATR phosphorylent p53, permettant sa stabilisation *via* la diminution de son affinité pour l'E3-Ubiquitine ligase MDM2, ainsi que l'activation de son domaine de transactivation. Ces phosphorylations permettent ainsi l'induction de l'expression du CKI p21. **(3)** Les mésappariements dans la séquence nucléotidique résultant de la duplication erronée de certains nucléotides, sont détectés par les systèmes de réparation MMR (*Methyl-directed Mismatch Repair*) et NER (*Nucleotide Excision Repair*). Ces derniers permettent l'excision du ou des nucléotides mal appariés, engendrant ainsi la formation d'un ADN simple brin qui sera réparé par la voie ATR (Abraham, 2001; Bartek and Lukas, 2001, 2007; Branzei and Foiani, 2008; Drané et al., 2002; Kastan and Bartek, 2004; Kuntz and Connell, 2009; Lukas et al., 2004).

2. Le point de contrôle de la réplication

La réplication du génome s'effectue pendant la phase S. C'est un processus hautement surveillé afin d'assurer que les deux brins d'ADN néoformés soient complets et identiques. Le point de contrôle de la réplication, aussi appelé RCP (*Replication CheckPoint*), intervient en phase S et G2. Il détecte les fourches de réplication dont la progression a été stoppée par des anomalies de différents types (cassure simple brin, mésappariements de nucléotides, absence de nucléotides à intégrer...) (**Figure 51**).

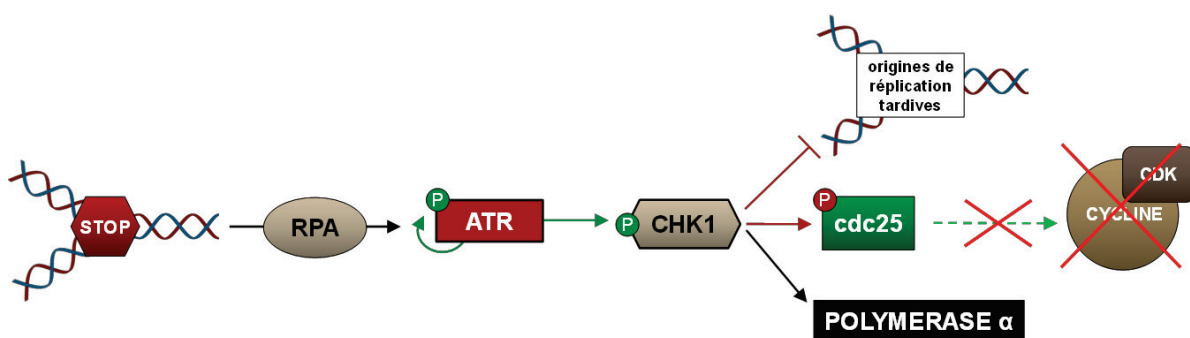


Figure 51 : Mécanismes moléculaires du point de contrôle de la réplication
 (P vert : phosphorylation activatrice ; P rouge : phosphorylation inhibitrice).

Le complexe de polymérisation est composé de différentes sous-unités. Parmi elles, la polymérase δ , la polymérase ϵ et l'hélicase progressent de manière coordonnée le long des fourches en mouvement, pour permettre l'ouverture de la double hélice (hélicase) et

la polymérisation du nouveau brin d'ADN (polymérase). Lorsqu'une altération est détectée, les polymérase δ et ϵ s'immobilisent, stoppant ainsi la fourche de réplication. L'hélicase va néanmoins poursuivre sa progression en aval, en continuant de séparer les deux brins. Ce découplage va entraîner l'apparition de longues portions d'ADN simple brin, reconnues par la protéine RPA, qui activera par la suite les kinases ATR et Chk1. Leur activation permettra le recrutement de la polymérase α , afin de combler les zones d'ADN simple brin par des amorces d'ARN. La voie RPA/ATR/Chk1 va également inhiber l'initiation d'origines de réplication plus tardives et bloquer la progression du cycle cellulaire en inhibant les phosphatases cdc25 (Bartek and Lukas, 2001; Bartek et al., 2004; Bertoli et al., 2013; Brnzei and Foiani, 2010; Kastan and Bartek, 2004; Segurado and Tercero, 2009).

3. Le point de contrôle de décaténation de l'ADN

Lors de la réplication, les chromatides sœurs peuvent s'enrouler entre elles et s'entremêler, créant ainsi des nœuds, nommés « caténanes », liant les deux molécules. Le mécanisme de décaténation permet le désenroulement des deux brins d'ADN fils à la fin de la réplication, *via* l'activité de l'enzyme **topoisomérase II**, et est indispensable à une ségrégation correcte des chromosomes. En effet, si la décaténation n'est pas efficace, la séparation des chromatides sœurs lors de l'anaphase entraînera alors des cassures chromosomiques au niveau des caténanes. La présence de brin d'ADN entrecroisés appartenant à des chromatides sœurs est une anomalie activant le point de contrôle de la décaténation.

Ce point de contrôle induit l'activation de la kinase **ATR** ayant la capacité d'inhiber l'activité kinase de la protéine **PLK1**. Celle-ci ne pourra alors plus phosphoryler de façon activatrice les complexes Cycline/CDK et bloque le cycle cellulaire en phase G2, jusqu'à ce que les chromatides sœurs soient correctement individualisées par l'action de la **topoisomérase II** (Damelin and Bestor, 2006, 2007; Damelin et al., 2005; Deming et al., 2001, 2002; Downes et al., 1994).

4. Le point de contrôle de l'antéphase

L'antéphase se situe entre la phase G2 et la phase M et correspond à l'initiation de la condensation des chromosomes. À cet instant du cycle cellulaire intervient un nouveau point de contrôle : le point de contrôle de l'antéphase. Il peut être activé suite à diverses anomalies : dommages à l'ADN, défauts de réplication ou stress induit par des agents déstabilisant les microtubules. Il provoque la décondensation des chromosomes par le biais de l'E3-Ubiquitine ligase **Chfr** (*C*heckpoint with *F*orkhead and *R*ing finger domains), induisant la dégradation de la kinase **PLK1** qui ne pourra plus activer les complexes Cycline/CDK, conduisant à un arrêt du cycle cellulaire. De plus, ce point de contrôle permet l'activation de la kinase **p38**, entraînant un blocage du cycle cellulaire et permettant la mise en place d'un programme pro-apoptotique (Chin and Yeong, 2010; Cuadrado and Nebreda, 2010; Kang et al., 2014; Matsusaka and Pines, 2004).

Ce point de contrôle exerce son action de façon très limitée dans le temps. En effet, durant cette étape, deux complexes Cycline/CDK sont actifs : Cycline A/CDK1 et Cycline B/CDK1. Le complexe Cycline A/CDK1 permet l'activation du complexe Cycline B/CDK1 *via* la phosphorylation inhibitrice de la kinase WEE1 (voir paragraphe I-A-2-iii concernant les bases moléculaires de la phase G2). Puis, la Cycline B permet son auto-activation en phosphorylant la phosphatase cdc25c et la Cycline A est dégradée en phase M précoce grâce à l'action du complexe APC/C-cdc20 (voir paragraphe I-B-2-ii concernant l'inhibition du complexe APC/C-cdc20 par le SAC). Une hypothèse envisagée est que la cellule pourrait décondenser ses chromosomes seulement tant que l'activité du complexe Cycline B/CDK1 est subordonnée à celle de la Cycline A/CDK1. En effet, lorsque le complexe Cycline B/CDK1 devient indépendant du complexe Cycline A/CDK1, la cellule ne peut plus retourner en phase G2 et initie la mitose de façon irrémédiable (Chin and Yeong, 2010). L'antéphase pourrait alors être désignée comme le « point de restriction » de l'entrée en phase M.

B. Différentes phases de la mitose

1. Prophase et pro-métaphase

Au début de la mitose, la cellule doit mettre en place une structure protéique responsable de la division du matériel génétique de la cellule mère : le fuseau mitotique. Il est constitué d'un faisceau de microtubules issus des centrosomes localisés aux deux pôles de la cellule.

i. Séparation et migration des centrosomes

Le centrosome est une structure spécialisée dans l'organisation des microtubules, composée de deux centrioles disposés perpendiculairement et entourés d'un large nombre de protéines centromériques regroupées sous le nom de « matériel péricentriolaire » (PCM, *PeriCentriolar Material*) (Nigg, 2002; Schatten, 2008).

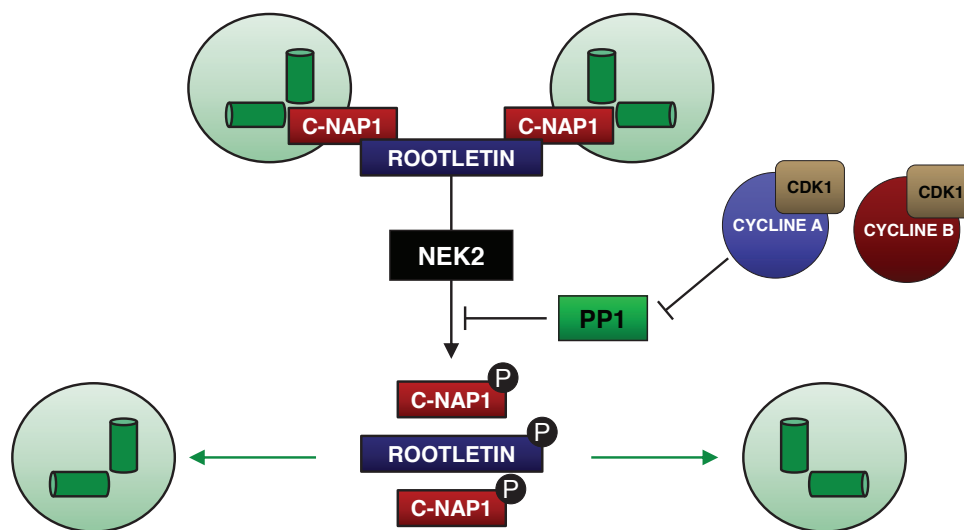


Figure 52 : Mécanismes moléculaires permettant la séparation des centrosomes (P: phosphorylation).

Après la duplication centrosomale au cours des phases S et G2, les centrosomes pères et fils restent connectés par l'intermédiaire de deux protéines : C-NAP1 (*Centrosomal Nek2-Associated Protein 1*) et Rootletin. Lors de l'entrée en mitose, les complexes Cycline A-B/CDK1 inhibent la phosphatase PP1 (*Protein Phosphatase 1*), permettant ainsi à la kinase Nek2 (*NIMA (Never In Mitosis gene A)-related kinase 2*) de phosphoryler les protéines centromériques C-NAP1 et Rootletin. Ces dernières se dissocient alors des

centrioles pères permettant ainsi la séparation des deux centrosomes (**Figure 52**) (Bahe et al., 2005; Mayor et al., 2002).

Après leur séparation, les centrosomes polymérisent des microtubules et migrent de chaque côté de la cellule, juste avant la disparition de l'enveloppe nucléaire (**Figure 53**) (Tanenbaum and Medema, 2010). Pour cela, une des premières forces mises en jeu est celle des microtubules eux-mêmes qui, en se polymérisant, « poussent » le centrosome dont ils ne sont pas issus (**1**) (Cytrynbaum et al., 2003; Dogterom et al., 2005; Holy et al., 1997). De plus, deux moteurs moléculaires interviennent principalement : la kinésine Eg5 (se déplaçant vers l'extrémité positive des microtubules) et la dynéine (se déplaçant vers l'extrémité négative des microtubules). Après dimérisation, la kinésine Eg5 se fixe sur les microtubules antiparallèles (provenant de deux centrosomes différents) et se déplace vers leurs extrémités positives, afin d'écarter les deux centrosomes (**2**) (Kapitein et al., 2005; Sawin et al., 1992). La dynéine, quant à elle, s'associe au cortex cellulaire et tend à se déplacer vers les extrémités négatives des microtubules (c'est-à-dire vers le centrosome) (**3**) (Cytrynbaum et al., 2003; Gönczy et al., 1999). Ainsi, la dynéine « tire » les centrosomes vers les bords de la cellule. Elle peut également s'associer aux microtubules antiparallèles et induire un rapprochement des centrosomes (**4**) (Tanenbaum et al., 2008). C'est donc un équilibre dynamique complexe entre des forces exercées dans des sens opposés qui permet la migration des centrosomes, et ainsi la création des deux pôles du fuseau mitotique (Tanenbaum and Medema, 2010).

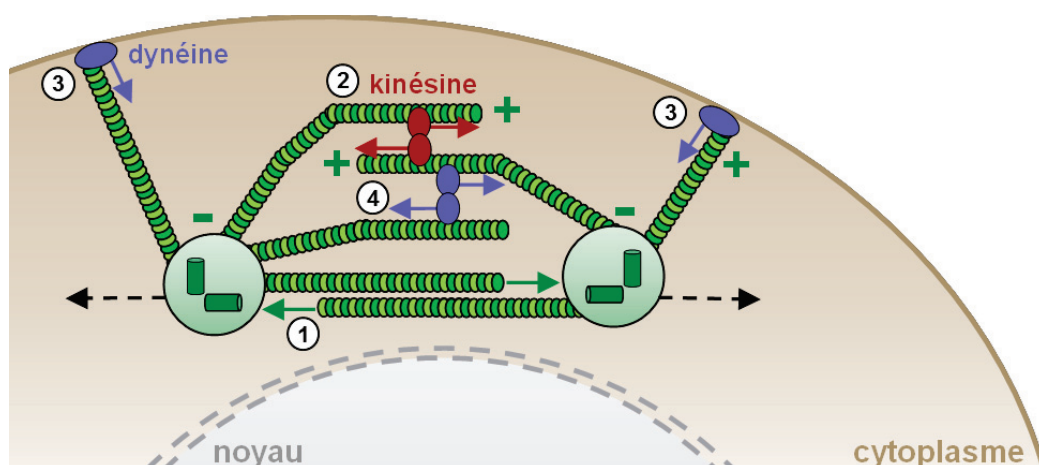


Figure 53 : Migration des centrosomes.

Après leur séparation, les centrosomes polymérisent les microtubules du fuseau mitotique. Les centrosomes s'associent alors avec la protéine NuMA (*Nuclear Mitotic Apparatus protein*) dont la localisation centromérique est dépendante de sa phosphorylation par le complexe Cycline B/CDK1. NuMA permet la stabilisation des extrémités négatives des microtubules au niveau des centrosomes. Elle intervient également dans les interactions entre les microtubules, permettant la mise en place, l'organisation et la stabilisation du fuseau mitotique (Schatten, 2008).

ii. Condensation des chromosomes et cohésion des chromatides sœurs

Parallèlement, les chromosomes vont se condenser pour donner naissance aux chromosomes métaphasiques. Le compactage des chromosomes fait intervenir les **complexes protéiques pentamériques Condensine I et II**, composés de **2 protéines SMC** (SMC2 and SMC4) (*Structural Maintenance of Chromosome*) et de **3 protéines non-SMC** (CAP-H, CAP-G et CAP-D pour la Condensine I et CAPH-H2, CAP-G2 et CAPD3 pour la Condensine II). Ces complexes ont la capacité de se fixer à l'ADN et de s'enrouler autour de la chromatine grâce à leur activité ATPase, afin d'induire la condensation des chromosomes (Baxter and Aragón, 2012; Hirano, 2005a, 2005b; Vagnarelli, 2012). Leur activation est dépendante de leur phosphorylation : les complexes Cycline A/CDK1 et Cycline B/CDK1 phosphorylent la Condensine II, intervenant dès la prophase et initiant le compactage des chromosomes ; puis le complexe Cycline B/CDK1 phosphoryle la Condensine I, impliquée dans le maintien de l'état compacté (Figure 54) (Hirano, 2005a; Kimura, 1998; Kimura et al., 1999; Ono et al., 2003).

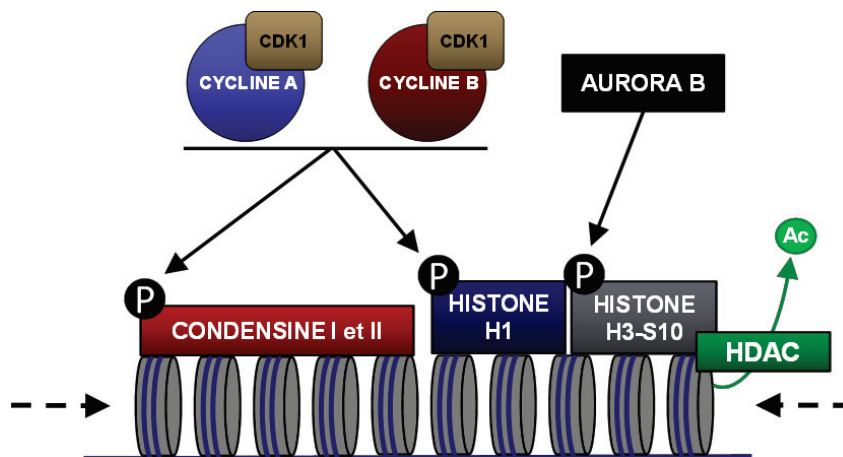


Figure 54 : Mécanismes moléculaires permettant la condensation de l'ADN (P: phosphorylation ; Ac: acétylation).

Un autre acteur fondamental de la condensation des chromosomes est l'**enzyme Topoisomérase II**. Elle est associée aux chromosomes métaphasiques et est intercalée entre les complexes Condensines (Maeshima and Laemmli, 2003) Son rôle est de dérouler les boucles de chromatine, créées par les différentes enzymes de transcription et de réplication, afin d'éviter la présence de « nœuds » limitant l'activité des complexes Condensines (voir paragraphe I-A-3 des annexes bibliographiques sur le point de contrôle de la décaténation) (Baxter and Aragón, 2012; Hirano, 2000; Vagnarelli, 2012). Enfin, les **protéines histones** sont également impliquées dans la condensation des chromosomes. En effet, la phosphorylation de l'**histone H3 sur la sérine 10** par la kinase Aurora B est un événement associé à la mitose dans de nombreux organismes. Elle permet l'hypercondensation des chromosomes en recrutant l'HDAC (*Histone DeAcetylase*) **Hst2p** (*Homologue of SirT2 protein*) qui désacétyle la lysine 16 de l'histone H4, permettant ainsi son interaction avec l'histone H2A du nucléosome voisin, ce qui induit le compactage de la chromatine (**Figure 54**) (Neurohr et al., 2011; Wei et al., 1999; Wilkins et al., 2014). L'**histone H1**, histone de liaison du nucléosome, intervient également dans la condensation des chromosomes en créant des boucles au niveau de la chromatine (Maresca et al., 2005; Xiao et al., 2012). La phosphorylation de l'histone H1 par les complexes Cycline A-B/CDK1 permet d'augmenter son affinité pour les chromosomes mitotique et ainsi d'induire sa fixation (**Figure 54**) (Freedman and Heald, 2010; Maresca et al., 2005; Sarg et al., 2006).

Les chromatides sœurs, issues de la réplication de l'ADN, sont maintenues ensemble dès la phase S grâce à un complexe protéique nommé **Cohésine**, composé d'au moins 4 protéines, dont **2 protéines SMC** à l'instar des complexes Condensines : SMC1p, SMC3p, SCC1p et SCC3p (Hirano, 2000; Uhlmann and Nasmyth, 1998; Watrin et al., 2006). Lors de la prophase, la Cohésine localisée au niveau des bras des chromosomes est phosphorylée par la **kinase Polo**, entraînant une réduction de ses capacités de fixation à la chromatine et ainsi, sa dissociation des chromosomes mitotiques (Bernard and Allshire, 2002; Sumara et al., 2002; Waizenegger et al., 2000). De plus, les kinases Aurora B et Cycline A/B-CDK1 phosphorylent la protéine **Sororin**, dont la fonction est de stabiliser les complexes Cohésine sur la chromatine. Ainsi, la protéine Sororin phosphorylée se dissocie de la Cohésine entraînant sa délocalisation de la chromatine (Losada, 2014). Seule la Cohésine, localisée au niveau des régions centromériques, reste liée aux chromatides sœurs grâce à deux mécanismes moléculaires :

- 3) la présence de la **protéine SWI6** (*SWItching deficient 6*) (appartenant à la famille des protéines HP1) au niveau des centromères, limite l'accès à la kinase Polo et ainsi prévient la phosphorylation de la Cohésine (Bernard and Allshire, 2002; Bernard et al., 2001).
- 4) la **protéine SGO1** (*ShuGOshin 1*), enrichie au niveau des régions centromériques, recrute la **phosphatase PP2A** qui antagonise la phosphorylation de la protéine Sororin par les kinases Aurora B et Cycline A/B-CDK1, inhibant ainsi sa dissociation (Losada, 2014; Serrano et al., 2009).

iii. Disparition de l'enveloppe nucléaire

En fin de prophase intervient une dernière étape essentielle à la division cellulaire chez les eucaryotes supérieurs : la rupture de l'enveloppe nucléaire (NEBD, *Nuclear Envelope BreakDown*). De nombreuses kinases mitotiques sont localisées et actives au niveau des centrosomes durant la prophase, dont AURORA A ou cdc25B, permettant l'activité localisée du complexe Cycline B/CDK1. Celles-ci induisent, directement ou indirectement, la **phosphorylation des complexes protéiques formant les pores nucléaires**, ce à proximité des centrosomes où ces kinases sont actives, et permettent leur dissociation de l'enveloppe nucléaire (Hachet et al., 2007, 2012; Jackman et al., 2003; Smoyer and Jaspersen, 2014). Ceci représente la première étape de la NEBD. De façon intéressante, la phosphorylation, et ainsi la dissociation de ces complexes protéiques est finement régulée dans le temps : la dissociation de la nucléoporeine NUP98 semblant être l'élément initial de la NEBD. La phosphorylation des nucléopores s'étend ensuite à l'intégralité de l'enveloppe nucléaire notamment *via* l'activité des complexes Cycline A-B/CDK1 (Güttinger et al., 2009). Parallèlement, les microtubules générés à partir des centrosomes exercent des forces de traction sur la face opposée de l'enveloppe nucléaire entraînant sa fragilisation (Beaudouin et al., 2002). Avec la disparition des pores nucléaires, l'enveloppe nucléaire devient perméable, permettant l'accessibilité **des lamines**, localisées sur la face interne de l'enveloppe nucléaire, aux **kinases CDK1 et PKC** (*Protein Kinase C*). De plus, la phosphorylation de la Cycline B et de cdc25c durant la prophase, grâce à la kinase PLK1, permet l'activation et la localisation nucléaire du complexe Cycline B/CDK1 (Toyoshima-Morimoto et al., 2001, 2002). Ainsi, les lamines nucléaires sont phosphorylées, ce qui induit leur dépolymérisation et la disparition de l'enveloppe nucléaire (Güttinger et al., 2009; Pollard and Earnshaw, 2004).

2. Anaphase

Suite à l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique et à leur capture par le fuseau mitotique (voir paragraphe I-0-2 concernant la transition métaphase-anaphase), la séparation des chromatides sœurs est effectuée durant l'anaphase, subdivisée en anaphase A et anaphase B.

Lors de l'anaphase A, les microtubules kinétochoriens se dépolymérisent grâce à l'activité dépolymérase des moteurs moléculaires de la famille des kinésines 13 fixées aux extrémités positives et négatives des microtubules. Ainsi, les microtubules se raccourcissent et les chromatides se rapprochent de leurs pôles respectifs (Rogers et al., 2004). Le maintien de l'attachement des chromosomes au fuseau mitotique *via* les kinétochores, s'effectue grâce au complexe protéique DASH formant des boucles autour des microtubules et permettant ainsi l'interaction kinétochore/fuseau mitotique (Li et al., 2002; Miranda et al., 2007). De plus, la dynéine permet aux chromosomes de migrer vers les extrémités négatives, et donc vers les pôles pendant la dépolymérisation des microtubules (Sharp et al., 2000).

Lors de l'anaphase B, les microtubules interpolaires polymérisent et permettent l'élongation du fuseau mitotique. L'intervention de la kinésine 5, interagissant entre deux microtubules interpolaires antiparallèles, permet d'éloigner les deux pôles du fuseau mitotique, comme lors de la migration des centrosomes en prophase, en migrant vers les extrémités positives des microtubules (Brust-Mascher and Scholey, 2011; Civelekoglu-Scholey and Scholey, 2010).

De plus, les pôles s'éloignent également grâce à l'action combinée de la dynéine et de la protéine NuMA. En effet, lors de l'anaphase, NuMA se localise au niveau du cortex cellulaire et interagit avec la dynéine localisée sur les microtubules astraux, permettant l'ancrage de la dynéine au cortex cellulaire. L'activité de moteur moléculaire de la dynéine entraîne son déplacement vers les extrémités négatives des microtubules, et donc des pôles, ce qui génère des forces de traction permettant le rapprochement des pôles vers la membrane plasmique. La localisation de la protéine NuMA implique l'inhibition de la kinase CDK1 *via* la dégradation protéique de la Cycline B. En effet, lors de la métaphase, CDK1 phosphoryle NuMA ce qui limite sa localisation corticale. En anaphase, CDK1 est inhibé et permet à la phosphatase PP2A de déphosphoryler NuMA qui se localise alors au

cortex cellulaire (Kiyomitsu and Cheeseman, 2013; Kotak and Gönczy, 2013; Kotak et al., 2013).

Ainsi, les chromatides sœurs sont définitivement séparées et restent séquestrées près des pôles, grâce à différents complexes protéiques faisant le lien entre les kinétochores et les centrosomes à la fin de l'anaphase B (Buttrick et al., 2011).

3. Télaphase et cytotdiérèse

La télaphase est l'étape ultime de la mitose et permet la reformation des enveloppes nucléaires des deux cellules filles, la décondensation des chromosomes, ainsi que la séparation des cellules par le processus de cytotdiérèse. Les différentes étapes de la télaphase nécessitent la dégradation complète de la Cycline B et ainsi l'inhibition de l'activité de la kinase CDK1 (Potapova et al., 2006).

La formation de l'enveloppe nucléaire implique, dans un premier temps, la relocalisation des lamines B autour des chromosomes. Ce processus intervient dès l'anaphase et constitue l'évènement initiateur de la formation de l'enveloppe nucléaire. Puis, les membranes du réticulum endoplasmique qui, durant la mitose, contiennent le récepteur aux lamines B, s'associent autour de la chromatine et des lamines B. Enfin, la membrane est close par d'autres membranes cellulaires fusionnant avec l'enveloppe nucléaire en cours de reformation, ainsi que par l'assemblage des pores nucléaires (Larijani and Poccia, 2009; Pollard and Earnshaw, 2004).

La décondensation des chromosomes, ainsi que l'initiation de la cytotdiérèse, font intervenir la mise en place d'un gradient cytoplasmique de phosphorylation médié par la kinase AURORA B (Fuller et al., 2008). Celle-ci se localise au niveau central de la cellule, maintenant la condensation des chromosomes dans cette région, *via* la phosphorylation des complexes Condensines et de l'histone H3 (Afonso et al., 2014a, 2014b; Vas and Clarke, 2008). Lorsque les chromosomes sortent de ce gradient, à la fin de leur migration, l'activité phosphatase des protéines PP1 et PP2A antagonise l'action d'AURORA B et entraîne la décondensation des chromosomes (Qian et al., 2011; Vagnarelli et al., 2011).

L'activité kinase d'AURORA B au niveau de la région médiane de la cellule permet le recrutement et l'activité du complexe protéique CENTRALSPINDLIN, composé des moteurs moléculaires KIF6 (*Kinesin Family member 6*) et MKLP1 (*Mitotic Kinesin-Like*

Protein 1), ainsi que de la Rho GTPase CYK-4 (Douglas et al., 2010; Guertin et al., 2002; Jantsch-Plunger et al., 2000). Ce complexe entraîne la mise en place d'un anneau contractile d'actine et de myosine autour de la zone médiane de la cellule et permet sa contraction grâce à l'hydrolyse du GTP (Schiel and Prekeris, 2010). L'inhibition de la kinase CDK1, *via* la dégradation de la Cycline B, joue ici un rôle essentiel car CDK1 inhibe la myosine par phosphorylation de sa chaîne légère, empêchant ainsi l'initiation de la cytotélerèse (Meijer, 2006). De plus, la kinase MPS1 se localise également dans la zone médiane et permet le recrutement par phosphorylation d'un composant du cytosquelette d'actine : la protéine MIP1 (*MPS1 Interacting Protein-1*), dont la délétion induit la désorganisation du cytosquelette menant à une division cellulaire non équilibrée (Liu and Winey, 2012; Mattison et al., 2011).

PARTIE II :
LES PROTEINES DE LA FAMILLE TIF1

A. Tif1 α

1. Fonctions moléculaires et cellulaires

i. Régulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires

TIF1 α fut le premier membre de la famille TIF1 mis en évidence, grâce à un criblage effectué chez la levure (Le Douarin et al., 1995). Le but de ce criblage était d'identifier des protéines **augmentant l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires** à l'acide rétinoïque. Cette étude a ainsi pu mettre en évidence le premier membre de la famille TIF1, TIF1 α , exprimé de façon ubiquitaire dans divers organes chez la souris et chez l'Homme. Les récepteurs nucléaires sont des récepteurs intracellulaires ayant une activité transcriptionnelle intrinsèque dépendante de la fixation de leur ligand. Leur fonction est de réguler directement l'expression de gènes, en réponse à la fixation de leur ligand, ce grâce à leur domaine de liaison à l'ADN et à leur coopération avec différents cofacteurs de transcription (Aranda and Pascual, 2001). TIF1 α , **en interagissant avec de nombreux récepteurs nucléaires** (récepteurs à l'acide rétinoïque, à la vitamine D, aux œstrogènes, à la progestérone, aux glucocorticoïdes ou aux hormones thyroïdiennes) *via* son domaine « NR box », et **en augmentant leur activité transcriptionnelle**, apparaît comme un **nouveau coactivateur des récepteurs nucléaires** (Le Douarin et al., 1995, 1996; Teyssier et al., 2006; Zhong et al., 1999).

Le rôle de TIF1 α dans la stimulation de l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires a été par la suite remis en question dans de nombreuses études dans lesquelles TIF1 α apparaît majoritairement comme un **régulateur négatif de la transcription induite par les récepteurs nucléaires**. Notamment dans le foie, où, après stimulation par l'acide rétinoïque, **TIF1 α se fixe directement sur les promoteurs cibles** des récepteurs nucléaires et **inhibe leur transcription** (Khetchoumian et al., 2007, 2008; Tisserand et al., 2011), ou encore dans le rein, où l'inhibition de l'expression de TIF1 α augmente la transcription des gènes cibles des récepteurs nucléaires à la vitamine D (Ignat et al., 2008). De plus, la protéine Bonus, homologue des protéines TIF1 chez la drosophile, a également été impliquée dans l'inhibition de l'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires (Beckstead et al., 2001). En effet, une étude de 2013 démontre que TIF1 α inhibe la transcription des ERV (*Endogenous RetroVirus*) de type VL30 3II, rétrovirus classiquement associés aux génomes des mammifères et dont les séquences LTR (*Long Terminal Repeat*) contiennent des domaines de fixation aux récepteurs

nucléaires à l'acide rétinoïque. Les ERV de type VL30 3II sont ainsi induits transcriptionnellement par les récepteurs à l'acide rétinoïque, mais leur transcription est inhibée par TIF1 α , en coopération avec TIF1 β et TIF1 γ , au sein des hépatocytes (Herquel et al., 2013). Dans ce modèle, TIF1 α **régule donc négativement l'activité transcriptionnelle** des récepteurs nucléaires.

ii. Remodelage chromatinien et régulation de la transcription

Dès 1996, TIF1 α fut suspecté comme intervenant dans les processus de remodelage chromatinien, grâce à la mise en évidence, chez la levure, de son rôle de répresseur transcriptionnel, ainsi que de son interaction avec la protéine HP1 (*Heterochromatin Protein 1*), classiquement associée à la condensation de la chromatine (Le Douarin et al., 1996; Hediger and Gasser, 2006; Kwon and Workman, 2008). De façon surprenante, l'association de TIF1 α avec la protéine HP1 n'est pas responsable des effets négatifs de TIF1 α sur la transcription : la mutation du domaine de fixation « HP1 box » de TIF1 α n'altère pas ses fonctions de répresseur transcriptionnel (Le Douarin et al., 1996; Nielsen et al., 1999). A l'inverse, la trichostatine A, un inhibiteur des protéines Histones DésACétylases (HDAC), inhibe totalement la répression transcriptionnelle induite par TIF1 α . Ainsi, TIF1 α **agit en tant que répresseur transcriptionnel via un mécanisme dépendant des HDACs** (Nielsen et al., 1999).

iii. Régulation de p53 et réparation de l'ADN

En plus de ces fonctions de régulateur transcriptionnel, TIF1 α possède une **activité E3-Ubiquitine ligase** grâce à son domaine « RING finger » en position N-terminale. La cible principale de cette activité enzymatique, décrite à ce jour, est **la protéine suppresseur de tumeur p53**, jouant un rôle clé dans l'arrêt du cycle cellulaire suite à la détection de dommages à l'ADN, notamment *via* l'induction du CKI p21 (voir paragraphe I-A-1 concernant la régulation de l'activité des complexes Cycline/CDK) et du facteur pro-apoptotique Bax (Pommier et al., 2010; Reinhardt and Schumacher, 2012).

Le niveau protéique de p53 est régulé par des processus d'ubiquitination impliquant diverses E3-Ubiquitine ligases, dont la plus largement décrite est MDM2 (*Mouse Double Minute protein 2*) (Michael and Oren, 2002, 2003; Momand et al., 2000). En 2009, TIF1 α

fut décrite, pour la première fois, comme une E3-Ubiquitine ligase pouvant moduler le taux de protéine p53 (**Figure 55**). En effet, dans les cellules souches embryonnaires murines ainsi que dans les lignées cellulaires humaines, **TIF1 α interagit avec p53 et induit sa poly-ubiquitination** menant à sa dégradation par le protéasome. Ainsi, la perte d'expression de TIF1 α par interférence à l'ARN induit une augmentation du taux de p53, associé à une augmentation de l'apoptose (Allton et al., 2009; Jain and Barton, 2009). De plus, suite à la détection de dommages à l'ADN, l'inhibition de p53 par TIF1 α est levée grâce à la **kinase ATM** qui induit la **phosphorylation de p53** sur la sérine 15, ainsi que celle de **TIF1 α** sur la sérine 768. TIF1 α subit alors un changement conformationnel entraînant sa dissociation de p53, ainsi que son **auto-ubiquitination** menant à sa dégradation par le protéasome. Une fois la réparation de l'ADN effectuée, le niveau de p53 doit diminuer afin de permettre la poursuite du cycle cellulaire. Ceci est permis grâce à une boucle d'autorégulation négative : **p53 induit la néo-transcription de TIF1 α** et entraîne ainsi sa dégradation (Jain et al., 2014).

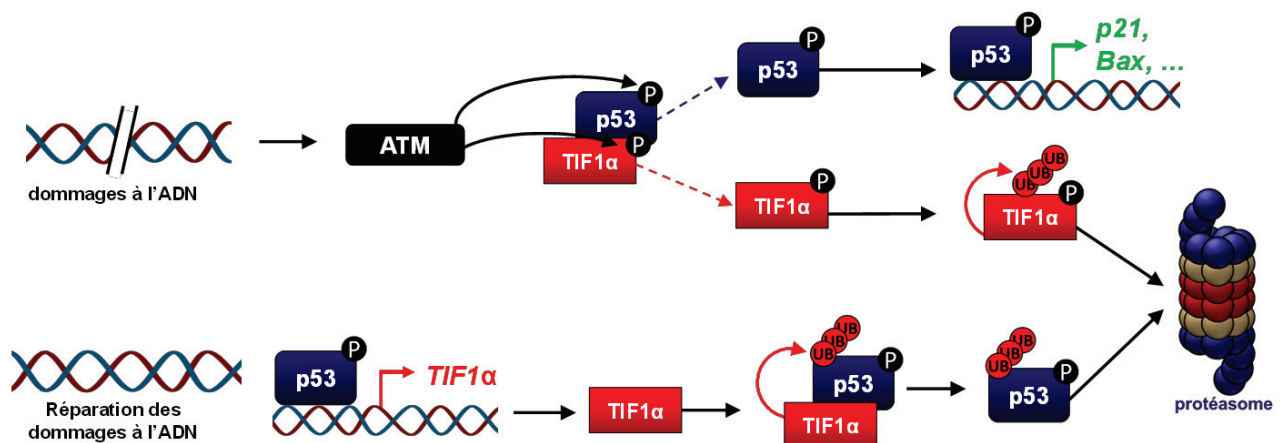


Figure 55 : Régulation de p53 par TIF1 α (P: phosphorylation ; UB: ubiquitination).

2. Implication dans le développement tumoral

i. Famille TIF1 et la dermatomyosite associée au cancer

Les trois membres les plus décrits de la famille TIF1 (TIF1 α , β et γ) ont été associés au développement de dermatomyosite. Cette pathologie est une maladie chronique se caractérisant par une inflammation du derme et du tissu musculaire strié squelettique. Dans 10 à 15 % des cas, cette pathologie se développe précédemment ou parallèlement à l'apparition de tumeur chez le patient (Orphanet, 2013). La mise en évidence

d'autoanticorps dirigés contre les membres de la famille TIF1 dans le sérum de patients présentant une dermatomyosite, est classiquement associé au développement tumoral chez ces patients (Bodoki et al., 2014; Fiorentino and Casciola-Rosen, 2012; Hoshino et al., 2010; Ito et al., 2013; Kasuya et al., 2013; Satoh et al., 2012). Néanmoins, aucune relation de cause à effet entre la présence d'autoanticorps dirigés contre les protéines TIF1 et le développement de la dermatomyosite n'a été décrite dans ces études. Toutefois, la présence de pathologies tumorales illustre un rôle pro-oncogénique des protéines TIF1, dont la surexpression dans les tumeurs associées à la dermatomyosite serait responsable de la présence d'autoanticorps dirigés contre ces protéines dans le sérum des patients.

iv. TIF1 α

TIF1 α fut suggéré, dès sa mise en évidence en 1995, comme ayant un rôle dans la tumorigénèse. En effet, la séquence N-terminale de TIF1 α est très semblable à celle de l'oncoprotéine murine chimère T18, identifiée dans les hépatomes induits par le furfural. Cette protéine chimère résulte de la fusion entre une protéine alors inconnue en N-terminal et l'homologue murin de l'oncogène B-raf en C-terminal. Les auteurs ont ainsi pu identifier cette protéine inconnue comme étant TIF1 α (Le Douarin et al., 1995), suggérant que son domaine RING finger (en N-terminal) pourrait potentialiser les fonctions pro-oncogéniques de B-raf. Le gène TIF1 α est impliqué dans une autre oncoprotéine chimérique issue du réarrangement chromosomique entre le récepteur RET et TIF1 α . Ce réarrangement a été décrit dans les carcinomes papillaires de la thyroïde développés par certains enfants exposés aux radiations émises lors de l'accident nucléaire de Tchernobyl (Klugbauer and Rabes, 1999). Enfin, TIF1 α est également impliqué dans la translocation t(7;8)(q34;p11) intervenant dans les syndromes myéloprolifératifs 8p11: cette translocation permet la génération de deux protéines de fusions: FGFR1-TRIM24 (domaine transmembranaire de FGFR1 et domaine PHD/Bromodomaine de TIF1 α) et TRIM24-FGFR1 (domaine RING finger de TIF1 α et domaine tyrosine kinase de FGFR1) (*Fibroblast Growth Factor Receptor 1*). La protéine de fusion TRIM24-FGFR1 induit la transformation tumorale grâce à sa dimérisation *via* le domaine RING finger de TIF1 α qui entraîne une activation constitutive de l'activité kinase de FGFR1 (Belloni et al., 2005; Hatakeyama, 2011).

TIF1 α semble donc être associé à **des fonctions pro-tumorales via la formation d'oncoprotéines chimériques**. TIF1 α pourrait également agir comme un **oncogène par lui-même** : en effet, la surexpression de TIF1 α a été mise en évidence dans les leucémies myéloïdes aigües, les cancers du sein, de la tête et du cou, ainsi que dans les cancers du poumon (Chambon et al., 2011; Cui et al., 2013; Gandini et al., 2002; Li et al., 2012; Tsai et al., 2011).

TIF1 α possède également **des fonctions anti-tumorales** notamment au cours de la **tumorigenèse hépatique**. En effet, les souris délétées de façon constitutive pour TIF1 α sont viables et fertiles, mais développent des tumeurs hépatiques menant à la mort des individus dès l'âge de 9 mois (Khetchoumian et al., 2007, 2008). De façon intéressante, 20 % des cellules issues de ces tumeurs présentent une polyploïdie, laissant entrevoir un rôle de TIF1 α dans le maintien d'une division mitotique normale, comme cela a été mis en évidence pour TIF1 γ (voir partie III des résultats et (Sedgwick et al., 2012)). Aussi, la délétion combinée de TIF1 γ et TIF1 α , spécifiquement dans les hépatocytes, potentialise le développement tumoral hépatique chez la souris (Davidson, 2011; Herquel et al., 2011a, 2011b). De plus, Herquel *et al.* ont démontré en 2013 que TIF1 α , en coopération avec TIF1 β et TIF1 γ , inhibait, spécifiquement dans les hépatocytes, la transcription des rétrovirus de type VL30 3II (Herquel et al., 2013). Ainsi, la perte de TIF1 α dans les hépatocytes induit une surexpression des ARN rétro-transcrits d'ERV ce qui active la réponse immunitaire aux infections virales médiées par l'interféron. Ceci mène à une inflammation aigüe du tissu hépatique, processus classiquement associé à l'incidence des hépatocarcinomes. Enfin, il a été mis en évidence des altérations génomiques du locus codant TIF1 α (7q32-q34) dans les leucémies et les carcinomes hépatiques humains (Bernstein et al., 1984; Hatakeyama, 2011; Parada et al., 1998).

L'implication de TIF1 α en tumorigenèse est donc, à ce jour, **controversée**, certaines études l'identifiant comme une protéine aux **fonctions oncosuppressives**, tandis que d'autres la décrivent comme un **facteur pro-tumoral**.

B. TIF1 β

1. Fonctions moléculaires et cellulaires

TIF1 β est le membre le plus étudié de la famille TIF1. Il a été mis en évidence pour la première fois en 1996 par trois études indépendantes :

- 1) Josh R. Friedman *et al.*, sous le nom de **KAP1** (*Krüppel-associated box domain-Associated Protein-1*), pour son interaction avec les protéines composées d'un domaine KRAB (*Krüppel Associated Box*) (Friedman *et al.*, 1996).
- 2) Sung-Su Kim *et al.* sous le nom de **KRIP-1** (*KRAB-A-Interacting Protein 1*) également pour son interaction avec les protéines composées d'un domaine KRAB (Kim *et al.*, 1996).
- 3) Le groupe du Pr Pierre Chambon et du Dr Régine Losson, où il fût identifié sous le nom de **TIF1 β** , en raison de son homologie de séquence avec TIF1 α (Le Douarin *et al.*, 1996).

i. Répression transcriptionnelle et remodelage chromatinien

TIF1 β a été mis en évidence dans des cellules humaines, murines et simiennes en tant que **cofacteur des protéines KRAB** (Friedman *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1996; Moosmann and Georgiev, 1996). Ces dernières sont des répresseurs transcriptionnels, mis en évidence pour la première fois en 1991, comportant un domaine de liaison à l'ADN composé de 4 à 30 motifs en doigt de zinc ainsi qu'un domaine KRAB en position N-terminale, constitué d'environ 75 acides aminés classiquement répartis en deux domaines protéiques remarquables : « boîte A » et « boîte B » (Bellefroid *et al.*, 1991). Ces protéines constituent la **famille majoritaire parmi les facteurs de transcription à doigt de zinc** et sont exprimées uniquement chez les vertébrés tétrapodes. Les protéines à domaines KRAB sont de **puissants répresseurs transcriptionnels** *via* :

- 1) l'inhibition de l'activité des ARN polymérases I, II et III,
- 2) leur fixation sur les promoteurs de gènes,
- 3) la régulation de la formation et de la maintien des nucléoles, lieux de synthèse des ARNs ribosomiques (Urrutia, 2003).

TIF1 β interagit avec les protéines KRAB au niveau des promoteurs cibles, *via* son domaine RBCC et est **responsable de l'inhibition de la transcription** médiée par les protéines KRAB (**Figure 56**) (Friedman et al., 1996; Kim et al., 1996; Moosmann and Georgiev, 1996; Urrutia, 2003). L'interaction KRAB-TIF1 β nécessite une oligomérisation trimérique de TIF1 β menant à une stœchiométrie de 1:3 (Peng et al., 2000a, 2000b). Une étude réalisée sur 61 protéines comportant un domaine KRAB a pu mettre en évidence que 51 d'entre elles interagissaient de façon directe avec TIF1 β (Itokawa et al., 2009). Ainsi, TIF1 β , dont l'expression est ubiquitaire dans de nombreux organes, est un cofacteur **essentiel et universel** de nombreuses protéines KRAB et permet le recrutement de diverses protéines impliquées dans le remodelage chromatinien.

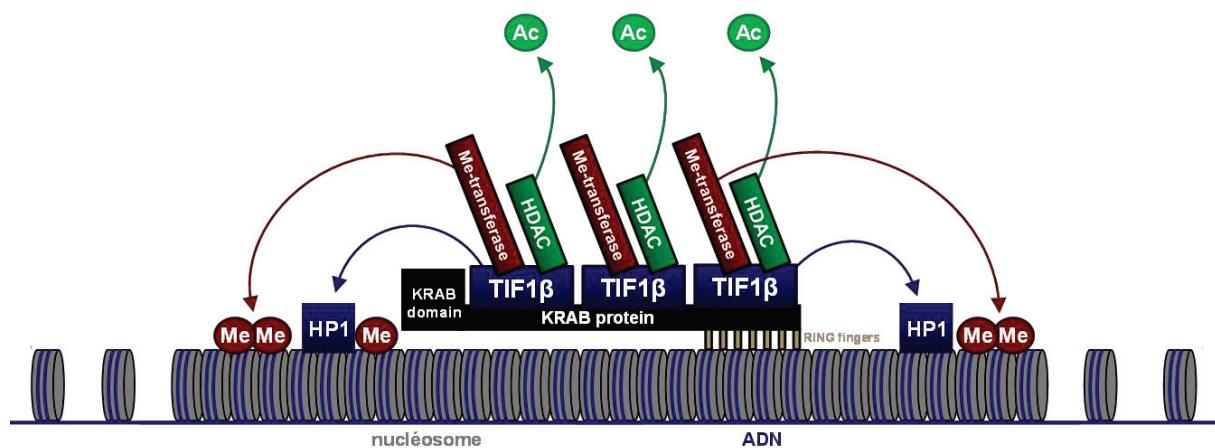


Figure 56 : Implication de TIF1 β dans la répression transcriptionnelle médiée par les protéines KRAB (Me: méthylation ; Ac: acétylation).

TIF1 β permet notamment le recrutement du **complexe Mi-2/NuRD** (*Nucleosome Remodeling Deacetylase*) au niveau des régions chromatiennes cibles des protéines KRAB (Schultz et al., 2001). Mi-2/NuRD est un complexe protéique ayant pour fonction la **désacétylation des histones et le remodelage chromatinien** grâce à l'association de diverses protéines dont les HDACs, les hélicases et des protéines de liaison aux histones et aux îlots CpG méthylés (Denslow and Wade, 2007). TIF1 β permet le recrutement, au niveau des protéines KRAB, du complexe Mi-2/NuRD *via* ses domaines « PHD finger » et « bromodomaine » menant ainsi à l'inhibition de la transcription des promoteurs cibles (Schultz et al., 2001). De plus, TIF1 β recrute **les protéines HP1**, impliquées dans le compactage de la chromatine, grâce à son domaine « HP1 box », et interagit avec la **méthyl-transférase SETDB1** entraînant la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3, signature permettant également le recrutement des protéines HP1 (**Figure 56**) (Cammass et al., 2002; Le Douarin et al., 1996; Iyengar and Farnham, 2011; Iyengar et al., 2011;

Nielsen et al., 1999; Ryan et al., 1999; Schultz et al., 2002). De plus, une étude a mis en évidence la capacité du complexe KRAB/TIF1 β à inhiber la transcription de régions distales (plus de 10 kb) au site de fixation initial, en **propageant le statut hétérochromatique de l'ADN** via la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3) et la fixation des protéines HP1 (Groner et al., 2010). De plus, TIF1 β peut inhiber seule la transcription de nombreux gènes grâce à sa fixation directe sur les promoteurs cibles (Iyengar et al., 2011). Enfin, TIF1 β a été impliquée dans le maintien des **empreintes hétérochromatiques parentales**, sur lesquelles elle se fixe, en reconnaissant la signature H3K9me3, afin de conserver la chromatine sous forme compactée (Messerschmidt et al., 2012; Quenneville et al., 2011).

ii. Réparation de l'ADN, voies p53 et E2F

1) Réparation des cassures double brin

La présence de cassure double brin au niveau de la chromatine permet le recrutement et l'activation des kinases ATM et Chk2 (voir paragraphe I-A-1 des annexes bibliographiques concernant le point de contrôle des dommages à l'ADN). Celles-ci induisent alors la phosphorylation de TIF1 β , respectivement, sur les sérines 824 et 473 spécifiquement au site de cassure. TIF1 β phosphorylée va alors migrer le long de la chromatine et entraîner la décondensation de la région d'ADN altérée (Figure 57).

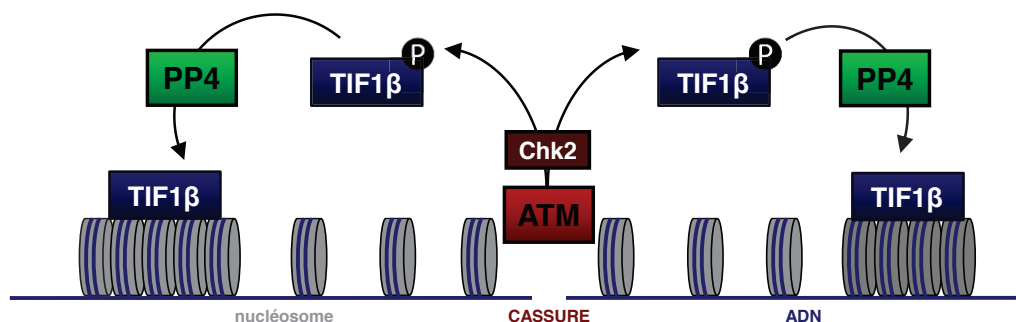


Figure 57 : Implication de TIF1 β dans la réparation des dommages à l'ADN : décondensation de la chromatine. (P: phosphorylation).

Ainsi, la phosphorylation de TIF1 β semble inhiber son rôle dans le compactage de l'ADN. Cette décondensation est indispensable à l'activité des différents systèmes de réparation : l'expression d'un mutant non phosphorylable (S824A) de TIF1 β inhibe la réparation des

cassures double brin. Une fois la réparation effectuée, le recrutement de la phosphatase PP4 permet la déphosphorylation de TIF1 β et la recondensation de l'ADN. De façon intéressante, l'inhibition de l'expression de TIF1 β ou de PP4 par interférence à l'ARN, ainsi que l'expression d'un mutant mimant la phosphorylation (S824D) entraîne une décondensation globale de la chromatine (Goodarzi et al., 2009, 2010; Lee et al., 2012; Pfeifer, 2012; White et al., 2012, 2006; Ziv et al., 2006).

2) Inhibition de la voie p53

Le régulateur p53 est un acteur clé de la réponse aux dommages à l'ADN, en initiant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Son expression est régulée par l'E3-Ubiquitine ligase MDM2 (Michael and Oren, 2002, 2003; Momand et al., 2000). Cette dernière limite les fonctions transcriptionnelles de p53 en inhibant son acétylation, modification post-traductionnelle augmentant ses capacités de liaison à l'ADN, et en induisant sa dégradation par le protéasome suite à sa poly-ubiquitination. TIF1 β coopère avec MDM2 afin de limiter les capacités pro-apoptotiques de p53 en réponse à des dommages à l'ADN : TIF1 β interagit avec MDM2 *via* son domaine « Coiled-Coil » et inhibe l'acétylation de p53 en recrutant des protéines HDAC. De plus, TIF1 β permet l'ubiquitination de p53 et ainsi sa dégradation par le protéasome, réduisant alors l'apoptose induite par p53 en réponse à des dommages à l'ADN (Figure 58) (Wang et al., 2005). De plus, il a été mis en évidence que TIF1 β limitait la transcription du CKI p21 par p53, en réponse à différents stress décrits pour activer p53, tels que les irradiations γ (Okamoto et al., 2006).

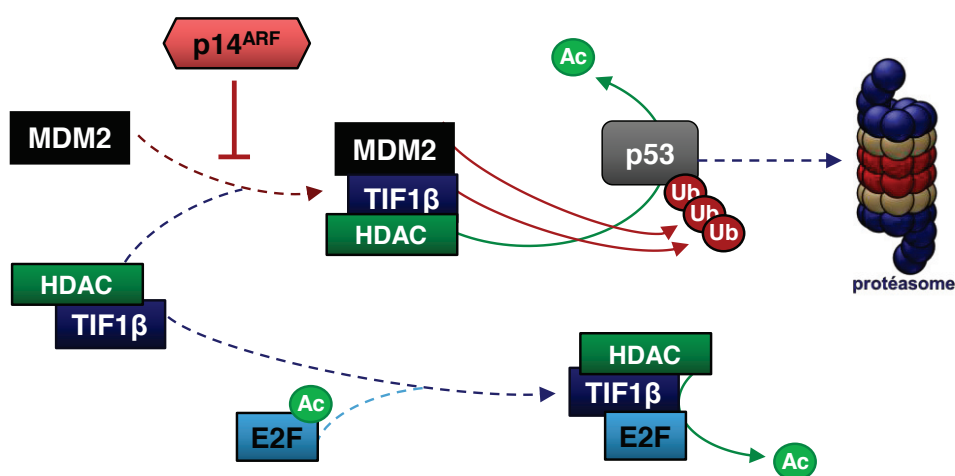


Figure 58 : Régulation de p53 et E2F par TIF1 β (Ub : ubiquitination ; Ac : acétylation).

De façon intéressante, ARF, ayant la capacité d'inhiber l'ubiquitination de p53 médiée par MDM2, limite également l'interaction MDM2/TIF1 β , afin de protéger p53 de la dégradation (**Figure 58**) (Maddika et al., 2007; Wang et al., 2005). Enfin, il a été mis en évidence dans des lignées cellulaires mammaires humaines que TIF1 β inhibe la transcription de *p21* *via* sa fixation directe sur le promoteur du CKI (Lee et al., 2007b).

3) Inhibition de l'activité d'E2F

E2F est un facteur de transcription dont l'activité est indispensable à la poursuite du cycle cellulaire en phase S (voir paragraphe I-A-2-i concernant les « phases G0/G1 et le point de restriction »). E2F est également impliqué dans la réparation des dommages à l'ADN en induisant l'apoptose, *via* sa phosphorylation par la kinase ATM qui permet également sa stabilisation par les protéines 14-3-3 et ainsi l'initiation de la transcription des gènes pro-apoptotiques p73 et Apaf1 (Biswas and Johnson, 2012; Ren et al., 2002). TIF1 β régule la réponse aux dommages à l'ADN en inhibant E2F : il interagit directement avec E2F au niveau de sa région « Coiled-Coil » et promeut l'interaction d'E2F avec les protéines HDAC inhibant ainsi son acétylation, modification post-traductionnelle augmentant ses capacités de liaison à l'ADN (**Figure 58**) (Wang et al., 2007). TIF1 γ inhibe alors l'activité transcriptionnelle d'E2F, limitant ses fonctions pro-apoptotiques et prolifératives, afin de permettre à la cellule de réparer les dommages à l'ADN (Chen et al., 2012).

2. Implication dans le développement tumoral

TIF1 β , à l'instar de TIF1 α et TIF1 γ , exerce également des fonctions oncosuppressives dans les processus de tumorigenèse hépatique. En effet, les souris présentant une inactivation homozygote de TIF1 β , spécifiquement dans les cellules du foie grâce à une stratégie Cre/Lox, développent des tumeurs hépatiques à l'âge de 14 mois, sans autre activation oncogénique (Davidson, 2011; Herquel et al., 2011a). Néanmoins, la littérature lui attribue majoritairement un rôle pro-tumoral. TIF1 β est, en effet, surexprimé dans les tumeurs hépatiques humaines, ainsi que dans les lignées cellulaires en dérivant, ce qui est en contradiction avec les données issues des modèles murins (Silva et al., 2006). De plus, l'expression de TIF1 β est augmentée dans les cancers du poumon non à petites cellules, les cancers gastriques, les cancers de la thyroïde ou les cancers du col de l'utérus, dans

lesquels la surexpression de TIF1 β est corrélée à un faible taux de survie ainsi qu'à un stade tumoral avancé, associé au processus métastatique (Lin et al., 2013; Liu et al., 2013; Martins et al., 2013; Yokoe et al., 2010). Il a été mis en évidence qu'un traitement par le TGF β induisait l'expression génique et protéique de TIF1 β , et que ce dernier était nécessaire à la transition épithélio-mésenchymateuse médiée par le TGF β dans les lignées cellulaires humaines issues de tumeurs bronchiques. Ainsi, en médiant l'EMT induite par le TGF β , TIF1 β favorise les propriétés invasives des cellules tumorales, et promeut la survenue de métastases (Chen et al., 2014). De façon intéressante, TIF1 β exerce donc, sur l'EMT, des fonctions opposées à celles de TIF1 γ qui inhibe l'EMT médiée par le TGF β . Enfin, TIF1 β exerce des fonctions inhibitrices sur le suppresseur de tumeur p53, limitant ainsi l'efficacité de traitements cytostatiques induisant l'activité de p53 tels que les irradiations γ ou l'actinomycine D (voir paragraphe II-B-1-ii des annexes bibliographiques concernant le rôle de TIF1 β dans l'inhibition de p53) (Okamoto et al., 2006; Wang et al., 2005).

TIF1 β semble donc agir, majoritairement, en tant qu'oncogène dans de nombreuses pathologies cancéreuses humaines. Les travaux mettant en évidence le développement d'HCC chez les souris délétées pour TIF1 β est à ce jour la seule étude attribuant des fonctions oncosuppressives à TIF1 β (Herquel et al., 2011a). Néanmoins, cette étude met également en évidence que la délétion combinée de TIF1 α et TIF1 β , ralentit la progression tumorale médiée par la délétion de TIF1 α seule. Ainsi, la présence de TIF1 β semble nécessaire au développement d'HCC induits par la perte de TIF1 α , lui procurant, dans ce modèle murin de double inactivation génique, un rôle pro-tumoral. Les auteurs démontrent également dans cette étude la formation d'un complexe protéique composé de TIF1 α/β et γ . Ainsi, le développement d'HCC observé suite à la perte de TIF1 β pourrait s'expliquer par une diminution de l'activité de ce complexe dont l'effet suppresseur de tumeur serait médié par TIF1 α et TIF1 γ .

C. TIF1 δ

Enfin, TIF1 δ est le dernier membre de la famille TIF1, mis en évidence en 2004, dont la fonction a été très peu étudiée (une seule étude décrit ses fonctions moléculaires). Contrairement aux autres membres de la famille TIF1 dont l'expression est ubiquitaire dans différents organes, l'expression de TIF1 δ chez la souris adulte semble être limitée au tissu testiculaire, plus spécifiquement au niveau des spermatides en allongement (étape finale de la spermatogenèse). Néanmoins, tout comme TIF1 α et TIF1 β , TIF1 δ possède une activité de répresseur transcriptionnel médiée par le recrutement de protéines HDACs. TIF1 δ interagit de façon directe avec les protéines HP1, très certainement afin de moduler les processus de différenciation terminaux de la spermiogenèse (Khetchoumian et al., 2004).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abraham, R.T. (2001). **Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases.** *Genes Dev.* 15, 2177–2196.
- Abrieu, a, Magnaghi-Jaulin, L., Kahana, J. a, Peter, M., Castro, a, Vigneron, S., Lorca, T., Cleveland, D.W., and Labbé, J.C. (2001). **Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint.** *Cell* 106, 83–93.
- Afonso, O., Matos, I., Pereira, A., Aguiar, P., Lampson, M.A., and Maiato, H. (2014a). **Feedback control of chromosome separation by a midzone Aurora B gradient.** *Science (80-.).* 345, 332–336.
- Afonso, O., Matos, I., and Maiato, H. (2014b). **Spatial control of the anaphase-telophase transition.** *Cell Cycle.*
- Agricola, E., Randall, R., Gaarenstroom, T., Dupont, S., and Hill, C. (2011). **Recruitment of TIF1 γ to chromatin via its PHD finger-bromodomain activates its ubiquitin ligase and transcriptional repressor activities.** *Mol. Cell* 43, 85–96.
- Ahel, D., Horejsí, Z., Wiechens, N., Polo, S.E., Garcia-Wilson, E., Ahel, I., Flynn, H., Skehel, M., West, S.C., Jackson, S.P., et al. (2009). **Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1.** *Science* 325, 1240–1243.
- Akel, S., Bertolette, D., and Ruscetti, F. (2013). **Crosstalk between the Smad and the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways is Essential for Erythroid Differentiation of Erythroleukemia Cells Induced by.** *J. Leuk. 1*, 1–24.
- Alcaraz, L.B., Exposito, J.-Y.J.-Y., Chuvin, N., Pommier, R.M., Cluzel, C., Martel, S., SENTIS, S., BARTHOLIN, L., Lethias, C., VALCOURT, U., et al. (2014). **Tenascin-X promotes epithelial-to-mesenchymal transition by activating latent TGF-.** *J. Cell Biol.* 205, 409–428.
- Alexandrow, M., and Moses, H. (1995). **Transforming growth factor β and cell cycle regulation.** *Cancer Res.* 1452–1457.
- Allton, K., Jain, A.K., Herz, H.-M., Tsai, W.-W., Jung, S.Y., Qin, J., Bergmann, A., Johnson, R.L., and Barton, M.C. (2009). **Trim24 targets endogenous p53 for degradation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 11612–11616.
- Alvarez-Fernández, M., Halim, V. a, Krenning, L., Aprelia, M., Mohammed, S., Heck, A.J., and Medema, R.H. (2010). **Recovery from a DNA-damage-induced G2 arrest requires Cdk-dependent activation of FoxM1.** *EMBO Rep.* 11, 452–458.
- Antoni, A. De, Pearson, C.G., Cimini, D., Canman, J.C., Sala, V., Nezi, L., Mapelli, M., Sironi, L., Faretta, M., Salmon, E.D., et al. (2005). **The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint.** *Curr. Biol.* 15, 214–225.
- Araki, S., Eitel, J. a, Batuello, C.N., Bijangi-Vishehsaraei, K., Xie, X.-J., Danielpour, D., Pollok, K.E., Boothman, D. a, and Mayo, L.D. (2010). **TGF-beta1-induced expression of human Mdm2 correlates with late-stage metastatic breast cancer.** *J. Clin. Invest.* 120, 290–302.

Aranda, a, and Pascual, a (2001). **Nuclear hormone receptors and gene expression.** *Physiol. Rev.* 81, 1269–1304.

Aronheim, a (1997). **Improved efficiency sos recruitment system: expression of the mammalian GAP reduces isolation of Ras GTPase false positives.** *Nucleic Acids Res.* 25, 3373–3374.

Aucagne, R., Droin, N., Paggetti, J., Lagrange, B., Largeot, A., Hammann, A., Bataille, A., Martin, L., Yan, K., Fenaux, P., et al. (2011a). **Transcription intermediary factor 1 γ is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia.** *J. Clin. Invest.* 121.

Aucagne, R., Droin, N., Solary, É., and Bastie, J. (2011b). **TIF1 γ : a tumor suppressor gene in chronic myelomonocytic leukemia.** *Med. / Sci.* 27, 696–698.

Babu, J.R., Jeganathan, K.B., Baker, D.J., Wu, X., Kang-Decker, N., and van Deursen, J.M. (2003). **Rae1 is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation.** *J. Cell Biol.* 160, 341–353.

Bagui, T.K., Jackson, R.J., Agrawal, D., and Pledger, W.J. (2000). **Analysis of cyclin D3-cdk4 complexes in fibroblasts expressing and lacking p27 kip1 and p21 cip1.** *Mol. Cell.*

Bahe, S., Stierhof, Y.-D., Wilkinson, C.J., Leiss, F., and Nigg, E. a (2005). **Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion.** *J. Cell Biol.* 171, 27–33.

Bai, X., Kim, J., Yang, Z., Juryneec, M.J., Akie, T.E., Lee, J., LeBlanc, J., Sessa, A., Jiang, H., DiBiase, A., et al. (2010). **TIF1 γ controls erythroid cell fate by regulating transcription elongation.** *Cell* 142, 133–143.

Bai, X., Trowbridge, J.J., Riley, E., Lee, J. a, DiBiase, A., Kaartinen, V.M., Orkin, S.H., and Zon, L.I. (2013). **TiF1-gamma plays an essential role in murine hematopoiesis and regulates transcriptional elongation of erythroid genes.** *Dev. Biol.* 373, 422–430.

Baker, A., Rohleder, K.J., Hanakahi, L. a, and Ketner, G. (2007). **Adenovirus E4 34k and E1b 55k oncoproteins target host DNA ligase IV for proteasomal degradation.** *J. Virol.* 81, 7034–7040.

Bardeesy, N., Cheng, K.-H., Berger, J.H., Chu, G.C., Pahler, J., Olson, P., Hezel, A.F., Horner, J., Lauwers, G.Y., Hanahan, D., et al. (2006). **Supp data Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer.** *Genes Dev.* 20, 1–5.

Bartek, J., and Lukas, J. (2001). **Mammalian G1-and S-phase checkpoints in response to DNA damage.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 738–747.

Bartek, J., and Lukas, J. (2007). **DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 238–245.

- Bartek, J., Lukas, C., and Lukas, J. (2004). **Checking on DNA damage in S phase.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 792–804.
- Bartholin, L., Cyprian, F.S., Vincent, D.F., Garcia, C.N., Martel, S., Horvat, B., Berthet, C., Goddard-Leon, S., Treilleux, I., Rimokh, R., et al. (2008). **Generation of mice with conditionally activated transforming growth factor beta signaling through the TbetaRI/ALK5 receptor.** *Genesis* 46, 724–731.
- Baxter, J., and Aragón, L. (2012). **A model for chromosome condensation based on the interplay between condensin and topoisomerase II.** *Trends Genet.* 28, 110–117.
- Bayliss, R., Fry, A., Haq, T., and Yeoh, S. (2012). **On the molecular mechanisms of mitotic kinase activation.** *Open Biol.* 2.
- Beaudouin, J., Gerlich, D., Daigle, N., Eils, R., and Ellenberg, J. (2002). **Nuclear envelope breakdown proceeds by microtubule-induced tearing of the lamina.** *Cell* 108, 83–96.
- Beckstead, R., Ortiz, J. a, Sanchez, C., Prokopenko, S.N., Chambon, P., Losson, R., and Bellen, H.J. (2001). **Bonus, a Drosophila homolog of TIF1 proteins, interacts with nuclear receptors and can inhibit betaFTZ-F1-dependent transcription.** *Mol. Cell* 7, 753–765.
- Bellefroid, E.J., Poncelet, D. a, Lecocq, P.J., Revelant, O., and Martial, J. a (1991). **The evolutionarily conserved Krüppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 3608–3612.
- Bello, M.J., de Campos, J.M., Vaquero, J., Kusak, M.E., Sarasa, J.L., and Rey, J. a (2000a). **High-resolution analysis of chromosome arm 1p alterations in meningioma.** *Cancer Genet. Cytogenet.* 120, 30–36.
- Bello, M.J., Campos, J.M. De, Vaquero, J., Kusak, M.E., Sarasa, J.L., and Rey, J.A. (2000b). **hRAD54 Gene and 1p High-Resolution Deletion-Mapping Analyses in Oligodendrogliomas.** *Cancer Genet. Cytogenet.* 4608, 0–5.
- Belloni, E., Trubia, M., Gasparini, P., Micucci, C., Tapinassi, C., Confalonieri, S., Nuciforo, P., Martino, B., Lo-Coco, F., Pelicci, P.G., et al. (2005). **8p11 myeloproliferative syndrome with a novel t(7;8) translocation leading to fusion of the FGFR1 and TIF1 genes.** *Genes. Chromosomes Cancer* 42, 320–325.
- Bernard, P., and Allshire, R. (2002). **Centromeres become unstuck without heterochromatin.** *Trends Cell Biol.* 12, 419–424.
- Bernard, P., Maure, J.F., Partridge, J.F., Genier, S., Javerzat, J.P., and Allshire, R.C. (2001). **Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres.** *Science* 294, 2539–2542.
- Bernstein, R., Philip, P., and Ueshima, Y. (1984). **Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1982: Abnormalities of chromosome 7 resulting in monosomy 7 or in deletion of the long arm (7q-): review of translocations, breakpoints, and associated abnormalities.** *Cancer Genet. Cytogenet.* 11.

- Bertoli, C., Skotheim, J.M., and de Bruin, R. a M. (2013). **Control of cell cycle transcription during G1 and S phases.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 518–528.
- Bieche, I., Khodja, A., and Lidereau, R. (1999). **Deletion Mapping of Chromosomal Region 1p32-pter in Primary Breast Cancer.** *Genes Chromosom. Cancer* 263, 255–263.
- Bièche, I., Champème, M.H., Matifas, F., Cropp, C., Callahan, R., and Lidereau, R. (1994a). **Demonstration of two regions involved in chromosome 1p deletion in breast tumors.** *Bull. Cancer* 81, 108–113.
- Bièche, I., Champème, M., Matifas, F., Cropp, C.S., Callahan, R., and Lidereau, R. (1994b). **Two Distinct Regions Involved in 1p Deletion in Human Primary Breast Cancer.** *Cancer Res.* 53, 1990–1994.
- Bièche, I., Vacher, S., Lallemand, F., Tozlu-Kara, S., Bennani, H., Beuzelin, M., Driouch, K., Rouleau, E., Lerebours, F., Ripoché, H., et al. (2011). **Expression analysis of mitotic spindle checkpoint genes in breast carcinoma: role of NDC80/HEC1 in early breast tumorigenicity, and a two-gene signature for aneuploidy.** *Mol. Cancer* 10, 23.
- Bienz, M. (2006). **The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain.** *Trends Biochem. Sci.* 31, 35–40.
- Bierie, B., Gorska, A.E., Stover, D.G., and Moses, H.L. (2009). **TGF-beta promotes cell death and suppresses lactation during the second stage of mammary involution.** *J. Cell. Physiol.* 219, 57–68.
- Bilodeau, S., Kagey, M.H., Frampton, G.M., Rahl, P.B., and Young, R. a (2009). **SetDB1 contributes to repression of genes encoding developmental regulators and maintenance of ES cell state.** *Genes Dev.* 23, 2484–2489.
- Biswas, A.K., and Johnson, D.G. (2012). **Transcriptional and nontranscriptional functions of E2F1 in response to DNA damage.** *Cancer Res.* 72, 13–17.
- Blagosklonny, M. V, and Pardee, A.B. (2002). **The restriction point of the cell cycle.** *Cell Cycle* 1, 103–110.
- Boatman, S., Barrett, F., Satishchandran, S., Jing, L., Shestopalov, I., and Zon, L.I. (2013). **Assaying hematopoiesis using zebrafish.** *Blood Cells. Mol. Dis.* 51, 271–276.
- Bodoki, L., Nagy-Vincze, M., Griger, Z., Betteridge, Z., Szöllősi, L., and Dankó, K. (2014). **Four dermatomyositis-specific autoantibodies-anti-TIF1 γ , anti-NXP2, anti-SAE and anti-MDA5-in adult and juvenile patients with idiopathic inflammatory myopathies in a Hungarian cohort.** *Autoimmun. Rev.*
- Branzei, D., and Foiani, M. (2008). **Regulation of DNA repair throughout the cell cycle.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 297–308.
- Branzei, D., and Foiani, M. (2010). **Maintaining genome stability at the replication fork.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 208–219.

- Bretones, G., Delgado, M.D., and León, J. (2014). **Myc and cell cycle control.** *Biochim. Biophys. Acta.*
- Brier, S., Lemaire, D., Debonis, S., Forest, E., and Kozielski, F. (2004). **Identification of the protein binding region of S-trityl-L-cysteine, a new potent inhibitor of the mitotic kinesin Eg5.** *Biochemistry* 43, 13072–13082.
- Brito, D. a, and Rieder, C.L. (2006). **Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint.** *Curr. Biol.* 16, 1194–1200.
- Broder, Y.C., Katz, S., and Aronheim, A. (1998). **The ras recruitment system, a novel approach to the study of protein-protein interactions.** *Curr. Biol.* 8, 1121–1124.
- Van den Broecke, C., Vleminckx, K., De Bruyne, G., Van Hoorde, L., Vakaet, L., Van Roy, F., and Mareel, M. (1996). **Morphotypic plasticity in vitro and in nude mice of epithelial mouse mammary cells (NMuMG) displaying an epithelioid (e) or a fibroblastic (f) morphotype in culture.** *Clin. Exp. Metastasis* 14, 282–296.
- Brust-Mascher, I., and Scholey, J.M. (2011). **Mitotic motors and chromosome segregation: the mechanism of anaphase B.** *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1149–1153.
- Buscemi, G., Zannini, L., Fontanella, E., Lecis, D., Lisanti, S., and Delia, D. (2009). **The shelterin protein TRF2 inhibits Chk2 activity at telomeres in the absence of DNA damage.** *Curr. Biol.* 19, 874–879.
- Buttrick, G.J., Meadows, J.C., Lancaster, T.C., Vanoosthuysse, V., Shepperd, L. a, Hoe, K.-L., Kim, D.-U., Park, H.-O., Hardwick, K.G., and Millar, J.B. a (2011). **Nsk1 ensures accurate chromosome segregation by promoting association of kinetochores to spindle poles during anaphase B.** *Mol. Biol. Cell* 22, 4486–4502.
- Cahill, D.P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G.J., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). **Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers.** *Nature* 392, 300–303.
- Cammass, F., Oulad-abdelghani, M., Vonesch, J., Huss-garcia, Y., and Chambon, P. (2002). **Cell differentiation induces TIF1 β association with centromeric heterochromatin via an HP1 interaction.** *J. Cell Sci.* 115, 3439–3448.
- Caramazza, D., Hussein, K., Siragusa, S., Pardanani, A., Knudson, R. a, Ketterling, R.P., and Tefferi, A. (2010). **Chromosome 1 abnormalities in myeloid malignancies: a literature survey and karyotype-phenotype associations.** *Eur. J. Haematol.* 84, 191–200.
- Carson, C.T., Orazio, N.I., Lee, D. V, Suh, J., Bekker-Jensen, S., Araujo, F.D., Lakdawala, S.S., Lilley, C.E., Bartek, J., Lukas, J., et al. (2009). **Mislocalization of the MRN complex prevents ATR signaling during adenovirus infection.** *EMBO J.* 28, 652–662.
- Carter, H., Samayoa, J., Hruban, R.H., and Karchin, R. (2010). **Prioritization of driver mutations in pancreatic cancer using cancer-specific high-throughput annotation of somatic mutations (CHASM).** *Cancer Biol. Ther.* 10, 582–587.

Carter, S.L., Eklund, A.C., Kohane, I.S., Harris, L.N., and Szallasi, Z. (2006). **A signature of chromosomal instability inferred from gene expression profiles predicts clinical outcome in multiple human cancers.** *Nat. Genet.* 38, 1043–1048.

Casalone, R., Albini, a, Righi, R., Granata, P., and Toniolo, a (2001). **Nonrandom chromosome changes in Kaposi sarcoma: cytogenetic and FISH results in a new cell line (KS-IMM) and literature review.** *Cancer Genet. Cytogenet.* 124, 16–19.

Castedo, M., and Kroemer, G. (2004). **La catastrophe mitotique : un cas particulier d'apoptose.** *J. Soc. Biol.* 198, 97–103.

Challen, G. a G., Boles, N.C.N.N.C., Chambers, S.M.S., and Goodell, M. a (2010). **Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1.** *Cell Stem Cell* 6, 265–278.

Chambon, M., Orsetti, B., Berthe, M.-L., Bascoul-Mollevi, C., Rodriguez, C., Duong, V., Gleizes, M., Thénot, S., Bibeau, F., Theillet, C., et al. (2011). **Prognostic significance of TRIM24/TIF-1 α gene expression in breast cancer.** *Am. J. Pathol.* 178, 1461–1469.

Chandhok, N.S., and Pellman, D. (2009). **A little CIN may cost a lot: revisiting aneuploidy and cancer.** *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 74–81.

Chao, W.C.H., Kulkarni, K., Zhang, Z., Kong, E.H., and Barford, D. (2012). **Structure of the mitotic checkpoint complex.** *Nature* 484, 208–213.

Cheeseman, I.M., and Desai, A. (2008). **Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 33–46.

Chen, L., Chen, D.-T., Kurtyka, C., Rawal, B., Fulp, W.J., Haura, E.B., and Cress, W.D. (2012). **Tripartite motif containing 28 (Trim28) can regulate cell proliferation by bridging HDAC1/E2F interactions.** *J. Biol. Chem.* 287, 40106–40118.

Chen, L., Muñoz-Antonia, T., and Cress, W.D. (2014). **Trim28 Contributes to EMT via Regulation of E-Cadherin and N-Cadherin in Lung Cancer Cell Lines.** *PLoS One* 9, e101040.

Cheng, M., Olivier, P., Diehl, J. a, Fero, M., Roussel, M.F., Roberts, J.M., and Sherr, C.J. (1999). **The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK “inhibitors” are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts.** *EMBO J.* 18, 1571–1583.

Chieffi, P., Cozzolino, L., Kisslinger, A., Libertini, S., Staibano, S., Mansueto, G., De Rosa, G., Villacci, A., Vitale, M., Linardopoulos, S., et al. (2006). **Aurora B expression directly correlates with prostate cancer malignancy and influence prostate cell proliferation.** *Prostate* 66, 326–333.

Chin, C.F., and Yeong, F.M. (2010). **Safeguarding entry into mitosis: the antephase checkpoint.** *Mol. Cell. Biol.* 30, 22–32.

Chow, J.P.H., Poon, R.Y.C., and Ma, H.T. (2011). **Inhibitory phosphorylation of cyclin-dependent kinase 1 as a compensatory mechanism for mitosis exit.** *Mol. Cell. Biol.* 31, 1478–1491.

- Civelekoglu-Scholey, G., and Scholey, J.M. (2010). **Mitotic force generators and chromosome segregation.** *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 2231–2250.
- Clijsters, L., van Zon, W., Riet, B. Ter, Voets, E., Boekhout, M., Ogink, J., Rumpf-Kienzl, C., and Wolthuis, R.M. (2014). **Inefficient degradation of cyclin B1 re-activates the spindle checkpoint right after sister chromatid disjunction.** *Cell Cycle* 13, 1–9.
- Clute, P., and Pines, J. (1999). **Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase.** *Nat. Cell Biol.* 1, 82–87.
- Colombo, R., and Moll, J. (2011). **Targeting aneuploid cancer cells.** *Expert Opin. Ther. Targets* 15, 595–608.
- Colombo, R., Caldarelli, M., Mennecozzi, M., Giorgini, M.L., Sola, F., Cappella, P., Perrera, C., Depaolini, S.R., Rusconi, L., Cucchi, U., et al. (2010). **Targeting the mitotic checkpoint for cancer therapy with NMS-P715, an inhibitor of MPS1 kinase.** *Cancer Res.* 70, 10255–10264.
- Conde, C., Osswald, M., Barbosa, J., Moutinho-Santos, T., Pinheiro, D., Guimarães, S., Matos, I., Maiato, H., and Sunkel, C.E. (2013). **Drosophila Polo regulates the spindle assembly checkpoint through Mps1-dependent BubR1 phosphorylation.** *EMBO J.* 32, 1761–1777.
- Coqueret, O. (2002). **Linking cyclins to transcriptional control.** *Gene* 299, 35–55.
- Cotsiki, M., Lock, R.L., Cheng, Y., Williams, G.L., Zhao, J., Perera, D., Freire, R., Entwistle, A., Golemis, E. a, Roberts, T.M., et al. (2004). **Simian virus 40 large T antigen targets the spindle assembly checkpoint protein Bub1.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 947–952.
- Cowan, J.M., Halaban, R., and Francke, U. (1988). **Cytogenetic analysis of melanocytes from premalignant nevi and melanomas.** *J. Natl. Cancer Inst.* 80, 1159–1164.
- Cuadrado, A., and Nebreda, A.R. (2010). **Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling.** *Biochem. J.* 429, 403–417.
- Cui, Z., Cao, W., Li, J., Song, X., Mao, L., and Chen, W. (2013). **TRIM24 overexpression is common in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma and correlates with aggressive malignant phenotypes.** *PLoS One* 8, e63887.
- Cytrynbaum, E.N., Scholey, J.M., and Mogilner, a (2003). **A force balance model of early spindle pole separation in Drosophila embryos.** *Biophys. J.* 84, 757–769.
- Dai, W., Wang, Q., Liu, T., Swamy, M., Fang, Y., Xie, S., Mahmood, R., Yang, Y., Xu, M., and Rao, C. V (2004). **Slippage of Mitotic Arrest and Enhanced Tumor Development in Mice with BubR1 Haploinsufficiency.** *Cancer Res.* 64, 440–445.
- Damelin, M., and Bestor, T. (2006). **Cutting Edge Decatenation Checkpoint Deficiency Destabilizes the Stem Cell Genome.** *Cell Cycle* 5, 345–346.
- Damelin, M., and Bestor, T.H. (2007). **The decatenation checkpoint.** *Br. J. Cancer* 96, 201–205.

- Damelin, M., Sun, Y.E., Sodja, V.B., and Bestor, T.H. (2005). **Decatenation checkpoint deficiency in stem and progenitor cells.** *Cancer Cell* 8, 479–484.
- Datto, M.B., Li, Y., Panus, J.F., Howe, D.J., Xiong, Y., and Wang, X.F. (1995). **Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5545–5549.
- Davenport, J., Harris, L.D., and Goorha, R. (2006). **Spindle checkpoint function requires Mad2-dependent Cdc20 binding to the Mad3 homology domain of BubR1.** *Exp. Cell Res.* 312, 1831–1842.
- Davidson, I. (2011). **Protéines TRIM : de nouveaux supresseurs du carcinome des cellules du foie.** *Igbmc*.
- Davoli, T., and de Lange, T. (2011). **The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 585–610.
- DeLuca, J.G., Howell, B.J., Canman, J.C., Hickey, J.M., Fang, G., and Salmon, E.D. (2003). **Nuf2 and Hec1 Are Required for Retention of the Checkpoint Proteins Mad1 and Mad2 to Kinetochores.** *Curr. Biol.* 13, 2103–2109.
- DeLuca, K.F., Lens, S.M. a, and DeLuca, J.G. (2011). **Temporal changes in Hec1 phosphorylation control kinetochore-microtubule attachment stability during mitosis.** *J. Cell Sci.* 124, 622–634.
- Deming, P.B., Cistulli, C. a, Zhao, H., Graves, P.R., Piwnicka-Worms, H., Paules, R.S., Downes, C.S., and Kaufmann, W.K. (2001). **The human decatenation checkpoint.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12044–12049.
- Deming, P.B., Flores, K.G., Downes, C.S., Paules, R.S., and Kaufmann, W.K. (2002). **ATR enforces the topoisomerase II-dependent G2 checkpoint through inhibition of Plk1 kinase.** *J. Biol. Chem.* 277, 36832–36838.
- Denchi, E.L., and Li, J. (2014). **Let it go: how to deal with a breakup in mitosis.** *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 433–435.
- Denslow, S. a, and Wade, P. a (2007). **The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation.** *Oncogene* 26, 5433–5438.
- Derynck, R., and Feng, X.H. (1997). **TGF-beta receptor signaling.** *Biochim. Biophys. Acta* 1333, F105–F150.
- Deshaies, R.J., and Joazeiro, C. a P. (2009). **RING domain E3 ubiquitin ligases.** *Annu. Rev. Biochem.* 78, 399–434.
- Diaz-Rodríguez, E., Sotillo, R., Schvartzman, J.-M., and Benezra, R. (2008). **Hec1 overexpression hyperactivates the mitotic checkpoint and induces tumor formation in vivo.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16719–16724.

Díaz-Rodríguez, E., Álvarez-Fernández, S., Chen, X., Paiva, B., López-Pérez, R., García-Hernández, J.L., San Miguel, J.F., and Pandiella, A. (2011). **Deficient spindle assembly checkpoint in multiple myeloma.** *PLoS One* 6, e27583.

Ten Dijke, P., and Hill, C.S. (2004). **New insights into TGF-beta-Smad signalling.** *Trends Biochem. Sci.* 29, 265–273.

Ding, Z.-Y., Jin, G.-N., Wang, W., Chen, W.-X., Wu, Y.-H., Ai, X., Chen, L., Zhang, W.-G., Liang, H.-F., Laurence, A., et al. (2014). **Reduced expression of TIF1 γ promotes metastasis and indicates poor prognosis of hepatocellular carcinoma.** *Hepatology*.

Diotti, R., and Loayza, D. (2011). **Shelterin complex and associated factors at human telomeres.** *Nucleus* 2, 119–135.

Dogterom, M., Kerssemakers, J.W.J., Romet-Lemonne, G., and Janson, M.E. (2005). **Force generation by dynamic microtubules.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 67–74.

Doisne, J.-M., Bartholin, L., Yan, K.-P., Garcia, C.N., Duarte, N., Le Luduec, J.-B., Vincent, D.F., Cyprian, F., Horvat, B., Martel, S., et al. (2009). **iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-beta signaling.** *J. Exp. Med.* 206, 1365–1378.

Le Douarin, B., Zechel, C., Garnier, J.M., Lutz, Y., Tora, L., Pierrat, P., Heery, D., Gronemeyer, H., Chambon, P., and Losson, R. (1995). **The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18.** *EMBO J.* 14, 2020–2033.

Le Douarin, B., Nielsen, A.L., Garnier, J., Ichinose, H., Jeanmougin, F., and Losson, R. (1996). **A possible involvement of TIF1a and TIF1b, in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors.** *EMBO J.* 15, 6701–6715.

Douglas, M.E., Davies, T., Joseph, N., and Mishima, M. (2010). **Aurora B and 14-3-3 coordinately regulate clustering of centralspindlin during cytokinesis.** *Curr. Biol.* 20, 927–933.

Downes, C.S., Clarke, D.J., Mullinger, A.M., Gimenez-Abian, J.F., M.Creighton, A., and Johnson, R.T. (1994). **A topoisomerase II-dependent G2 cycle checkpoint in mammalian cells.** *Nature*.

Doxsey, S., Zimmerman, W., and Mikule, K. (2005). **Centrosome control of the cell cycle.** *Trends Cell Biol.* 15, 303–311.

Drané, P., Alvarez, S., Meiller, A., and May, E. (2002). **L'activation de la protéine p53 , un événement déterminant de la réponse cellulaire aux radiations ionisantes.** *Médecine Nucléaire - Imag. Fonct. Métabolique* 26, 139–147.

Drilon, A., Wang, L., Hasanovic, A., Suehara, Y., Lipson, D., Stephens, P., Ross, J., Miller, V., Ginsberg, M., Zakowski, M.F., et al. (2013). **Response to Cabozantinib in patients with RET fusion-positive lung adenocarcinomas.** *Cancer Discov.* 3, 630–635.

- Dupont, S., Zacchigna, L., Cordenonsi, M., Soligo, S., Adorno, M., Rugge, M., and Piccolo, S. (2005). **Germ-Layer Specification and Control of Cell Growth by Ectoderm , a Smad4 Ubiquitin Ligase.** *Cell* 121, 87–99.
- Dupont, S., Mamidi, A., Cordenonsi, M., Montagner, M., Zacchigna, L., Adorno, M., Martello, G., Stinchfield, M.J., Soligo, S., Morsut, L., et al. (2009). **FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination.** *Cell* 136, 123–135.
- Dupont, S., Inui, M., and Newfeld, S.J. (2012). **Regulation of TGF-β signal transduction by mono- and deubiquitylation of Smads.** *FEBS Lett.* 586, 1913–1920.
- El-Nassan, H.B. (2013). **Advances in the discovery of kinesin spindle protein (Eg5) inhibitors as antitumor agents.** *Eur. J. Med. Chem.* 62, 614–631.
- Elowe, S. (2011). **Bub1 and BubR1: at the interface between chromosome attachment and the spindle checkpoint.** *Mol. Cell. Biol.* 31, 3085–3093.
- Den Elzen, N., and Pines, J. (2001). **Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase.** *J. Cell Biol.* 153, 121–136.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). **Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division.** *Cell* 33, 389–396.
- Falk, S., Joosten, E., Kaartinen, V., and Sommer, L. (2013). **Smad4 and Trim33/Tif1y Redundantly Regulate Neural Stem Cells in the Developing Cortex.** *Cereb. Cortex* 1–13.
- Falnikar, A., Tole, S., and Baas, P.W. (2011). **Kinesin-5, a mitotic microtubule-associated motor protein, modulates neuronal migration.** *Mol. Biol. Cell* 22, 1561–1574.
- Fattet, L., Ay, A.-S., Bonneau, B., Jallades, L., Mikaelian, I., Treilleux, I., Gillet, G., Hesling, C., and Rimokh, R. (2013). **TIF1y requires sumoylation to exert its repressive activity on TGFβ signaling.** *J. Cell Sci.* 126, 3713–3723.
- Feng, X.-H., and Derynck, R. (2005). **Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 659–693.
- Ferenz, N., Gable, A., and Wadsworth, P. (2010). **Mitotic functions of kinesin-5.** *Semin. Cell Dev. ...* 21, 255–259.
- Di Fiore, B., and Pines, J. (2010). **How cyclin A destruction escapes the spindle assembly checkpoint.** *J. Cell Biol.* 190, 501–509.
- Fiorentino, D., and Casciola-Rosen, L. (2012). **Autoantibodies to transcription intermediary factor 1 in dermatomyositis shed insight into the cancer-myositis connection.** *Arthritis Rheum.* 64, 346–349.

- Fisher, R.P. (2012). **The CDK Network: Linking Cycles of Cell Division and Gene Expression.** *Genes Cancer* 3, 731–738.
- Fisk, H. a, and Winey, M. (2001). **The mouse Mps1p-like kinase regulates centrosome duplication.** *Cell* 106, 95–104.
- Fisk, H. a, Mattison, C.P., and Winey, M. (2003). **Human Mps1 protein kinase is required for centrosome duplication and normal mitotic progression.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 14875–14880.
- Forester, C.M., Maddox, J., Louis, J. V, Goris, J., and Virshup, D.M. (2007). **Control of mitotic exit by PP2A regulation of Cdc25C and Cdk1.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 19867–19872.
- Forrester, N. a, Patel, R.N., Speiseder, T., Groitl, P., Sedgwick, G.G., Shimwell, N.J., Seed, R.I., Catnagh, P.Ó., McCabe, C.J., Stewart, G.S., et al. (2011). **Adenovirus E4orf3 targets Transcriptional Intermediary Factor 1 γ for proteasome-dependent degradation during infection.** *J. Virol.*
- Francis, J.M., Heyworth, C.M., Spooncer, E., Pierce, a, Dexter, T.M., and Whetton, a D. (2000). **Transforming growth factor-beta 1 induces apoptosis independently of p53 and selectively reduces expression of Bcl-2 in multipotent hematopoietic cells.** *J. Biol. Chem.* 275, 39137–39145.
- Freathy, C., Brown, D.G., Roberts, R. a, and Cain, K. (2000). **Transforming growth factor-beta(1) induces apoptosis in rat FaO hepatoma cells via cytochrome c release and oligomerization of Apaf-1 to form a approximately 700-kd apoptosome caspase-processing complex.** *Hepatology* 32, 750–760.
- Freedman, B., and Heald, R. (2010). **Functional Comparison of H1 Histones in Xenopus Reveals Isoform-Specific Regulation by Cdk1 and RanGTP.** *Curr. Biol.* 20, 1048–1052.
- Friedman, J.R., Fredericks, W.J., Jensen, D.E., Speicher, D.W., Huang, X.P., Neilson, E.G., and Rauscher, F.J. (1996). **KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain.** *Genes Dev.* 10, 2067–2078.
- Fujii, T., Nomoto, S., Koshikawa, K., Yatabe, Y., Teshigawara, O., Mori, T., Inoue, S., Takeda, S., and Nakao, A. (2006). **Overexpression of pituitary tumor transforming gene 1 in HCC is associated with angiogenesis and poor prognosis.** *Hepatology* 43, 1267–1275.
- Fujita, T., and Epperly, M. (2008). **Regulation of the Anaphase-promoting Complex-Separase Cascade by Transforming Growth Factor- β Modulates Mitotic Progression in Bone Marrow Stromal Cells.** *Mol. Biol. Cell.*
- Fukasawa, K. (2005). **Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development.** *Cancer Lett.* 230, 6–19.
- Fuller, B.G., Lampson, M. a, Foley, E. a, Rosasco-Nitcher, S., Le, K. V, Tobelmann, P., Brautigam, D.L., Stukenberg, P.T., and Kapoor, T.M. (2008). **Midzone activation of aurora B in anaphase produces an intracellular phosphorylation gradient.** *Nature* 453, 1132–1136.

- Fung, T.K., and Poon, R.Y.C. (2005). **A roller coaster ride with the mitotic cyclins.** *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 335–342.
- Fung, T.K., Ma, H.T., and Poon, R.Y.C. (2007). **Specialized Roles of the Two Mitotic Cyclins in Somatic Cells : Cyclin A as an Activator of M Phase – promoting Factor.** *Mol. Biol. Cell* 18, 1861–1873.
- Gandini, D., Angeli, C. De, Aguiari, G., Manzati, E., Lanza, F., Pandolfi, P.P., Cuneo, A., Castoldi, G.L., and Senno, L. (2002). **Preferential expression of the transcription coactivator HTIF1a gene in acute myeloid leukemia and MDS-related AML.** *Leukemia* 16, 886–893.
- Ganem, N.J., and Pellman, D. (2012). **Linking abnormal mitosis to the acquisition of DNA damage.** *J. Cell Biol.* 199, 871–881.
- Gascoigne, K.E., and Taylor, S.S. (2008). **Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs.** *Cancer Cell* 14, 111–122.
- Gasparian, a V, Laktionov, K.K., Belialova, M.S., Pirogova, N. a, Tatosyan, a G., and Zborovskaya, I.B. (1998). **Allelic imbalance and instability of microsatellite loci on chromosome 1p in human non-small-cell lung cancer.** *Br. J. Cancer* 77, 1604–1611.
- Geley, S., Kramer, E., Gieffers, C., Gannon, J., Peters, J.M., and Hunt, T. (2001). **Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint.** *J. Cell Biol.* 153, 137–148.
- Gemma, a, Seike, M., Seike, Y., Uematsu, K., Hibino, S., Kurimoto, F., Yoshimura, a, Shibuya, M., Harris, C.C., and Kudoh, S. (2000). **Somatic mutation of the hBUB1 mitotic checkpoint gene in primary lung cancer.** *Genes. Chromosomes Cancer* 29, 213–218.
- Giacinti, C., and Giordano, a (2006). **RB and cell cycle progression.** *Oncogene* 25, 5220–5227.
- Gibson, S.E., Zeng, W.F., Weil, R.J., and Prayson, R. a (2008). **Aurora B kinase expression in ependymal neoplasms.** *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 16, 274–278.
- Giehl, K., Imamichi, Y., and Menke, A. (2007). **Smad4-independent TGF-beta signaling in tumor cell migration.** *Cells. Tissues. Organs* 185, 123–130.
- Gilchrist, D.A., and Adelman, K. (2010). **moonshine Illuminates a Developmental Role for Regulated Transcription Elongation.** *Dev. Cell* 19, 9–10.
- Girdler, F., Gascoigne, K.E., Evers, P. a, Hartmuth, S., Crafter, C., Foote, K.M., Keen, N.J., and Taylor, S.S. (2006). **Validating Aurora B as an anti-cancer drug target.** *J. Cell Sci.* 119, 3664–3675.
- Gönczy, P., Pichler, S., Kirkham, M., and Hyman, A.A. (1999). **Positioning , Including Centrosome Separation , in the One Cell Stage Caenorhabditis elegans Embryo.** *J. Cell Biol.* 147, 135–150.

- Goodarzi, A. a, Noon, A.T., and Jeggo, P. a (2009). **The impact of heterochromatin on DSB repair.** *Biochem. Soc. Trans.* 37, 569–576.
- Goodarzi, A. a, Jeggo, P., and Lobrich, M. (2010). **The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax.** *DNA Repair (Amst).* 9, 1273–1282.
- Gottschalk, A.J., Trivedi, R.D., Conaway, J.W., and Conaway, R.C. (2012). **Activation of the SNF2 family ATPase ALC1 by poly(ADP-ribose) in a stable ALC1-PARP1-nucleosome intermediate.** *J. Biol. Chem.* 287, 43527–43532.
- Gout, J., Pommier, R.M., Vincent, D.F., Kaniewski, B., Martel, S., Valcourt, U., and Bartholin, L. (2013a). **Isolation and culture of mouse primary pancreatic acinar cells.** *J. Vis. Exp.* 1–8.
- Gout, J., Pommier, R.M., Vincent, D.F., Ripoche, D., Goddard-Léon, S., Colombe, A., Treilleux, I., Valcourt, U., Tomasini, R., Dufresne, M., et al. (2013b). **The conditional expression of KRAS G12D in mouse pancreas induces disorganization of endocrine islets prior the onset of ductal pre-cancerous lesions.** *Pancreatology* 13, 191–195.
- Grabsch, H., Takeno, S., Parsons, W.J., Pomjanski, N., Boecking, A., Gabbert, H.E., and Mueller, W. (2003). **Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1, BUBR1, and BUB3 in gastric cancer--association with tumour cell proliferation.** *J. Pathol.* 200, 16–22.
- Graves, P.R., Lovly, C.M., Uy, G.L., and Piwnicka-Worms, H. (2001). **Localization of human Cdc25C is regulated both by nuclear export and 14-3-3 protein binding.** *Oncogene* 20, 1839–1851.
- Groner, A.C., Meylan, S., Ciuffi, A., Zangger, N., Ambrosini, G., Déneraud, N., Bucher, P., and Trono, D. (2010). **KRAB-zinc finger proteins and KAP1 can mediate long-range transcriptional repression through heterochromatin spreading.** *PLoS Genet.* 6, e1000869.
- Guan, K.L., Jenkins, C.W., Li, Y., Nichols, M. a, Wu, X., O’Keefe, C.L., Matera, a G., and Xiong, Y. (1994). **Growth suppression by p18, a p16INK4/MTS1- and p14INK4B/MTS2-related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function.** *Genes Dev.* 8, 2939–2952.
- Guertin, D. a, Trautmann, S., and McCollum, D. (2002). **Cytokinesis in eukaryotes.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 155–178.
- Guo, L.R. (1990). **G-banding and high resolution chromosome study of a human lung adenocarcinoma cell line LGC-7910.** *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 12, 15–17.
- Guo, H., Tian, T., Nan, K., and Wang, W. (2010). **p57: A multifunctional protein in cancer (Review).** *Int. J. Oncol.* 36, 1321–1329.
- Guo, H., Lv, Y., Tian, T., Hu, T.H., Wang, W.J., Sui, X., Jiang, L., Ruan, Z.P., and Nan, K.J. (2011). **Downregulation of p57 accelerates the growth and invasion of hepatocellular carcinoma.** *Carcinogenesis* 32, 1897–1904.

- Guo, Y., Kim, C., Ahmad, S., Zhang, J., and Mao, Y. (2012). **CENP-E--dependent BubR1 autophosphorylation enhances chromosome alignment and the mitotic checkpoint.** *J. Cell Biol.* 198, 205–217.
- Güttinger, S., Laurell, E., and Kutay, U. (2009). **Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 178–191.
- Habu, T., and Matsumoto, T. (2013). **p31(comet) inactivates the chemically induced Mad2-dependent spindle assembly checkpoint and leads to resistance to anti-mitotic drugs.** *Springerplus* 2, 562.
- Hachet, V., Canard, C., and Gönczy, P. (2007). **Centrosomes promote timely mitotic entry in *C. elegans* embryos.** *Dev. Cell* 12, 531–541.
- Hachet, V., Busso, C., Toya, M., Sugimoto, A., Askjaer, P., and Gönczy, P. (2012). **The nucleoporin Nup205/NPP-3 is lost near centrosomes at mitotic onset and can modulate the timing of this process in *Caenorhabditis elegans* embryos.** *Mol. Biol. Cell* 23, 3111–3121.
- Hames, R.S., Wattam, S.L., Yamano, H., Bacchieri, R., and Fry, a M. (2001). **APC/C-mediated destruction of the centrosomal kinase Nek2A occurs in early mitosis and depends upon a cyclin A-type D-box.** *EMBO J.* 20, 7117–7127.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. a (2011). **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 144, 646–674.
- Hannon, G.J., and Beach, D. (1994). **p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest.** *Nature* 371, 257–261.
- Hashimoto, K., and Todo, T. (2013). **Mitotic slippage underlies the relationship between p53 dysfunction and the induction of large micronuclei by colcemid.** *Mutagenesis* 28, 457–464.
- Hassa, P.O., Haenni, S.S., Elser, M., and Hottiger, M.O. (2006). **Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going?.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 789–829.
- Hatakeyama, S. (2011). **TRIM proteins and cancer.** *Nat. Rev. Cancer* 11, 792–804.
- Hayama, S., Daigo, Y., Kato, T., Ishikawa, N., Yamabuki, T., Miyamoto, M., Ito, T., Tsuchiya, E., Kondo, S., and Nakamura, Y. (2006). **Activation of CDCA1-KNTC2, members of centromere protein complex, involved in pulmonary carcinogenesis.** *Cancer Res.* 66, 10339–10348.
- Hayashi, M.T., and Karlseder, J. (2013). **DNA damage associated with mitosis and cytokinesis failure.** *Oncogene* 32, 4593–4601.
- Hayashi, M.T., Cesare, A.J., Fitzpatrick, J. a J., Lazzerini-Denchi, E., and Karlseder, J. (2012). **A telomere-dependent DNA damage checkpoint induced by prolonged mitotic arrest.** *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 387–394.

He, W., Dorn, D.C., Erdjument-bromage, H., Tempst, P., Moore, M.A.S., and Massagué, J. (2006). **Hematopoiesis controlled by distinct TIF1 γ and Smad4 branches of the TGF β pathway.** *Cell* 125, 929–941.

Hediger, F., and Gasser, S.M. (2006). **Heterochromatin protein 1: don't judge the book by its cover!** *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 143–150.

Heldin, C.-H., Landström, M., and Moustakas, A. (2009). **Mechanism of TGF- β signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 166–176.

Heldin, C.-H., Vanlandewijck, M., and Moustakas, A. (2012). **Regulation of EMT by TGF β in cancer.** *FEBS Lett.* 586, 1959–1970.

Herkert, B., Dwertmann, A., Herold, S., Abed, M., Naud, J.-F., Finkernagel, F., Harms, G.S., Orian, A., Wanzel, M., and Eilers, M. (2010). **The Arf tumor suppressor protein inhibits Miz1 to suppress cell adhesion and induce apoptosis.** *J. Cell Biol.* 188, 905–918.

Hermesen, M. a, Joenje, H., Arwert, F., Welters, M.J., Braakhuis, B.J., Bagnay, M., Westerveld, a, and Slater, R. (1996). **Centromeric breakage as a major cause of cytogenetic abnormalities in oral squamous cell carcinoma.** *Genes. Chromosomes Cancer* 15, 1–9.

Herquel, B., Ouararhni, K., Khetchoumian, K., Ignat, M., Teletin, M., Mark, M., Béchade, G., Van Dorsselaer, A., Sanglier-Cianférani, S., Hamiche, A., et al. (2011a). **Transcription cofactors TRIM24, TRIM28, and TRIM33 associate to form regulatory complexes that suppress murine hepatocellular carcinoma.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 8212–8217.

Herquel, B., Ouararhni, K., and Davidson, I. (2011b). **The TIF1 α -related TRIM cofactors couple chromatin modifications to transcriptional regulation, signaling and tumor suppression.** *Transcription* 2, 231–236.

Herquel, B., Ouararhni, K., Martjanov, I., Le Gras, S., Ye, T., Keime, C., Lerouge, T., Jost, B., Cammas, F., Losson, R., et al. (2013). **Trim24-repressed VL30 retrotransposons regulate gene expression by producing noncoding RNA.** *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 339–346.

Hesling, C., Fattet, L., Teyre, G., Jury, D., Gonzalo, P., Lopez, J., Vanbelle, C., Morel, A.-P., Gillet, G., Mikaelian, I., et al. (2011). **Antagonistic regulation of EMT by TIF1 γ and Smad4 in mammary epithelial cells.** *EMBO Rep.* 12, 665–672.

Hesling, C., Lopez, J., Fattet, L., Gonzalo, P., Treilleux, I., Blanchard, D., Losson, R., Goffin, V., Pigat, N., Puisieux, A., et al. (2013). **Tif1 γ is essential for the terminal differentiation of mammary alveolar epithelial cells and for lactation through SMAD4 inhibition.** *Development* 140, 167–175.

Hewitt, L., Tighe, A., Santaguida, S., White, A.M., Jones, C.D., Musacchio, A., Green, S., and Taylor, S.S. (2010). **Sustained Mps1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1-C-Mad2 core complex.** *J. Cell Biol.* 190, 25–34.

- Hill, C.S. (2001). **TGF-beta signalling pathways in early Xenopus development.** *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 533–540.
- Hinchcliffe, E.H. (1999). **Requirement of Cdk2-Cyclin E Activity for Repeated Centrosome Reproduction in Xenopus Egg Extracts.** *Science (80-.).* 283, 851–854.
- Hirano, T. (2000). **Chromosome cohesion, condensation, and separation.** *Annu. Rev. Biochem.* 69, 115–144.
- Hirano, T. (2005a). **Condensins: organizing and segregating the genome.** *Curr. Biol.* 15, R265–R275.
- Hirano, T. (2005b). **SMC proteins and chromosome mechanics: from bacteria to humans.** *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360, 507–514.
- Hisaoka, M., Matsuyama, A., and Hashimoto, H. (2008). **Aberrant MAD2 expression in soft-tissue sarcoma.** *Pathol. Int.* 58, 329–333.
- Hochegger, H., Takeda, S., and Hunt, T. (2008). **Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions : does one fit all ?.** *Nature* 9.
- Hoggard, N., Hey, Y., Brintnell, B., James, L., Jones, D., Mitchell, E., Weissenbach, J., and Varley, J.M. (1995). **Identification and cloning in yeast artificial chromosomes of a region of elevated loss of heterozygosity on chromosome 1p31.1 in human breast cancer.** *Genomics* 30, 233–243.
- Holy, T.E., and Leibler, S. (1994). **Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 5682–5685.
- Holy, T.E., Dogterom, M., Yurke, B., and Leibler, S. (1997). **Assembly and positioning of microtubule asters in microfabricated chambers.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 6228–6231.
- Van der Horst, A., and Lens, S.M. a (2014). **Cell division: control of the chromosomal passenger complex in time and space.** *Chromosoma* 123, 25–42.
- Hoshino, K., Muro, Y., Sugiura, K., Tomita, Y., Nakashima, R., and Mimori, T. (2010). **Anti-MDA5 and anti-TIF1-c antibodies have clinical significance for patients with dermatomyositis.** *Rheumatology (Oxford).* 49, 1726–1733.
- Huang, F., and Chen, Y.-G. (2012). **Regulation of TGF-β receptor activity.** *Cell Biosci.* 2, 9.
- Huang, Y.-F., Chang, M.D.-T., and Shieh, S.-Y. (2009). **TTK/hMps1 mediates the p53-dependent postmitotic checkpoint by phosphorylating p53 at Thr18.** *Mol. Cell. Biol.* 29, 2935–2944.
- Huibregtse, J. m., Scheffner, M., Beaudenon, S., and Howley, P. m. (1995). **A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92, 2563–2567.

- Ignat, M., Teletin, M., Tisserand, J., Khetchoumian, K., Dennefeld, C., Chambon, P., Losson, R., and Mark, M. (2008). **Arterial calcifications and increased expression of vitamin D receptor targets in mice lacking TIF1alpha.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 2598–2603.
- Ikeuchi, Y., Dadakhujaev, S., Chandhoke, a. S., Huynh, M. a., Oldenborg, A., Ikeuchi, M., Deng, L., Bennett, E.J., Harper, J.W., Bonni, A., et al. (2014). **TIF1g Regulates Epithelial Mesenchymal Transition by Operating as a SUMO E3 Ligase for the Transcriptional Regulator SnoN1.** *J. Biol. Chem.*
- Ikushima, H., and Miyazono, K. (2010). **Cellular context-dependent “colors” of transforming growth factor-beta signaling.** *Cancer Sci.* *101*, 306–312.
- Inamoto, S., Segil, N., Pan, Z.-Q., Kimura, M., and Roeder, R.G. (1997). **The Cyclin-dependent Kinase-activating Kinase (CAK) Assembly Factor, MAT1, Targets and Enhances CAK Activity on the POU Domains of Octamer Transcription Factors.** *J. Biol. Chem.* *272*, 29852–29858.
- Inman, G.J. (2011). **Switching TGFβ from a tumor suppressor to a tumor promoter.** *Curr. Opin. Genet. Dev.* *21*, 93–99.
- Inman, G.J., and Allday, M.J. (2000). **Apoptosis Induced by TGF-1 in Burkitt's Lymphoma Cells Is Caspase 8 Dependent But Is Death Receptor Independent.** *J. Immunol.* *165*, 2500–2510.
- Ito, K., Imafuku, S., Hamaguchi, Y., Fujimoto, M., and Nakayama, J. (2013). **Case report of anti-transcription intermediary factor-1-γ/α antibody-positive dermatomyositis associated with gastric cancer and immunoglobulin G4-positive pulmonary inflammatory pseudotumor.** *J. Dermatol.* *40*, 567–569.
- Itokawa, Y., Yanagawa, T., Yamakawa, H., Watanabe, N., Koga, H., and Nagase, T. (2009). **KAP1-independent transcriptional repression of SCAN-KRAB-containing zinc finger proteins.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *388*, 689–694.
- Ivanov, A. V, Peng, H., Yurchenko, V., Yap, K.L., Negorev, D.G., Schultz, D.C., Psulkowski, E., Fredericks, W.J., White, D.E., Maul, G.G., et al. (2007). **PHD domain-mediated E3 ligase activity directs intramolecular sumoylation of an adjacent bromodomain required for gene silencing.** *Mol. Cell* *28*, 823–837.
- Iwanaga, Y., Chi, Y.-H., Miyazato, A., Sheleg, S., Haller, K., Peloponese, J.-M., Li, Y., Ward, J.M., Benezra, R., and Jeang, K.-T. (2007). **Heterozygous deletion of mitotic arrest-deficient protein 1 (MAD1) increases the incidence of tumors in mice.** *Cancer Res.* *67*, 160–166.
- Iyengar, S., and Farnham, P.J. (2011). **KAP1 protein: an enigmatic master regulator of the genome.** *J. Biol. Chem.* *286*, 26267–26276.
- Iyengar, S., Ivanov, A. V, Jin, V.X., Rauscher, F.J., and Farnham, P.J. (2011). **Functional analysis of KAP1 genomic recruitment.** *Mol. Cell. Biol.* *31*, 1833–1847.
- Jackman, M., Lindon, C., Nigg, E. a, and Pines, J. (2003). **Active cyclin B1-Cdk1 first appears on centrosomes in prophase.** *Nat. Cell Biol.* *5*, 143–148.

- Jackson, J.R., Patrick, D.R., Dar, M.M., and Huang, P.S. (2007). **Targeted anti-mitotic therapies: can we improve on tubulin agents?**. *Nat. Rev. Cancer* 7, 107–117.
- Jain, A.K., and Barton, M.C. (2009). **Regulation of p53 TRIM24 enters the RING**. *Cell Cycle* 8, 3668–3674.
- Jain, A.K., Allton, K., Duncan, A.D., and Barton, M.C. (2014). **TRIM24 is a p53-Induced E3-Ubiquitin Ligase that undergoes ATM-Mediated Phosphorylation and Autodegradation during DNA Damage**. *Mol. Cell. Biol.*
- Jain, S., Singhal, S., Francis, F., Hajdu, C., Wang, J.-H., Suriawinata, A., Wang, Y.-Q., Zhang, M., Weinschel, E.H., Francois, F., et al. (2011). **Association of overexpression of TIF1 γ with colorectal carcinogenesis and advanced colorectal adenocarcinoma**. *World J. Gastroenterol.* 17, 3994–4000.
- Jallepalli, P. V, Waizenegger, I.C., Bunz, F., Langer, S., Speicher, M.R., Peters, J.M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Lengauer, C. (2001). **Securin is required for chromosomal stability in human cells**. *Cell* 105, 445–457.
- Jantsch-Plunger, V., Gönczy, P., Romano, a, Schnabel, H., Hamill, D., Schnabel, R., Hyman, a, and Glotzer, M. (2000). **CYK-4: A Rho family gtpase activating protein (GAP) required for central spindle formation and cytokinesis**. *J. Cell Biol.* 149, 1391–1404.
- Javelaud, D., and Mauviel, A. (2004). **Mammalian transforming growth factor-betas: Smad signaling and physio-pathological roles**. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1161–1165.
- Javelaud, D., and Mauviel, A. (2005). **Crosstalk mechanisms between the mitogen-activated protein kinase pathways and Smad signaling downstream of TGF-beta: implications for carcinogenesis**. *Oncogene* 24, 5742–5750.
- Jeganathan, K., Malureanu, L., Baker, D.J., Abraham, S.C., and van Deursen, J.M. (2007). **Bub1 mediates cell death in response to chromosome missegregation and acts to suppress spontaneous tumorigenesis**. *J. Cell Biol.* 179, 255–267.
- Jelluma, N., Brenkman, A.B., van den Broek, N.J.F., Cruijssen, C.W. a, van Osch, M.H.J., Lens, S.M. a, Medema, R.H., and Kops, G.J.P.L. (2008). **Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment**. *Cell* 132, 233–246.
- Jemaà, M., Galluzzi, L., Kepp, O., Senovilla, L., Brands, M., Boemer, U., Koppitz, M., Lienau, P., Prechtel, S., Schulze, V., et al. (2013). **Characterization of novel MPS1 inhibitors with preclinical anticancer activity**. *Cell Death Differ.* 20, 1532–1545.
- Jiang, J., and Sliva, D. (2010). **Novel medicinal mushroom blend suppresses growth and invasiveness of human breast cancer cells**. *Int. J. Oncol.* 37, 1529–1536.
- Jiang, J., Jedinak, A., and Sliva, D. (2011). **Ganodermanontriol (GDNT) exerts its effect on growth and invasiveness of breast cancer cells through the down-regulation of CDC20 and uPA**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 415, 325–329.

- Jiang, J., Thyagarajan-Sahu, A., Krchňák, V., Jedinak, A., Sandusky, G.E., and Sliva, D. (2012). **NAHA, a novel hydroxamic acid-derivative, inhibits growth and angiogenesis of breast cancer in vitro and in vivo.** *PLoS One* 7, e34283.
- Jin, D.Y., Spencer, F., and Jeang, K.T. (1998a). **Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein MAD1.** *Cell* 93, 81–91.
- Jin, Y., Jin, C., Wennerberg, J., Mertens, F., and Höglund, M. (1998b). **Cytogenetic and Fluorescence in Situ Hybridization Characterization of Chromosome 1 Rearrangements in Head and Neck Carcinomas Delineate a Target Region for Deletions within 1p11 – 1p13.** *Cancer Res.* 58, 5859–5865.
- Johansson, M., Rich, C.D., Mandahl, N., Hambreus, G., Johansson, L., and Clausen, P.P. (1994). **KARYOTYPIC CHARACTERIZATION OF BRONCHIAL LARGE CELL CARCINOMAS.** *Int. J. Cancer* 467, 463–467.
- Johnson, D.G., and Walker, C.L. (1999). **Cyclins and cell cycle checkpoints.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 295–312.
- Johnson, V.L., Scott, M.I.F., Holt, S. V, Hussein, D., and Taylor, S.S. (2004). **Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression.** *J. Cell Sci.* 117, 1577–1589.
- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C.-H., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., et al. (2008). **Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses.** *Science (80-).* 321, 1801–1806.
- Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., and Edlund, H. (1994). **Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice.** *Nature.*
- Jordan, M.A., and Wilson, L. (2004). **Microtubules as a target for anticancer drugs.** *Nat. Rev. Cancer* 4.
- Kagey, M.H., Newman, J.J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D. a, van Berkum, N.L., Ebmeier, C.C., Goossens, J., Rahl, P.B., Levine, S.S., et al. (2010). **Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture.** *Nature* 467, 430–435.
- Kang, Y., and Massagué, J. (2004). **Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis.** *Cell* 118, 277–279.
- Kang, N., Wang, M.-M., Wang, Y.-H., Zhang, Z.-N., Cao, H.-R., Lv, Y.-H., Yang, Y., Fan, P.-H., Qiu, F., and Gao, X.-M. (2014). **Tetrahydrocurcumin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis involving p38 MAPK activation in human breast cancer cells.** *Food Chem. Toxicol.* 67, 193–200.
- Kang, Y., Chen, C.-R., and Massagué, J. (2003). **A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells.** *Mol. Cell* 11, 915–926.

Kantarjian, H., Oki, Y., Garcia-Manero, G., Huang, X., O'Brien, S., Cortes, J., Faderl, S., Bueso-Ramos, C., Ravandi, F., Estrov, Z., et al. (2007). **Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia.** *Blood* 109, 52–57.

Kapitein, L.C., Peterman, E.J.G., Kwok, B.H., Kim, J.H., Kapoor, T.M., and Schmidt, C.F. (2005). **The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks.** *Nature* 435, 114–118.

Kasai, T., Iwanaga, Y., Iha, H., and Jeang, K.-T. (2002). **Prevalent loss of mitotic spindle checkpoint in adult T-cell leukemia confers resistance to microtubule inhibitors.** *J. Biol. Chem.* 277, 5187–5193.

Kasbek, C., Yang, C.-H., Yusof, A.M., Chapman, H.M., Winey, M., and Fisk, H. a (2007). **Preventing the degradation of mps1 at centrosomes is sufficient to cause centrosome reduplication in human cells.** *Mol. Biol. Cell* 18, 4457–4469.

Kastan, M.B., and Bartek, J. (2004). **Cell-cycle checkpoints and cancer.** *Nature* 432, 316–323.

Kasuya, A., Hamaguchi, Y., Fujimoto, M., and Tokura, Y. (2013). **TIF1 γ -overexpressing, highly progressive endometrial carcinoma in a patient with dermatomyositis positive for malignancy-associated anti-p155/140 autoantibody.** *Acta Derm. Venereol.* 93, 715–716.

Khetchoumian, K., Teletin, M., Mark, M., Lerouge, T., Cerviño, M., Oulad-Abdelghani, M., Chambon, P., and Losson, R. (2004). **TIF1 δ , a novel HP1-interacting member of the transcriptional intermediary factor 1 (TIF1) family expressed by elongating spermatids.** *J. Biol. Chem.* 279, 48329–48341.

Khetchoumian, K., Teletin, M., Tisserand, J., Mark, M., Herquel, B., Ignat, M., Zucman-Rossi, J., Cammas, F., Lerouge, T., Thibault, C., et al. (2007). **Loss of Trim24 (Tif1 α) gene function confers oncogenic activity to retinoic acid receptor alpha.** *Nat. Genet.* 39, 1500–1506.

Khetchoumian, K., Teletin, M., Tisserand, J., Herquel, B., Ouararhni, K., and Losson, R. (2008). **Trim24 (Tif1 α) An essential “brake” for retinoic acid-induced transcription to prevent liver cancer.** *Cell Cycle* 24, 3647–3652.

Khodjakov, A., Copenagle, L., Gordon, M.B., Compton, D. a, and Kapoor, T.M. (2003). **Minus-end capture of preformed kinetochore fibers contributes to spindle morphogenesis.** *J. Cell Biol.* 160, 671–683.

Kim, J., and Kaartinen, V. (2008). **Generation of mice with a conditional allele for Trim33.** *Genesis* 46, 329–333.

Kim, H.-S., Park, K.H., Kim, S. a, Wen, J., Park, S.W., Park, B., Gham, C.-W., Hyung, W.J., Noh, S.H., Kim, H.K., et al. (2005). **Frequent mutations of human Mad2, but not Bub1, in gastric cancers cause defective mitotic spindle checkpoint.** *Mutat. Res.* 578, 187–201.

Kim, S.S., Chen, Y.M., O'Leary, E., Witzgall, R., Vidal, M., and Bonventre, J. V (1996). **A novel member of the RING finger family, KRIP-1, associates with the KRAB-A transcriptional repressor domain of zinc finger proteins.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 15299–15304.

Kimm, L.R., Ronald, J., Savage, K.J., Rosenwald, A., Campo, E., Delabie, J., Ott, G., Jaffe, E.S., Rimsza, L.M., Weisenburger, D.D., et al. (2007). **Frequent Occurrence of Deletions in Primary Mediastinal B-Cell Lymphoma.** *Genes. Chromosomes Cancer* 1097, 1090–1097.

Kimura, K. (1998). **Phosphorylation and Activation of 13S Condensin by Cdc2 in Vitro.** *Science (80-)*. 282, 487–490.

Kimura, K., Rybenkov, V. V, Crisona, N.J., Hirano, T., and Cozzarelli, N.R. (1999). **13S condensin actively reconfigures DNA by introducing global positive writhe: implications for chromosome condensation.** *Cell* 98, 239–248.

Kiyomitsu, T., and Cheeseman, I.M. (2013). **Cortical dynein and asymmetric membrane elongation coordinately position the spindle in anaphase.** *Cell* 154, 391–402.

Klugbauer, S., and Rabes, H.M. (1999). **The transcription coactivator HTIF1 and a related protein are fused to the RET receptor tyrosine kinase in childhood papillary thyroid carcinomas.** *Oncogene* 18, 4388–4393.

Kops, G.J.P.L., Foltz, D.R., and Cleveland, D.W. (2004). **Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8699–8704.

Kops, G.J.P.L., Weaver, B. a a, and Cleveland, D.W. (2005). **On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint.** *Nat. Rev. Cancer* 5, 773–785.

Kotak, S., and Gönczy, P. (2013). **Mechanisms of spindle positioning: cortical force generators in the limelight.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 741–748.

Kotak, S., Busso, C., and Gönczy, P. (2013). **NuMA phosphorylation by CDK1 couples mitotic progression with cortical dynein function.** *EMBO J.* 32, 2517–2529.

Koumoundourou, D., Kassimatis, T., Zolota, V., Tzorakoeleftherakis, E., Ravazoula, P., Vassiliou, V., Kardamakis, D., and Varakis, J. (2007). **Prognostic significance of TGFbeta-1 and pSmad2/3 in breast cancer patients with T1-2,N0 tumours.** *Anticancer Res.* 27, 2613–2620.

Krystal, B.G., Lain, V., Dragowska, W., Takahashi, C., Appel, J., Gontier, A., Jenkins, A., Lain, H., Quon, L., and Lansdorp, P. (1994). **Transforming Growth Factor beta is an inducer of erythroid differentiation.** *J. Exp. Med.* 180.

Kulkarni, A., Oza, J., Yao, M., Sohail, H., Ginjala, V., Tomas-Loba, A., Horejsi, Z., Tan, A.R., Boulton, S.J., and Ganesan, S. (2013). **Tripartite Motif-containing 33 (TRIM33) protein functions in the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-dependent DNA damage response through interaction with Amplified in Liver Cancer 1 (ALC1) protein.** *J. Biol. Chem.* 288, 32357–32369.

- Kuntz, K., and Connell, M.J.O. (2009). **The G2 DNA damage checkpoint - Could this ancient regulator be the achilles heel of cancer?**. *Cancer Biol. Ther.* 15, 1433–1439.
- Kusy, S., and Roméo, P. (2011). **TIF1gamma is a chief conductor of the hematopoietic system.** *Med. / Sci.* 7–9.
- Kusy, S., Gault, N., Ferri, F., Lewandowski, D., Barroca, V., Jaracz-Ros, A., Losson, R., and Romeo, P.-H. (2011). **Adult hematopoiesis is regulated by TIF1y, a repressor of TAL1 and PU.1 transcriptional activity.** *Cell Stem Cell* 8, 412–425.
- Kwon, S.H., and Workman, J.L. (2008). **The Heterochromatin Protein 1 (HP1) Family : Put Away a Bias toward HP1.** *Mol. Cells* 26, 217–227.
- Lacey, K.R., Jackson, P.K., and Stearns, T. (1999). **Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 2817–2822.
- Lampson, M. a, and Cheeseman, I.M. (2011). **Sensing centromere tension: Aurora B and the regulation of kinetochore function.** *Trends Cell Biol.* 21, 133–140.
- Laoukili, J., Kooistra, M.R.H., Brás, A., Kauw, J., Kerkhoven, R.M., Morrison, A., Clevers, H., and Medema, R.H. (2005). **FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability.** *Nat. Cell Biol.* 7, 126–136.
- Laoukili, J., Alvarez, M., Meijer, L. a T., Stahl, M., Mohammed, S., Kleij, L., Heck, A.J.R., and Medema, R.H. (2008). **Activation of FoxM1 during G2 requires cyclin A/Cdk-dependent relief of autorepression by the FoxM1 N-terminal domain.** *Mol. Cell. Biol.* 28, 3076–3087.
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F.G., and Taylor, S.S. (2012). **The spindle assembly checkpoint.** *Curr. Biol.* 22, R966–R980.
- Larijani, B., and Poccia, D.L. (2009). **Nuclear envelope formation: mind the gaps.** *Annu. Rev. Biophys.* 38, 107–124.
- Larsson, L.-G. (2011). **Oncogene- and tumor suppressor gene-mediated suppression of cellular senescence.** *Semin. Cancer Biol.* 21, 367–376.
- Leao, M., Anderton, E., Wade, M., Meekings, K., and Allday, M.J. (2007). **Epstein-barr virus-induced resistance to drugs that activate the mitotic spindle assembly checkpoint in Burkitt's lymphoma cells.** *J. Virol.* 81, 248–260.
- Lee, D.-H., Goodarzi, A. a, Adelmant, G.O., Pan, Y., Jeggo, P. a, Marto, J. a, and Chowdhury, D. (2012). **Phosphoproteomic analysis reveals that PP4 dephosphorylates KAP-1 impacting the DNA damage response.** *EMBO J.* 31, 2403–2415.
- Lee, M.K., Pardoux, C., Hall, M.C., Lee, P.S., Warburton, D., Qing, J., Smith, S.M., and Derynck, R. (2007a). **TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA.** *EMBO J.* 26, 3957–3967.
- Lee, Y.-K., Thomas, S.N., Yang, A.J., and Ann, D.K. (2007b). **Doxorubicin down-regulates Kruppel-associated box domain-associated protein 1 sumoylation that relieves its**

transcription repression on p21WAF1/CIP1 in breast cancer MCF-7 cells. *J. Biol. Chem.* 282, 1595–1606.

Li, C., Chen, L., Gao, X., Qu, X., Shen, W., Yang, R., Zhang, R., Qiu, H., Xu, J., Lu, H., et al. (2011). **Plasma cell labeling index correlates with deletion of 13q14 in multiple myeloma.** *Leuk. Lymphoma* 52, 260–264.

Li, H., Sun, L., Tang, Z., Fu, L., Xu, Y., Li, Z., Luo, W., Qiu, X., and Wang, E. (2012). **Overexpression of TRIM24 correlates with tumor progression in non-small cell lung cancer.** *PLoS One* 7, e37657.

Li, H., Wawrose, J.S., Gooding, W.E., Garraway, L. a, Lui, V.W.Y., Peysner, N.D., and Grandis, J.R. (2014). **Genomic analysis of head and neck squamous cell carcinoma cell lines and human tumors: a rational approach to preclinical model selection.** *Mol. Cancer Res.* 12, 571–582.

Li, M., York, J.P., and Zhang, P. (2007). **Loss of Cdc20 causes a securin-dependent metaphase arrest in two-cell mouse embryos.** *Mol. Cell. Biol.* 27, 3481–3488.

Li, W., Lan, Z., Wu, H., Wu, S., Meadows, J., Chen, J., Zhu, V., and Dai, W. (1999). **BUBR1 phosphorylation is regulated during mitotic checkpoint activation.** *Cell Growth Differ.* 10, 769–775.

Li, Y., Bachant, J., Alcasabas, A. a, Wang, Y., Qin, J., and Elledge, S.J. (2002). **The mitotic spindle is required for loading of the DASH complex onto the kinetochore.** *Genes Dev.* 16, 183–197.

Ligr, M., Wu, X., Daniels, G., Zhang, D., Wang, H., Hajdu, C., Wang, J., Pan, R., Pei, Z., Zhang, L., et al. (2014). **Imbalanced expression of Tif1 γ inhibits pancreatic ductal epithelial cell growth.** *Am. J. Cancer Res.* 4, 196–210.

Lin, D.I., Barbash, O., Kumar, K.G.S., Weber, J.D., Harper, J.W., Klein-Szanto, A.J.P., Rustgi, A., Fuchs, S.Y., and Diehl, J.A. (2006). **Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin D1 by the SCF(FBX4- α B crystallin) complex.** *Mol. Cell* 24, 355–366.

Lin, L., Li, C., Wang, W., Yang, W.-M., Wang, D.D.-H., Chang, W.-C., Lee, W.-H., and Wang, J.-M. (2013). **Loss of ZBRK1 Contributes to the Increase of KAP1 and Promotes KAP1-Mediated Metastasis and Invasion in Cervical Cancer.** *PLoS One* 8, 1–13.

Ling, Y., Zhang, X., Bai, Y., Li, P., Wei, C., Song, T., Zheng, Z., Guan, K., Zhang, Y., Zhang, B., et al. (2014). **Overexpression of Mps1 in colon cancer cells attenuates the spindle assembly checkpoint and increases aneuploidy.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450, 1690–1695.

Lipinski, M.M., and Jacks, T. (1999). **The retinoblastoma gene family in differentiation and development.** *Oncogene* 18, 7873–7882.

Lipkowitz, S., and Weissman, A.M. (2013). **RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis.** *Nat. Rev. Cancer* 11, 629–643.

- Liu, X., and Winey, M. (2012). **The MPS1 family of protein kinases.** *Annu. Rev. Biochem.* 81, 561–585.
- Liu, a-W., Cai, J., Zhao, X.-L., Xu, a-M., Fu, H.-Q., Nian, H., and Zhang, S.-H. (2009). **The clinicopathological significance of BUBR1 overexpression in hepatocellular carcinoma.** *J. Clin. Pathol.* 62, 1003–1008.
- Liu, L., Zhao, E., Li, C., Huang, L., Xiao, L., Cheng, L., Huang, X., Song, Y., and Xu, D. (2013). **TRIM28, a new molecular marker predicting metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer.** *Cancer Epidemiol.* 37, 71–78.
- Loh, Y.-H., Wu, Q., Chew, J.-L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., et al. (2006). **The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells.** *Nat. Genet.* 38, 431–440.
- London, N., and Biggins, S. (2014). **Mad1 kinetochore recruitment by Mps1-mediated phosphorylation of Bub1 signals the spindle checkpoint.** *Genes Dev.* 28, 140–152.
- Lopez-Gines, C., Cerda-Nicolas, M., Gil-Benso, R., Callaghan, R., Collado, M., Roldan, P., and Llombart-Bosch, A. (2004). **Association of loss of 1p and alterations of chromosome 14 in meningioma progression.** *Cancer Genet. Cytogenet.* 148, 123–128.
- Losada, A. (2014). **Cohesin in cancer: chromosome segregation and beyond.** *Nat. Rev. Cancer* 14, 389–393.
- LS, M., V, L., A, C., R, K., B, P., W, G., M, D., PK, S., VV, M., R, B., et al. (2001). **MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells.** *Nature* 409, 355–359.
- Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2004). **Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time.** *DNA Repair (Amst).* 3, 997–1007.
- Lukeis, R., Ball, D., Irving, L., Garson, O.M., and Hasthorpe, S. (1993). **Chromosome abnormalities in non-small cell lung cancer pleural effusions: Cytogenetic indicators of disease subgroups.** *Genes Chromosom. Cancer* 8, 262–269.
- Luo, L., Parrish, C. a, Nevins, N., McNulty, D.E., Chaudhari, A.M., Carson, J.D., Sudakin, V., Shaw, A.N., Lehr, R., Zhao, H., et al. (2007). **ATP-competitive inhibitors of the mitotic kinesin KSP that function via an allosteric mechanism.** *Nat. Chem. Biol.* 3, 722–726.
- Maddika, S., Ande, S.R., Panigrahi, S., Paranjothy, T., Weglarczyk, K., Zuse, A., Eshraghi, M., Manda, K.D., Wiechec, E., and Los, M. (2007). **Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy.** *Drug Resist. Updat.* 10, 13–29.
- Maeshima, K., and Laemmli, U.K. (2003). **A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly.** *Dev. Cell* 4, 467–480.
- Maldonado, M., and Kapoor, T.M. (2011). **Constitutive Mad1 targeting to kinetochores uncouples checkpoint signalling from chromosome biorientation.** *Nat. Cell Biol.* 13, 475–482.

- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2005). **Mammalian cyclin-dependent kinases.** *Trends Biochem. Sci.* 30, 630–641.
- Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). **Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm.** *Nat. Rev. Cancer* 9, 153–166.
- Manchado, E., Guillamot, M., de Cárcer, G., Eguren, M., Trickey, M., García-Higuera, I., Moreno, S., Yamano, H., Cañamero, M., and Malumbres, M. (2010). **Targeting mitotic exit leads to tumor regression in vivo: Modulation by Cdk1, Mastl, and the PP2A/B55 α , δ phosphatase.** *Cancer Cell* 18, 641–654.
- Manchado, E., Guillamot, M., and Malumbres, M. (2012). **Killing cells by targeting mitosis.** *Cell Death Differ.* 19, 369–377.
- Mao, Y., Abrieu, A., and Cleveland, D.W. (2003). **Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E-dependent activation/inactivation of BubR1.** *Cell* 114, 87–98.
- Marcus, A.I., Peters, U., Thomas, S.L., Garrett, S., Zelnak, A., Kapoor, T.M., and Giannakakou, P. (2005). **Mitotic kinesin inhibitors induce mitotic arrest and cell death in Taxol-resistant and -sensitive cancer cells.** *J. Biol. Chem.* 280, 11569–11577.
- Maresca, T.J., Freedman, B.S., and Heald, R. (2005). **Histone H1 is essential for mitotic chromosome architecture and segregation in *Xenopus laevis* egg extracts.** *J. Cell Biol.* 169, 859–869.
- Martin-Lluesma, S., Stucke, V., and Nigg, E. (2002). **Role of Hec1 in spindle checkpoint signaling and kinetochore recruitment of Mad1/Mad2.** *Science (80-.).* 297, 2267–2270.
- Martins, M.B., Marcello, M.A., Morari, E.C., Cunha, L.L., Soares, F.A., Vassallo, J., and Ward, L.S. (2013). **Clinical utility of KAP-1 expression in thyroid lesions.** *Endocr. Pathol.* 24, 77–82.
- Marxer, M., Ma, H.T., Man, W.Y., and Poon, R.Y.C. (2014). **p53 deficiency enhances mitotic arrest and slippage induced by pharmacological inhibition of Aurora kinases.** *Oncogene* 33, 3550–3560.
- Massagué, J. (2004). **G1 cell-cycle control and cancer.** *Nature* 432.
- Massagué, J. (2008). **TGFbeta in Cancer.** *Cell* 134, 215–230.
- Massagué, J. (2012). **TGF β signalling in context.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 616–630.
- Massagué, J., and Xi, Q. (2012). **TGF-b control of stem cell differentiation genes.** *FEBS Lett.* 0–5.
- Mathew, S., Murty, V.V.V.S., Bosl, G.J., and Chaganti, R.S.K. (1994). **Loss of Heterozygosity Identifies Multiple Sites of Allelic Deletions on Chromosome 1 in Human Male Germ Cell Tumors.** *Cancer Res.* 54, 6265–6269.

- Matson, D.R., and Stukenberg, P.T. (2011). **Spindle Poisons and Cell Fate: A Tale of Two Pathways.** *Mol. Interv.* 11, 141–150.
- Matsuda, J.L., Mallevaey, T., Scott-Browne, J., and Gapin, L. (2008). **CD1d-restricted iNKT cells, the “Swiss-Army knife” of the immune system.** *Curr. Opin. Immunol.* 20, 358–368.
- Matsumoto, Y., Hayashi, K., and Nishida, E. (1999). **Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells.** *Curr. Biol.* 2, 429–432.
- Matsusaka, T., and Pines, J. (2004). **Chfr acts with the p38 stress kinases to block entry to mitosis in mammalian cells.** *J. Cell Biol.* 166, 507–516.
- Matsuura, S., Matsumoto, Y., Morishima, K., Izumi, H., Matsumoto, H., Ito, E., Tsutsui, K., Kobayashi, J., Tauchi, H., Kajiwara, Y., et al. (2006). **Monoallelic BUB1B Mutations and Defective Mitotic-Spindle Checkpoint in Seven Families With Premature Chromatid Separation (PCS) Syndrome.** *Am. J. Med. Genet.* 367, 358–367.
- Matthaei, H., Schulick, R.D., Hruban, R.H., and Maitra, A. (2011). **Cystic precursors to invasive pancreatic cancer.** *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 8, 141–150.
- Mattison, C.P., Stumpff, J., Wordeman, L., and Winey, M. (2011). **Mip1 associates with both the Mps1 kinase and actin, and is required for cell cortex stability and anaphase spindle positioning.** *Cell Cycle* 10, 783–793.
- Mauviel, A. (2005). **Transforming growth factor- β : the Smad pathway and its implications in fibrosis.** *Methods Mol. Med.* 117, 69–80.
- Mayor, T., Hacker, U., Stierhof, Y.-D., and Nigg, E. a (2002). **The mechanism regulating the dissociation of the centrosomal protein C-Nap1 from mitotic spindle poles.** *J. Cell Sci.* 115, 3275–3284.
- McGrogan, B.T., Gilmartin, B., Carney, D.N., and McCann, A. (2008). **Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer.** *Biochim. Biophys. Acta* 1785, 96–132.
- Meijer, L. (2006). **Le cycle de division cellulaire et sa régulation.** *Bull. Cancer* 41–53.
- Meraldi, P., Lukas, J., Fry, a M., Bartek, J., and Nigg, E. a (1999). **Centrosome duplication in mammalian somatic cells requires E2F and Cdk2-cyclin A.** *Nat. Cell Biol.* 1, 88–93.
- Meroni, G., and Diez-Roux, G. (2005). **TRIM/RBCC, a novel class of “single protein RING finger” E3 ubiquitin ligases.** *BioEssays* 27, 1147–1157.
- Messerschmidt, D.M., de Vries, W., Ito, M., Solter, D., Ferguson-Smith, A., and Knowles, B.B. (2012). **Trim28 is required for epigenetic stability during mouse oocyte to embryo transition.** *Science* 335, 1499–1502.
- Meulmeester, E., and Ten Dijke, P. (2011). **The dynamic roles of TGF- β in cancer.** *J. Pathol.* 223, 205–218.
- Michael, D., and Oren, M. (2002). **The p53 and Mdm2 families in cancer.** *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 53–59.

- Michael, D., and Oren, M. (2003). **The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system.** *Semin. Cancer Biol.* 13, 49–58.
- Michel, L., Diaz-Rodriguez, E., Narayan, G., Hernando, E., Murty, V.V.V.S., and Benezra, R. (2004). **Complete loss of the tumor suppressor MAD2 causes premature cyclin B degradation and mitotic failure in human somatic cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4459–4464.
- Miranda, M.B., and Johnson, D.E. (2007). **Signal transduction pathways that contribute to myeloid differentiation.** *Leukemia* 21, 1363–1377.
- Miranda, J.J.L., King, D.S., and Harrison, S.C. (2007). **Protein arms in the kinetochore-microtubule interface of the yeast DASH complex.** *Mol. Biol. Cell.*
- Mironchik, Y., Winnard, P.T., Vesuna, F., Kato, Y., Wildes, F., Pathak, A.P., Kominsky, S., Artemov, D., Bhujwalla, Z., Van Diest, P., et al. (2005). **Twist overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer.** *Cancer Res.* 65, 10801–10809.
- Mitchell, E.L., and Santibanez-Koref, M.F. (1990). **1p13 is the most frequently involved band in structural chromosomal rearrangements in human breast cancer.** *Genes. Chromosomes Cancer* 2, 278–289.
- Mitra, J., and Enders, G. (2004). **Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells.** *Oncogene* 23, 3361–3367.
- Momand, J., Wu, H.H., and Dasgupta, G. (2000). **MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein.** *Gene* 242, 15–29.
- Monteiro, R., Pouget, C., and Patient, R. (2011). **The gata1/pu.1 lineage fate paradigm varies between blood populations and is modulated by tif1g.** *EMBO J.*
- Moosmann, P., and Georgiev, O. (1996). **Transcriptional repression by RING finger protein TIF1 β that interacts with the KRAB repressor domain of KOX1.** *Nucleic Acids Res.* 24, 4859–4867.
- Morsut, L., Yan, K.-P., Enzo, E., Aragona, M., Soligo, S.M., Wendling, O., Mark, M., Khetchoumian, K., Bressan, G., Chambon, P., et al. (2010). **Negative control of Smad activity by ectoderm/Tif1 γ patterns the mammalian embryo.** *Development* 137, 2571–2578.
- Moustakas, A., and Heldin, C.-H. (2005). **Non-Smad TGF-beta signals.** *J. Cell Sci.* 118, 3573–3584.
- Moustakas, A., and Heldin, C.-H. (2009). **The regulation of TGFbeta signal transduction.** *Development* 136, 3699–3714.
- Murakami, S., Noguchi, T., Takeda, K., and Ichijo, H. (2007). **Stress signaling in cancer.** *Cancer Sci.* 98, 1521–1527.
- Murray, A.W. (2004). **Recycling the cell cycle: cyclins revisited.** *Cell* 116, 221–234.

- Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). **The spindle-assembly checkpoint in space and time.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 379–393.
- Musio, A., Montagna, C., Zambroni, D., Indino, E., Barbieri, O., Citti, L., Villa, A., Ried, T., and Vezzoni, P. (2003). **Inhibition of BUB1 Results in Genomic Instability and Anchorage-independent Growth of Normal Human Fibroblasts.** *Cancer Res.* 2855–2863.
- Nadar, V.C., Lin, S., and Baas, P.W. (2012). **Microtubule redistribution in growth cones elicited by focal inactivation of kinesin-5.** *J. Neurosci.* 32, 5783–5794.
- Nagai, H., Negrini, M., Carter, S.L., Gillum, D.R., Rosenberg, A.L., Schwartz, G.F., and Croce, C.M. (1995). **Detection and Cloning of a Common Region of Loss of Heterozygosity at Chromosome 1p in Breast Cancer.** *Cancer Res.* 55, 1752–1757.
- Nakajima, H., Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., and Nishida, E. (2003). **Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate.** *J. Biol. Chem.* 278, 25277–25280.
- Nakayama, K.I., and Nakayama, K. (2006). **Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer.** *Nat. Rev. Cancer* 6, 369–381.
- Napolitano, L.M., and Meroni, G. (2012). **TRIM family: Pleiotropy and diversification through homomultimer and heteromultimer formation.** *IUBMB Life* 64, 64–71.
- Natrajan, R., Williams, R.D., Hing, S.N., Mackay, A., Reis-filho, J.S., Fenwick, K., Irvani, M., Valgeirsson, H., Grigoriadis, A., Langford, C.F., et al. (2006). **Array CGH profiling of favourable histology Wilms tumours reveals novel gains and losses associated with relapse.** *J. Pathol.* 210, 49–58.
- Natrajan, R., Williams, R.D., Grigoriadis, A., Mackay, A., Fenwick, K., Ashworth, A., Dome, J.S., Grundy, P.E., Pritchard-jones, K., and Jones, C. (2007). **Delineation of a 1Mb Breakpoint Region at 1p13 in Wilms Tumors by Fine-Tiling Oligonucleotide Array CGH.** *Genes. Chromosomes Cancer* 615, 607–615.
- Neurohr, G., Naegeli, A., Titos, I., Theler, D., Greber, B., Díez, J., Gabaldón, T., Mendoza, M., and Barral, Y. (2011). **A midzone-based ruler adjusts chromosome compaction to anaphase spindle length.** *Science* 332, 465–468.
- Ng, K.-C., Tan, A.-M., Chong, Y.-Y., Lau, L.-C., and Lou, J. (1999). **Congenital acute megakaryoblastic leukemia (M7) with chromosomal t(1;22)(p13;q13) translocation in a set of identical twins.** *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 21, 428–430.
- Nielsen, A.L., Ortiz, A., You, J., Oulad-abdelghani, M., Khechumian, R., Gansmuller, A., and Chambon, P. (1999). **Interaction with members of the heterochromatin protein 1 (HP1) family and histone deacetylation are differentially involved in transcriptional silencing by members of the TIF1 family.** *EMBO J.* 18, 6385–6395.
- Nigg, E.A. (2002). **CENTROSOME ABERRATIONS: CAUSE OR CONSEQUENCE OF CANCER PROGRESSION?.** *Nat. Rev. Cancer* 3, 815–815.

- O'Nions, J., and Allday, M.J. (2004). **Deregulation of the cell cycle by the Epstein-Barr virus.** *Adv. Cancer Res.* 92, 119–186.
- Oganesian, L., and Karlseder, J. (2009). **Telomeric armor: the layers of end protection.** *J. Cell Sci.* 122, 4013–4025.
- Ohshima, K., Haraoka, S., Yoshioka, S., Hamasaki, M., Fujiki, T., Suzumiya, J., Kawasaki, C., Kanda, M., and Kikuchi, M. (2000). **Mutation analysis of mitotic checkpoint genes (hBUB1 and hBUBR1) and microsatellite instability in adult T-cell leukemia/lymphoma.** *Cancer Lett.* 158, 141–150.
- Okamoto, K., Kitabayashi, I., and Taya, Y. (2006). **KAP1 dictates p53 response induced by chemotherapeutic agents via Mdm2 interaction.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 216–222.
- Okano-Uchida, T., Sekiai, T., Lee, K., Okumura, E., Tachibana, K., and Kishimoto, T. (1998). **In vivo regulation of cyclin A/Cdc2 and cyclin B/Cdc2 through meiotic and early cleavage cycles in starfish.** *Dev. Biol.* 197, 39–53.
- Olesen, S.H., Thykjaer, T., and Ørntoft, T.F. (2001). **Mitotic checkpoint genes hBUB1, hBUB1B, hBUB3 and TTK in human bladder cancer, screening for mutations and loss of heterozygosity.** *Carcinogenesis* 22, 813–815.
- Ono, T., Losada, A., Hirano, M., Myers, M.P., Neuwald, A.F., and Hirano, T. (2003). **Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells.** *Cell* 115, 109–121.
- Orphanet (2013). **La dermatomyosite.**
- Ortega, S., Malumbres, M., and Barbacid, M. (2002). **Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer.** *Biochim. Biophys. Acta* 1602, 73–87.
- Owens, R.B. (1974). **Glandular Epithelial Cells From Mice: A Method for Selective Cultivation.** *J. Natl. Cancer Inst.* 52, 1375–1378.
- Owens, R.B., Smith, H.S., and Hackett, A.J. (1974). **Epithelial cell cultures from normal glandular tissue of mice.** *J. Natl. Cancer Inst.* 53, 261–269.
- Padua, D., Zhang, X.H.-F., Wang, Q., Nadal, C., Gerald, W.L., Gomis, R.R., and Massagué, J. (2008). **TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4.** *Cell* 133, 66–77.
- Pan, S.-H., Tai, C.-C., Lin, C.-S., Hsu, W.-B., Chou, S.-F., Lai, C.-C., Chen, J.-Y., Tien, H.-F., Lee, F.-Y., and Wang, W.-B. (2009). **Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 disrupts mitotic checkpoint and causes chromosomal instability.** *Carcinogenesis* 30, 366–375.
- Panopoulos, A., Pacios-Bras, C., Choi, J., Yenjerla, M., Sussman, M. a, Fotedar, R., and Margolis, R.L. (2014). **Failure of cell cleavage induces senescence in tetraploid primary cells.** *Mol. Biol. Cell* 1–42.

Parada, L. a, Hallén, M., Tranberg, K.G., Hägerstrand, I., Bondeson, L., Mitelman, F., and Johansson, B. (1998). **Frequent rearrangements of chromosomes 1, 7, and 8 in primary liver cancer.** *Genes. Chromosomes Cancer* 23, 26–35.

Parada, L. a, Marañón, a, Hallén, M., Tranberg, K.G., Stenram, U., Bardi, G., and Johansson, B. (1999). **Cytogenetic analyses of secondary liver tumors reveal significant differences in genomic imbalances between primary and metastatic colon carcinomas.** *Clin. Exp. Metastasis* 17, 471–479.

Patel, D., and Mccance, D.J. (2010). **Compromised Spindle Assembly Checkpoint due to Altered Expression of Ubch10 and Cdc20 in Human Papillomavirus Type 16 E6- and E-7-Expressing Keratinocytes.** *J. Virol.* 84, 10956–10964.

Pei, L., and Melmed, S. (1997). **Isolation and characterization of a pituitary tumor-transforming gene (PTTG).** *Mol. Endocrinol.* 11, 433–441.

Peng, H., Begg, G.E., Schultz, D.C., Friedman, J.R., Jensen, D.E., Speicher, D.W., and Rauscher, F.J. (2000a). **Reconstitution of the KRAB-KAP-1 repressor complex: a model system for defining the molecular anatomy of RING-B box-coiled-coil domain-mediated protein-protein interactions.** *J. Mol. Biol.* 295, 1139–1162.

Peng, H., Begg, G.E., Harper, S.L., Friedman, J.R., Speicher, D.W., and Rauscher, F.J. (2000b). **Biochemical analysis of the Kruppel-associated box (KRAB) transcriptional repression domain.** *J. Biol. Chem.* 275, 18000–18010.

Peng, H., Feldman, I., and Rauscher, F.J. (2002). **Hetero-oligomerization among the TIF family of RBCC/TRIM domain-containing nuclear cofactors: a potential mechanism for regulating the switch between coactivation and corepression.** *J. Mol. Biol.* 320, 629–644.

Percy, M.J., Myrie, K. a, Neeley, C.K., Azim, J.N., Ethier, S.P., and Petty, E.M. (2000). **Expression and mutational analyses of the human MAD2L1 gene in breast cancer cells.** *Genes. Chromosomes Cancer* 29, 356–362.

Perera, D., Tilston, V., Hopwood, J. a, Barchi, M., Boot-Handford, R.P., and Taylor, S.S. (2007). **Bub1 maintains centromeric cohesion by activation of the spindle checkpoint.** *Dev. Cell* 13, 566–579.

Pérez de Castro, I., de Cárcer, G., and Malumbres, M. (2007). **A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy.** *Carcinogenesis* 28, 899–912.

Peters, J.-M. (2002). **The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond.** *Mol. Cell* 9, 931–943.

Peters, J.-M. (2006). **The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 644–656.

Pfeifer, G. (2012). **Protein phosphatase PP4: Role in dephosphorylation of KAP1 and DNA strand break repair.** *Cell Cycle* 2589–2593.

Pietenpol, J. a, and Stewart, Z. a (2002). **Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis.** *Toxicology* 181-182, 475–481.

Pines, J. (1995). **Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view.** *Biochem. J.* 308 (Pt 3, 697–711.

Pines, J. (1999). **Four-dimensional control of the cell cycle.** *Nat. Cell Biol.* 1, E73–E79.

Pinsky, B. a, and Biggins, S. (2005). **The spindle checkpoint: tension versus attachment.** *Trends Cell Biol.* 15, 486–493.

Pinson, L., Mannini, L., Willems, M., Cucco, F., Sirvent, N., Frebourg, T., Quarantotti, V., Collet, C., Schneider, A., Sarda, P., et al. (2014). **CEP57 mutation in a girl with mosaic variegated aneuploidy syndrome.** *Am. J. Med. Genet. A* 164A, 177–181.

Planas-Silva, M.D., and Weinberg, R. a (1997). **The restriction point and control of cell proliferation.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 768–772.

Plevin, M.J., Mills, M.M., and Ikura, M. (2005). **The LxxLL motif: a multifunctional binding sequence in transcriptional regulation.** *Trends Biochem. Sci.* 30, 63–66.

Poehlmann, A., and Roessner, A. (2010). **Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers.** *Pathol. Pract.* 206, 591–601.

Pollard, T.D., and Earnshaw, W.C. (2004). **Biologie cellulaire.**

Pommier, R.M., Gout, J., Vincent, D.F., Arfi, V., Alcaraz, L.B., Chuvin, N., Martel, S., Kaniewski, B., Devailly, G., Fourel, G., et al. **TIF1 γ -Deficiency Promotes Mitotic Chromosomal Instability and Tumor Progression.**

Pommier, R.M., Gout, J., Vincent, D.F., Cano, C.E., Kaniewski, B., Martel, S., Rodriguez, J., Fourel, G., Valcourt, U., Marie, J.C., et al. (2012). **The human NUPR1/P8 gene is transcriptionally activated by transforming growth factor β via the SMAD signalling pathway.** *Biochem. J.* 445, 285–293.

Pommier, Y., Hartwell, H., Nurse, P.M., Timothy, R., and Kohn, K.W. (2010). **Cycle cellulaire et points de contrôle en oncologie : nouvelles cibles thérapeutiques.** *Med. / Sci.* 19, 173–186.

Potapova, T. a, Daum, J.R., Pittman, B.D., Hudson, J.R., Jones, T.N., Satinover, D.L., Stukenberg, P.T., and Gorbsky, G.J. (2006). **The reversibility of mitotic exit in vertebrate cells.** *Nature* 440, 954–958.

Principe, D.R., Doll, J. a, Bauer, J., Jung, B., Munshi, H.G., Bartholin, L., Pasche, B., Lee, C., and Grippo, P.J. (2014). **TGF- β : Duality of function between tumor prevention and carcinogenesis.** *J. Natl. Cancer Inst.* 106, djt369.

Qian, J., Lesage, B., Beullens, M., Van Eynde, A., and Bollen, M. (2011). **PP1/Repo-man dephosphorylates mitotic histone H3 at T3 and regulates chromosomal aurora B targeting.** *Curr. Biol.* 21, 766–773.

Quenneville, S., Verde, G., Corsinotti, A., Kapopoulou, A., Jakobsson, J., Offner, S., Baglivo, I., Pedone, P. V., Grimaldi, G., Riccio, A., et al. (2011). **In embryonic stem cells, ZFP57/KAP1 recognize a methylated hexanucleotide to affect chromatin and DNA methylation of imprinting control regions.** *Mol. Cell* 44, 361–372.

Quéré, R., Saint-Paul, L., Carmignac, V., Martin, R.Z., Chrétien, M.-L., Largeot, A., Hammann, A., Pais de Barros, J.-P., Bastie, J.-N., and Delva, L. (2014). **Tif1 γ regulates the TGF- β 1 receptor and promotes physiological aging of hematopoietic stem cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 10592–10597.

Randrianarison-Huetz, V., Laurent, B., Bardet, V., Blobel, G.C., Huetz, F., and Duménil, D. (2010). **Gfi-1B controls human erythroid and megakaryocytic differentiation by regulating TGF- β signaling at the bipotent erythro-megakaryocytic progenitor stage.** *Blood* 115, 2784–2795.

Ransom, D.G., Bahary, N., Niss, K., Traver, D., Burns, C., Trede, N.S., Paffett-Lugassy, N., Saganic, W.J., Lim, C.A., Hersey, C., et al. (2004). **The zebrafish moonshine gene encodes transcriptional intermediary factor 1 γ , an essential regulator of hematopoiesis.** *PLoS Biol.* 2, E237.

Rao, P.H., Mathew, S., Kelsen, D.P., and Chaganti, R.S. (1995). **Cytogenetics of gastric and esophageal adenocarcinomas. 3q deletion as a possible primary chromosomal change.** *Cancer Genet. Cytogenet.* 81, 139–143.

Reed, S.I. (2003). **Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 855–864.

Reifenberger, J., Reifenberger, G., Liu, L., James, C.D., Wechsler, W., and Collins, V.P. (1994). **Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p.** *Am. J. Pathol.* 145, 1175–1190.

Reinhardt, H.C., and Schumacher, B. (2012). **The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer.** *Trends Genet.* 28, 128–136.

Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R. a, and Dynlacht, B.D. (2002). **E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints.** *Genes Dev.* 16, 245–256.

Reymond, A., Meroni, G., Fantozzi, A., Merla, G., Cairo, S., Luzi, L., Riganelli, D., Zanaria, E., Messali, S., Cainarca, S., et al. (2001). **The tripartite motif family identifies cell compartments.** *EMBO J.* 20.

Reynisdottir, I., Polyak, K., Iavarone, a, and Massague, J. (1995). **Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF- β .** *Genes Dev.* 9, 1831–1845.

Rhim, A.D., Mirek, E.T., Aiello, N.M., Maitra, A., Bailey, J.M., McAllister, F., Reichert, M., Beatty, G.L., Rustgi, A.K., Vonderheide, R.H., et al. (2012). **EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation.** *Cell* 148, 349–361.

Ricke, R.M., and Deursen, J.M. van (2012). **Correction of Microtubule-Kinetochores Attachment Errors: Mechanisms and Role in Tumor suppression.** *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 559–565.

Ricke, R.M., Jeganathan, K.B., and van Deursen, J.M. (2011). **Bub1 overexpression induces aneuploidy and tumor formation through Aurora B kinase hyperactivation.** *J. Cell Biol.* 193, 1049–1064.

Rieder, C.L., and Maiato, H. (2004). **Stuck in Division or Passing through: What Happens When Cells Cannot Satisfy the Spindle Assembly Checkpoint.** *Dev. Cell* 7, 637–651.

Rieder, C.L., Schultz, a, Cole, R., and Sluder, G. (1994). **Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle.** *J. Cell Biol.* 127, 1301–1310.

Rimkus, C., Friederichs, J., Rosenberg, R., Holzmann, B., Siewert, J.-R., and Janssen, K.-P. (2007). **Expression of the mitotic checkpoint gene MAD2L2 has prognostic significance in colon cancer.** *Int. J. Cancer* 120, 207–211.

Ripoche, D., Gout, J., Pommier, R.M., Jaafar, R., Zhang, C.X., Bartholin, L., and Bertolino, P. (2012). **Generation of a conditional mouse model to target Acvr1b disruption in adult tissues.** *Genesis* 8, 1–8.

Rogers, G.C., Rogers, S.L., Schwimmer, T. a, Ems-McClung, S.C., Walczak, C.E., Vale, R.D., Scholey, J.M., and Sharp, D.J. (2004). **Two mitotic kinesins cooperate to drive sister chromatid separation during anaphase.** *Nature* 427, 364–370.

Roschke, A. V, Glebov, O.K., Lababidi, S., Gehlhaus, K.S., Weinstein, J.N., and Kirsch, I.R. (2008). **Chromosomal Instability Is Associated with Higher Expression of Genes Implicated in Epithelial-Mesenchymal Transition , Cancer Invasiveness , and Metastasis and with Lower Expression of Genes Involved in Cell Cycle Checkpoints , DNA Repair , and Chromatin.** *Neoplasia* 10, 1222–1230, IN10–IN26.

Ross, S., and Hill, C.S. (2008). **How the Smads regulate transcription.** *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 383–408.

Rossio, V., Galati, E., and Piatti, S. (2010). **Adapt or die: how eukaryotic cells respond to prolonged activation of the spindle assembly checkpoint.** *Biochem. Soc. Trans.* 38, 1645–1649.

Ryan, D.P., Hong, T.S., and Bardeesy, N. (2014). **Pancreatic Adenocarcinoma.** *N. Engl. J. Med.* 371, 1039–1049.

Ryan, R.F., Schultz, D.C., Ayyanathan, K., Singh, P.B., Friedman, J.R., Fredericks, W.J., Rauscher, F.J., and Iii, F.J.R. (1999). **KAP-1 Corepressor Protein Interacts and Colocalizes with Heterochromatic and Euchromatic HP1 Proteins : a Potential Role for Krüppel-Associated Box – Zinc Finger Proteins in Heterochromatin-Mediated Gene Silencing KAP-1 Corepressor Protein Interacts and C.** *Mol. Cell. Biol.* 19, 4366–4378.

- Sakowicz, R., Finer, J., Beraud, C., and Crompton, A. (2004). **Antitumor activity of a kinesin inhibitor.** *Cancer Res.* 3276–3280.
- Salmela, A.-L., and Kallio, M.J. (2013). **Mitosis as an anti-cancer drug target.** *Chromosoma* 122, 431–449.
- Salzberg, A., Prokopenko, S., He, Y., Tsai, P., Pål, M., Maroy, P., Glover, D.M., Deak, P., and Bellen, H.J. (1997). **P-element insertion alleles of essential genes on the third chromosome of *Drosophila melanogaster*: mutations affecting embryonic PNS development.** *Genetics* 147.
- Sánchez-Capelo, A. (2005). **Dual role for TGF-beta1 in apoptosis.** *Cytokine Growth Factor Rev.* 16, 15–34.
- Sandgren, J., Diaz de Ståhl, T., Andersson, R., Menzel, U., Piotrowski, A., Nord, H., Bäckdahl, M., Kiss, N.B., Brauckhoff, M., Komorowski, J., et al. (2010). **Recurrent genomic alterations in benign and malignant pheochromocytomas and paragangliomas revealed by whole-genome array comparative genomic hybridization analysis.** *Endocr. Relat. Cancer* 17, 561–579.
- Santaguida, S., and Musacchio, A. (2009). **The life and miracles of kinetochores.** *EMBO J.* 28, 2511–2531.
- Sarg, B., Helliger, W., Talasz, H., Förg, B., and Lindner, H.H. (2006). **Histone H1 phosphorylation occurs site-specifically during interphase and mitosis: identification of a novel phosphorylation site on histone H1.** *J. Biol. Chem.* 281, 6573–6580.
- Satoh, M., Chan, J.Y.F., Ross, S.J., Li, Y., Yamasaki, Y., Yamada, H., Vazquez-del Mercado, M., Petri, M.H., Jara, L.J., Saavedra, M. a, et al. (2012). **Autoantibodies to transcription intermediary factor TIF1 β associated with dermatomyositis.** *Arthritis Res. Ther.* 14, R79.
- Saurin, A.T., van der Waal, M.S., Medema, R.H., Lens, S.M. a, and Kops, G.J.P.L. (2011). **Aurora B potentiates Mps1 activation to ensure rapid checkpoint establishment at the onset of mitosis.** *Nat. Commun.* 2, 316.
- Sawin, K.E., LeGuellec, K., Philippe, M., and Mitchison, T.J. (1992). **Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor.** *Nature* 359, 540–543.
- Sawyer, J.R., Thomas, E.L., Lukacs, J.L., Swanson, C.M., Ding, Y., Parham, D.M., Thomas, J.R., and Nicholas, R.W. (2002). **Recurring breakpoints of 1p13-p22 in osteochondroma.** *Cancer Genet. Cytogenet.* 138, 102–106.
- Schafer, K. a. (1998). **The Cell Cycle: A Review.** *Vet. Pathol.* 35, 461–478.
- Schatten, H. (2008). **The mammalian centrosome and its functional significance.** *Histochem. Cell Biol.* 129, 667–686.
- Schiel, J. a, and Prekeris, R. (2010). **Making the final cut - mechanisms mediating the abscission step of cytokinesis.** *ScientificWorldJournal.* 10, 1424–1434.

- Schliekelman, M., Cowley, D.O., O'Quinn, R., Oliver, T.G., Lu, L., Salmon, E.D., and Van Dyke, T. (2009). **Impaired Bub1 function in vivo compromises tension-dependent checkpoint function leading to aneuploidy and tumorigenesis.** *Cancer Res.* 69, 45–54.
- Schnütgen, F., Doerflinger, N., Calléja, C., Wendling, O., Chambon, P., and Ghyselinck, N.B. (2003). **A directional strategy for monitoring Cre-mediated recombination at the cellular level in the mouse.** *Nat. Biotechnol.* 21, 562–565.
- Schultz, D.C., Friedman, J.R., and Rauscher, F.J. (2001). **Targeting histone deacetylase complexes via KRAB-zinc finger proteins: the PHD and bromodomains of KAP-1 form a cooperative unit that recruits a novel isoform of the Mi-2alpha subunit of NuRD.** *Genes Dev.* 15, 428–443.
- Schultz, D.C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G.G., and Rauscher, F.J. (2002). **SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins.** *Genes Dev.* 16, 919–932.
- Schuster, N., and Kriegstein, K. (2002). **Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis.** *Cell Tissue Res.* 307, 1–14.
- Schvartzman, J.-M., Sotillo, R., and Benezra, R. (2010). **Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease.** *Nat. Rev. Cancer* 10, 102–115.
- Sears, R.C., and Nevins, J.R. (2002). **Signaling networks that link cell proliferation and cell fate.** *J. Biol. Chem.* 277, 11617–11620.
- Sedgwick, G.G., Townsend, K., Martin, a, Shimwell, N.J., Grand, R.J. a, Stewart, G.S., Nilsson, J., and Turnell, a S. (2012). **Transcriptional intermediary factor 1γ binds to the anaphase-promoting complex/cyclosome and promotes mitosis.** *Oncogene* 1–12.
- Segurado, M., and Tercero, J.A. (2009). **The S-phase checkpoint: targeting the replication fork.** *Biol. Cell* 101, 617–627.
- Serrano, A., Rodríguez-Corsino, M., and Losada, A. (2009). **Heterochromatin protein 1 (HP1) proteins do not drive pericentromeric cohesin enrichment in human cells.** *PLoS One* 4, e5118.
- Sharp, D.J., Rogers, G.C., and Scholey, J.M. (2000). **Cytoplasmic dynein is required for poleward chromosome movement during mitosis in Drosophila embryos.** *Nat. Cell Biol.* 2, 922–930.
- Shi, Y., and Massagué, J. (2003). **Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus.** *Cell* 113, 685–700.
- Shima, Y., Nakao, K., Nakashima, T., Kawakami, a, Nakata, K., Hamasaki, K., Kato, Y., Eguchi, K., and Ishii, N. (1999). **Activation of caspase-8 in transforming growth factor-beta-induced apoptosis of human hepatoma cells.** *Hepatology* 30, 1215–1222.
- Siegel, P.M., and Massagué, J. (2003). **Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer.** *Nat. Rev. Cancer* 3, 807–821.

Siegel, R.W., Jain, R., and Bradbury, a (2001). **Using an in vivo phagemid system to identify non-compatible loxP sequences.** *FEBS Lett.* 499, 147–153.

Silva, F.P., Hamamoto, R., Furukawa, Y., and Nakamura, Y. (2006). **TIPUH1 encodes a novel KRAB zinc-finger protein highly expressed in human hepatocellular carcinomas.** *Oncogene* 25, 5063–5070.

Smith, S.L., Bowers, N.L., Betticher, D.C., Gautschi, O., Ratschiller, D., Hoban, P.R., Booton, R., Santibáñez-Koref, M.F., and Heighway, J. (2005). **Overexpression of aurora B kinase (AURKB) in primary non-small cell lung carcinoma is frequent, generally driven from one allele, and correlates with the level of genetic instability.** *Br. J. Cancer* 93, 719–729.

Smoyer, C.J., and Jaspersen, S.L. (2014). **Breaking down the wall: the nuclear envelope during mitosis.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 26, 1–9.

Sotillo, R., Schvartzman, J.-M., Socci, N.D., and Benezra, R. (2010). **Mad2-induced chromosome instability leads to lung tumour relapse after oncogene withdrawal.** *Nature* 464, 436–440.

Sotillo, R.R.R.R., Hernando, E., Díaz-Rodríguez, E., Teruya-Feldstein, J., Cordón-Cardo, C., Lowe, S.W., Benezra, R., Diaz-Rodríguez, E., and Cordon-Cardo, C. (2007). **Mad2 Overexpression Promotes Aneuploidy and Tumorigenesis in Mice.** *Cancer Cell* 11, 9–23.

Stevaux, O., and Dyson, N.J. (2002). **A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 684–691.

Stracker, T.H., Carson, C.T., and Weitzman, M.D. (2002). **Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-NBS1 DNA repair complex.** *Nature* 418, 348–352.

Su, C., Deaton, R., Iglewsky, M., Valencia, T.G., and Grant, S.R. (2007). **PKN activation via transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) receptor signaling delays G2/M phase transition in vascular smooth muscle cells.** *Cell Cycle* 1, 739–749.

Sumara, I., Vorlaufer, E., Stukenberg, P.T., Kelm, O., Redemann, N., Nigg, E. a., and Peters, J.-M. (2002). **The Dissociation of Cohesin from Chromosomes in Prophase Is Regulated by Polo-like Kinase.** *Mol. Cell* 9, 515–525.

Tanaka, S., Arii, S., Yasen, M., Mogushi, K., Su, N.T., Zhao, C., Imoto, I., Eishi, Y., Inazawa, J., Miki, Y., et al. (2008). **Aurora kinase B is a predictive factor for the aggressive recurrence of hepatocellular carcinoma after curative hepatectomy.** *Br. J. Surg.* 95, 611–619.

Tanenbaum, M.E., and Medema, R.H. (2010). **Mechanisms of centrosome separation and bipolar spindle assembly.** *Dev. Cell* 19, 797–806.

Tanenbaum, M.E., Macûrek, L., Galjart, N., and Medema, R.H. (2008). **Dynein, Lis1 and CLIP-170 counteract Eg5-dependent centrosome separation during bipolar spindle assembly.** *EMBO J.* 27, 3235–3245.

Tao, W., South, V.J., Zhang, Y., Davide, J.P., Farrell, L., Kohl, N.E., Sepp-Lorenzino, L., and Lobell, R.B. (2005). **Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage.** *Cancer Cell* 8, 49–59.

Termén, S., Tan, E.-J., Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2013). **P53 Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition Induced By Transforming Growth Factor β .** *J. Cell. Physiol.* 228, 801–813.

Testa, J.R., and Siegfried, J.M. (1992). **Chromosome Abnormalities in Human Non-Small Cell Lung Cancer Chromosome Abnormalities in Human Non-Small Cell Lung Cancer.** *Cancer Res.* 52, 2702s – 2706s.

Teyssier, C., Ou, C., Khetchoumian, K., Losson, R., and Stallcup, M.R. (2006). **TIF1 α mediates physical interaction and functional synergy between the CARM1 and GRIP1 nuclear receptor coactivators.** *Mol. Endocrinol.* 20, 1276–1286.

Thomas, J.T., and Laimins, L. a (1998). **Human papillomavirus oncoproteins E6 and E7 independently abrogate the mitotic spindle checkpoint.** *J. Virol.* 72, 1131–1137.

Tian, M., Neil, J.R., and Schiemann, W.P. (2011). **Transforming growth factor- β and the hallmarks of cancer.** *Cell. Signal.* 23, 951–962.

Tighe, A., Staples, O., and Taylor, S. (2008). **Mps1 kinase activity restrains anaphase during an unperturbed mitosis and targets Mad2 to kinetochores.** *J. Cell Biol.* 181, 893–901.

Tipton, A.R., Ji, W., Sturt-Gillespie, B., Bekier, M.E., Wang, K., Taylor, W.R., and Liu, S.-T. (2013). **Monopolar spindle 1 (MPS1) kinase promotes production of closed MAD2 (C-MAD2) conformer and assembly of the mitotic checkpoint complex.** *J. Biol. Chem.* 288, 35149–35158.

Tisserand, J., Khetchoumian, K., Thibault, C., Dembélé, D., Chambon, P., and Losson, R. (2011). **Tripartite motif 24 (Trim24/Tif1 α) tumor suppressor protein is a novel negative regulator of interferon (IFN)/signal transducers and activators of transcription (STAT) signaling pathway acting through retinoic acid receptor α (Rar α) inhibition.** *J. Biol. Chem.* 286, 33369–33379.

Torok, M., and Etkin, L.D. (2001). **Two B or not two B? Overview of the rapidly expanding B-box family of proteins.** *Differentiation.* 67, 63–71.

Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., Shinya, N., Iwamatsu, A., and Nishida, E. (2001). **Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase.** *Nature* 410, 215–220.

Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., and Nishida, E. (2002). **Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase.** *EMBO Rep.* 3, 341–348.

Tram, E., Ibrahim-Zada, I., Briollais, L., Knight, J. a, Andrusis, I.L., and Ozcelik, H. (2011). **Identification of germline alterations of the mad homology 2 domain of SMAD3 and**

SMAD4 from the Ontario site of the breast cancer family registry (CFR). *Breast Cancer Res.* 13, R77.

Tsai, W.-W., Wang, Z., Yiu, T.T., Akdemir, K.C., Xia, W., Winter, S., Tsai, C., Shi, X., Schwarzer, D., Plunkett, W., et al. (2011). **TRIM24 links a noncanonical histone signature to breast cancer.** *Nature* 468, 927–932.

Uhlmann, F., and Nasmyth, K. (1998). **Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication.** *Curr. Biol.* 8, 1095–1101.

Urrutia, R. (2003). **Protein family review KRAB-containing zinc-finger repressor proteins.** *Genome Biol.* 4.

Vagnarelli, P. (2012). **Mitotic chromosome condensation in vertebrates.** *Exp. Cell Res.* 318, 1435–1441.

Vagnarelli, P., Ribeiro, S., Sennels, L., Sanchez-Pulido, L., de Lima Alves, F., Verheyen, T., Kelly, D. a, Ponting, C.P., Rappsilber, J., and Earnshaw, W.C. (2011). **Repo-Man coordinates chromosomal reorganization with nuclear envelope reassembly during mitotic exit.** *Dev. Cell* 21, 328–342.

Valastyan, S., and Weinberg, R.A. (2011). **Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms.** *Cell* 147, 275–292.

Valcourt, U., Kowanetz, M., Niimi, H., Heldin, C.-H., and Moustakas, A. (2005). **TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition.** *Mol. Biol. Cell* 16, 1987–2002.

Valcourt, U., Pommier, R.M., Vincent, D.F., and BARTHOLIN, L. (2014). **Culture primaire de cellules pancréatiques exocrines de souris: un outil indispensable pour la compréhension de l'étiologie de la pancréatite et de la carcinogénèse pancréatique.** In *Culture de Cellules Animales*.

Vas, A.C., and Clarke, D.J. (2008). **Aurora B kinases restrict chromosome decondensation to telophase of mitosis.** *Cell Cycle* 7, 293–296.

Venturini, L., You, J., Stadler, M., Galien, R., Lallemand, V., Koken, M.H., Mattei, M.G., Ganser, a, Chambon, P., Losson, R., et al. (1999). **TIF1gamma, a novel member of the transcriptional intermediary factor 1 family.** *Oncogene* 18, 1209–1217.

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., and Berneman, Z.N. (2003). **The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer.** *Cell Prolif.* 36, 131–149.

Vigneron, S., Prieto, S., Bernis, C., Labbe, J., Castro, A., and Lorca, T. (2004). **Kinetochore Localization of Spindle Checkpoint Proteins : Who Controls Whom ?.** *Mol. Biol. Cell* 15, 4584–4596.

Vincent, D.F., Yan, K.-P., Treilleux, I., Gay, F., Arfi, V., Kaniewsky, B., Marie, J.C., Lepinasse, F., Martel, S., Goddard-Leon, S., et al. (2009a). **Inactivation of TIF1gamma cooperates with Kras to induce cystic tumors of the pancreas.** *PLoS Genet.* 5, e1000575.

Vincent, D.F., Gout, J., Chuvin, N., Arfi, V., Pommier, R.M., Bertolino, P., Jonckheere, N., Ripoche, D., Kaniewski, B., Martel, S., et al. (2012). **Tify Suppresses Murine Pancreatic Tumoral Transformation by an Smad4-Independent Pathway.** *Am. J. Pathol.* 180, 2214–2221.

Vincent, T., Neve, E.P.A., Johnson, J.R., Kukalev, A., Rojo, F., Albanell, J., Pietras, K., Virtanen, I., Philipson, L., Leopold, P.L., et al. (2009b). **A SNAIL1–SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF- β mediated epithelial–mesenchymal transition.** *Nat. Cell Biol.* 11, 943–950.

Vink, E.I., Yondola, M. a, Wu, K., and Hearing, P. (2012). **Adenovirus E4-ORF3-dependent relocalization of TIF1 α and TIF1 γ relies on access to the Coiled-Coil motif.** *Virology* 422, 317–325.

Vitale, I., Galluzzi, L., Castedo, M., and Kroemer, G. (2011). **Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 385–392.

Vodermaier, H.C. (2004). **APC/C and SCF: controlling each other and the cell cycle.** *Curr. Biol.* 14, R787–R796.

Vogel, C., Kienitz, A., Hofmann, I., Müller, R., and Bastians, H. (2004). **Crosstalk of the mitotic spindle assembly checkpoint with p53 to prevent polyploidy.** *Oncogene* 23, 6845–6853.

Van der Waal, M.S., Hengeveld, R.C.C., van der Horst, A., and Lens, S.M. a (2012a). **Cell division control by the Chromosomal Passenger Complex.** *Exp. Cell Res.* 318, 1407–1420.

Van der Waal, M.S., Saurin, A.T., Vromans, M.J.M., Vleugel, M., Wurzenberger, C., Gerlich, D.W., Medema, R.H., Kops, G.J.P.L., and Lens, S.M. a (2012b). **Mps1 promotes rapid centromere accumulation of Aurora B.** *EMBO Rep.* 13, 847–854.

Wada, N., Yoshida, A., Miyagi, Y., Yamamoto, T., Nakayama, H., Suganuma, N., Matsuzu, K., Masudo, K., Hirakawa, S., Rino, Y., et al. (2008). **Overexpression of the mitotic spindle assembly checkpoint genes hBUB1, hBUBR1 and hMAD2 in thyroid carcinomas with aggressive nature.** *Anticancer Res.* 28, 139–144.

Waga, S., Hannon, G., Beach, D., and Stillman, B. (1994). **The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA.** *Nature* 369.

Wagenblast, J., Hambek, M., Baghi, M., Gstöttner, W., Strebhardt, K., Ackermann, H., and Knecht, R. (2008). **Antiproliferative activity of bortezomib alone and in combination with cisplatin or docetaxel in head and neck squamous cell carcinoma cell lines.** *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 134, 323–330.

Waizenegger, I., Giménez-Abián, J.F., Wernic, D., and Peters, J.-M. (2002). **Regulation of human separase by securin binding and autocleavage.** *Curr. Biol.* 12, 1368–1378.

Waizenegger, I.C., Hauf, S., Meinke, A., and Peters, J. (2000). **Cohesin from Chromosome Arms in Prophase and from Centromeres in Anaphase.** *Cell* 103, 399–410.

- Wakefield, L.M., and Roberts, A.B. (2002). **TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis.** *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 22–29.
- Walczak, C.E., and Heald, R. (2008). **Mechanisms of mitotic spindle assembly and function.** *Int. Rev. Cytol.* 265, 111–158.
- Wang, C., Ivanov, A., Chen, L., Fredericks, W.J., Seto, E., Rauscher, F.J., and Chen, J. (2005). **MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation.** *EMBO J.* 24, 3279–3290.
- Wang, C., Rauscher, F.J., Cress, W.D., and Chen, J. (2007). **Regulation of E2F1 function by the nuclear corepressor KAP1.** *J. Biol. Chem.* 282, 29902–29909.
- Wang, E., Ballister, E.R., and Lampson, M. a (2011). **Aurora B dynamics at centromeres create a diffusion-based phosphorylation gradient.** *J. Cell Biol.* 194, 539–549.
- Wang, L., Yin, F., Du, Y., Du, W., Chen, B., Zhang, Y., Wu, K., Ding, J., Liu, J., and Fan, D. (2009). **MAD2 as a key component of mitotic checkpoint: A probable prognostic factor for gastric cancer.** *Am. J. Clin. Pathol.* 131, 793–801.
- Wang, L., Lei, Z., Liu, X., Liu, R., and Zhang, H. (2013a). **Association of mutation and methylation in the promoter region of TIF1 γ with non-small cell lung cancer.** *Zhongguo Fei Ai Za Zhi* 16, 227–232.
- Wang, X., Jin, D.Y., Wong, Y.C., Cheung, a L., Chun, a C., Lo, a K., Liu, Y., and Tsao, S.W. (2000). **Correlation of defective mitotic checkpoint with aberrantly reduced expression of MAD2 protein in nasopharyngeal carcinoma cells.** *Carcinogenesis* 21, 2293–2297.
- Wang, X., Jin, D.D., Ng, R.W.M.R.R.W.M.R., Feng, H., Wong, Y.C., Cheung, A.L.M., and Tsao, S.W. (2002). **Significance of MAD2 Expression to Mitotic Checkpoint Control in Ovarian Cancer Cells.** *Cancer Res.* 1662–1668.
- Wang, Z., Wan, L., Zhong, J., Inuzuka, H., Liu, P., Sarkar, F.H., and Wei, W. (2013b). **Cdc20: a potential novel therapeutic target for cancer treatment.** *Curr. Pharm. Des.* 19, 3210–3214.
- Watrin, E., Schleiffer, A., Tanaka, K., Eisenhaber, F., Nasmyth, K., and Peters, J.-M. (2006). **Human Scc4 is required for cohesin binding to chromatin, sister-chromatid cohesion, and mitotic progression.** *Curr. Biol.* 16, 863–874.
- Weaver, B. a a, and Cleveland, D.W. (2005). **Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death.** *Cancer Cell* 8, 7–12.
- Weaver, B. a a, and Cleveland, D.W. (2007). **Aneuploidy: instigator and inhibitor of tumorigenesis.** *Cancer Res.* 67, 10103–10105.
- Wei, Y., Yu, L., Bowen, J., Gorovsky, M. a, and Allis, C.D. (1999). **Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation.** *Cell* 97, 99–109.

Welm, A.L. (2008). **TGFbeta primes breast tumor cells for metastasis.** *Cell* 133, 27–28.

White, D., Rafalska-Metcalf, I.U., Ivanov, A. V, Corsinotti, A., Peng, H., Lee, S.-C., Trono, D., Janicki, S.M., and Rauscher, F.J. (2012). **The ATM substrate KAP1 controls DNA repair in heterochromatin: regulation by HP1 proteins and serine 473/824 phosphorylation.** *Mol. Cancer Res.* 10, 401–414.

White, D.E., Negorev, D., Peng, H., Ivanov, A. V, Maul, G.G., and Rauscher, F.J. (2006). **KAP1, a novel substrate for PIKK family members, colocalizes with numerous damage response factors at DNA lesions.** *Cancer Res.* 66, 11594–11599.

Whitman, M. (2001). **Nodal signaling in early vertebrate embryos: themes and variations.** *Dev. Cell* 1, 605–617.

Wierinckx, A., Auger, C., Devauchelle, P., Reynaud, A., Chevallier, P., Jan, M., Perrin, G., Fèvre-Montange, M., Rey, C., Figarella-Branger, D., et al. (2007). **A diagnostic marker set for invasion, proliferation, and aggressiveness of prolactin pituitary tumors.** *Endocr. Relat. Cancer* 14, 887–900.

Wilkins, B.J., Rall, N. a, Ostwal, Y., Kruitwagen, T., Hiragami-Hamada, K., Winkler, M., Barral, Y., Fischle, W., and Neumann, H. (2014). **A cascade of histone modifications induces chromatin condensation in mitosis.** *Science* 343, 77–80.

Wilsker, D., Chung, J., and Bunz, F. (2012). **Chk1 suppresses bypass of mitosis and tetraploidization in p53-deficient cancer cells.** *Cell Cycle* 11, 1564–1572.

Wisotzkey, R.G., Quijano2, J.C., Stinchfield, M.J., and Newfeld, S.J. (2014). **New gene evolution in the Bonus-TIF1- γ /TRIM33 family impacted the architecture of the vertebrate dorsal-ventral patterning network.** *Mol. Biol. Evol.* 1–36.

Wojcik, E.J., Buckley, R.S., Richard, J., Liu, L., Huckaba, T.M., and Kim, S. (2013). **Kinesin-5: cross-bridging mechanism to targeted clinical therapy.** *Gene* 531, 133–149.

Woo, R. a, and Poon, R.Y.C. (2003). **Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells.** *Cell Cycle* 2, 316–324.

Wu, Y.Q. (1990). **Genetic etiology of esophageal cancer. V. Fragile sites on chromosome of cultured lymphocytes from members of high risk cancer families in Linxian County.** *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 12, 174–178.

Wu, M.Y., and Hill, C.S. (2009). **Tgf-beta superfamily signaling in embryonic development and homeostasis.** *Dev. Cell* 16, 329–343.

Wu, W.-J., Lee, C.-F., Hsin, C.-H., Du, J.-Y., Hsu, T.-C., Lin, T.-H., Yao, T.-Y., Huang, C.-H., and Lee, Y.-J. (2008). **TGF-beta inhibits prolactin-induced expression of beta-casein by a Smad3-dependent mechanism.** *J. Cell. Biochem.* 104, 1647–1659.

Xi, Q., Wang, Z., Zaromytidou, A.-I., Zhang, X.H.-F., Chow-Tsang, L.-F., Liu, J.X., Kim, H., Barlas, A., Manova-Todorova, K., Kaartinen, V., et al. (2011). **A poised chromatin platform for TGF- β access to master regulators.** *Cell* 147, 1511–1524.

- Xia, G., Luo, X., Habu, T., Rizo, J., Matsumoto, T., and Yu, H. (2004). **Conformation-specific binding of p31(comet) antagonizes the function of Mad2 in the spindle checkpoint.** *EMBO J.* 23, 3133–3143.
- Xiao, B., Freedman, B.S., Miller, K.E., Heald, R., and Marko, J.F. (2012). **Histone H1 compacts DNA under force and during chromatin assembly.** *Mol. Biol. Cell* 23, 4864–4871.
- Xie, H., Lee, M.-H., Zhu, F., Reddy, K., Peng, C., Li, Y., Lim, D.Y., Kim, D.J., Li, X., Kang, S., et al. (2013). **Identification of an Aurora kinase inhibitor specific for the Aurora B isoform.** *Cancer Res.* 73, 716–724.
- Xie, W., Mertens, J., Reiss, D., Rimm, D., Camp, R.L., Haffty, B.G., and Reiss, M. (2002). **Alterations of Smad Signaling in Human Breast Carcinoma Are Associated with Poor Outcome A Tissue Microarray Study.** *Cancer Res.* 62, 497–505.
- Xu, J. (2005). **Preparation, Culture, and Immortalization of Mouse Embryonic Fibroblasts.** *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 1–8.
- Xu, M., Sheppard, K.-A., Peng, C., Yee, A.S., and Piwnica-Worms, H. (1994). **Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation.** *Mol. Cell. Biol.* 14, 8420–8431.
- Xu, Q., Zhu, S., Wang, W., Zhang, X., Old, W., Ahn, N., and Liu, X. (2009). **Regulation of kinetochore recruitment of two essential mitotic spindle checkpoint proteins by Mps1 phosphorylation.** *Mol. Biol. Cell* 20, 10–20.
- Xue, J., Lin, X., Chiu, W., Chen, Y., Yu, G., Liu, M., Feng, X., Sawaya, R., Medema, R.H., Hung, M., et al. (2014). **Sustained activation of SMAD3 / SMAD4 by FOXM1 promotes TGF β -dependent cancer metastasis.** *J. Clin. Invest.* 124, 564–579.
- Yamashita, M., Fatyol, K., Jin, C., Wang, X., Liu, Z., and Zhang, Y.E. (2009). **TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF- β .** *Mol. Cell* 31, 918–924.
- Yan, K.-P., Dollé, P., Mark, M., Lerouge, T., Wendling, O., Chambon, P., and Losson, R. (2004). **Molecular cloning, genomic structure, and expression analysis of the mouse transcriptional intermediary factor 1 gamma gene.** *Gene* 334, 3–13.
- Yan, S., Zhou, C., Lou, X., Xiao, Z., Zhu, H., Wang, Q., Wang, Y., Lu, N., He, S., Zhan, Q., et al. (2009). **PTTG overexpression promotes lymph node metastasis in human esophageal squamous cell carcinoma.** *Cancer Res.* 69, 3283–3290.
- Yang, C., Tang, X., Guo, X., Niikura, Y., Kitagawa, K., Cui, K., Wong, S.T.C., Fu, L., and Xu, B. (2011). **Aurora-B mediated ATM serine 1403 phosphorylation is required for mitotic ATM activation and the spindle checkpoint.** *Mol. Cell* 44, 597–608.
- Yeap, L.-S., Hayashi, K., and Surani, M.A. (2009). **ERG-associated protein with SET domain (ESET)-Oct4 interaction regulates pluripotency and represses the trophectoderm lineage.** *Epigenetics Chromatin* 2, 12.

- Yilmaz, M., and Christofori, G. (2009). **EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion.** *Cancer Metastasis Rev.* 28, 15–33.
- Yokoe, T., Toiyama, Y., Okugawa, Y., Tanaka, K., Ohi, M., Inoue, Y., Mohri, Y., Miki, C., and Kusunoki, M. (2010). **KAP1 is associated with peritoneal carcinomatosis in gastric cancer.** *Ann. Surg. Oncol.* 17, 821–828.
- Young, R. a (2011). **Control of the embryonic stem cell state.** *Cell* 144, 940–954.
- Yuan, B., Xu, Y., Woo, J., Wang, Y., Bae, Y.K., Yoon, D., Wersto, R.P., Tully, E., Wilsbach, K., and Gabrielson, E. (2006). **Increased Expression of Mitotic Checkpoint Genes in Breast Cancer Cells with Chromosomal Instability.** *Clin. Cancer Res.* 12, 405–410.
- Yue, J., and Mulder, K.M. (2000). **Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway by transforming growth factor-beta.** *Methods Mol. Biol.* 142, 125–131.
- Zavadil, J., and Böttinger, E.P. (2005). **TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions.** *Oncogene* 24, 5764–5774.
- Zeng, X., Sigoillot, F., Gaur, S., Choi, S., Pfaff, K.L., Oh, D.-C., Hathaway, N., Dimova, N., Cuny, G.D., and King, R.W. (2010). **Pharmacologic inhibition of the anaphase-promoting complex induces a spindle checkpoint-dependent mitotic arrest in the absence of spindle damage.** *Cancer Cell* 18, 382–395.
- Zhang, Y.E. (2010). **Non-Smad pathways in TGF- β signaling Ying.** *Cell Res.* 19, 128–139.
- Zhang, N., Ge, G., Meyer, R., Sethi, S., Basu, D., Pradhan, S., Zhao, Y.-J., Li, X.-N., Cai, W.-W., El-Naggar, A.K., et al. (2008). **Overexpression of Separase induces aneuploidy and mammary tumorigenesis.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13033–13038.
- Zhivotovsky, B., and Kroemer, G. (2004). **Apoptosis and genomic instability.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 752–762.
- Zhong, S., Delva, L., Rachez, C., Cenciarelli, C., Gandini, D., Zhang, H., Kalantry, S., Freedman, L.P., and Pandolfi, P.P. (1999). **A RA-dependent , tumour-growth suppressive transcription complex is the target of the PML-RAR α and T18 oncoproteins.** *Nature* 23, 287–295.
- Zhu, S., Wang, W., Clarke, D.C., and Liu, X. (2007). **Activation of Mps1 promotes transforming growth factor-beta-independent Smad signaling.** *J. Biol. Chem.* 282, 18327–18338.
- Zhu, X., Mao, Z., Na, Y., Guo, Y., Wang, X., and Xin, D. (2006). **Significance of pituitary tumor transforming gene 1 (PTTG1) in prostate cancer.** *Anticancer Res.* 26, 1253–1259.
- Zindy, F., Williams, R.T., Baudino, T. a, Rehg, J.E., Skapek, S.X., Cleveland, J.L., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (2003). **Arf tumor suppressor promoter monitors latent oncogenic signals in vivo.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 15930–15935.

Ziv, Y., Bielopolski, D., Galanty, Y., Lukas, C., Taya, Y., Schultz, D.C., Lukas, J., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., and Shiloh, Y. (2006). **Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway.** *Nat. Cell Biol.* 8, 870–876.

Identification des fonctions oncosuppressives de TIF1 γ (*Transcriptional Intermediary Factor 1 γ*)

TIF1 γ est une protéine nucléaire de 1127 acides aminés possédant deux activités : une activité d'E3-ubiquitine ligase et des fonctions de régulateur transcriptionnel. TIF1 γ exerce majoritairement ses fonctions dans les processus de développement embryonnaire et de différenciation cellulaire, notamment via son implication dans la voie de signalisation du TGF β . Le rôle anti-tumoral de TIF1 γ a été mis en évidence dans plusieurs modèles murins et son expression est diminuée dans de nombreuses tumeurs humaines de diverses origines tissulaires. Néanmoins, les mécanismes moléculaires et cellulaires par lesquels TIF1 γ exerce ses fonctions oncosuppressives sont méconnus. Dans ces travaux, nous avons pu mettre en évidence le rôle inhibiteur de TIF1 γ sur la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT, Epithelial-to- Mesenchymal Transition) médiée par le TGF β *in vivo*, permettant ainsi de limiter les propriétés agressives des cellules tumorales. De plus, nous avons décrit l'implication de TIF1 γ dans la progression de la mitose et le point de contrôle du fuseau mitotique : les cellules n'exprimant plus TIF1 γ présentent de nombreuses anomalies nucléaires ainsi qu'une forte aneuploïdie associée à une résistance aux agents ciblant les microtubules, molécules classiquement utilisées en chimiothérapie. De plus, nous avons pu corrélérer la faible expression de TIF1 γ à une augmentation de l'instabilité chromosomique dans différentes tumeurs humaines. Ainsi, nos travaux ont permis de mettre en évidence le phénotype cellulaire induit par la perte de TIF1 γ dans les cellules tumorales : instabilité chromosomique, résistance aux traitements chimiothérapeutiques et acquisition de propriétés invasives.

Mots clés : TIF1 γ ; TRIM33 ; TGF β ; EMT ; mitose ; point de contrôle du fuseau mitotique ; instabilité chromosomique.

Identification of TIF1 γ oncosuppressive functions (*Transcriptional Intermediary Factor 1 γ*)

TIF1 γ / TRIM33 (Transcriptional Intermediary Factor 1 γ / TRIPartite Motif-containing 33) is a 1,127 amino acids nuclear protein with two biochemical activities: an E3-ubiquitin ligase activity and transcriptional regulatory functions. TIF1 γ is ubiquitously expressed in many organisms and exerts its functions mainly in the processes of embryonic development and cell differentiation, particularly through its involvement in the TGF β signaling pathway. The oncosuppressive functions of TIF1 γ have been demonstrated in several mouse models and its expression is reduced in many human tumors of various tissue origins. Nevertheless, the molecular and cellular mechanisms driving TIF1 γ anti-tumoral activities are unknown. In this work, we highlight its inhibitory role on TGF β -mediated EMT (Epithelial-to-Mesenchymal Transition) *in vivo*, thus limiting the aggressive properties of tumor cells. In addition, we describe TIF1 γ involvement in mitotic progression and the Spindle Assembly Checkpoint (SAC): TIF1 γ deleted cells display many nuclear abnormalities, aneuploidy and resistance to spindle microtubule-disrupting agents, which are drugs classically used in chemotherapeutic treatments. Finally, we correlated the low expression level of *TIF1 γ* to an increased rate of chromosomal instability in different human tumors. Thus, our work has highlighted the tumor suppressor role of TIF1 γ : its deletion in tumor cells induce chromosomal instability, resistance to chemotherapeutic treatments and acquisition of invasive properties.

Keywords: TIF1 γ ; TRIM33; TGF β ; EMT; mitosis; Spindle Assembly Checkpoint; chromosomal instability.
