



**HAL**  
open science

# Etude des complexes entre TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein) et ses partenaires

Stéphanie Thébault

► **To cite this version:**

Stéphanie Thébault. Etude des complexes entre TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein) et ses partenaires. Cancer. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T024 . tel-03091983

**HAL Id: tel-03091983**

**<https://theses.hal.science/tel-03091983>**

Submitted on 1 Jan 2021

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

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

**UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11**

Ecole doctorale de Cancérologie : Biologie, Médecine, Santé

## **Thèse**

Présentée pour l'obtention du grade de :

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11**

Spécialité : Cancérologie

Par

**Stéphanie THEBAULT**

### **ETUDE STRUCTURALE DES COMPLEXES ENTRE TCTP (TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOR PROTEIN) ET SES PARTENAIRES ANTI-APOPTOTIQUES BCL-XL OU MCL-1**

Soutenue le 4 juin 2013 devant la commission d'examen :

Dr. Françoise OCHSENBEIN

Dr. Marc RUFF

Dr. Aimé VAZQUEZ

Dr. Robert AMSON

Pr. Jean CAVARELLI

Pr. Adam TELERMAN

Rapporteur Externe

Rapporteur Externe

Examineur

Examineur

Co-directeur de Thèse

Directeur de Thèse

Thèse préparée au sein du Laboratoire de Biologie et de Pharmacologie appliquée (LBPA, ENS Cachan) et au sein du Département de Biologie Structurale de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC, Illkirch).



# Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier l'école doctorale de cancérologie de m'avoir attribué la bourse ministérielle, sans laquelle je n'aurais pas pu réaliser une thèse dans le domaine que je souhaitais. Je voudrais également remercier l'Association de Recherche contre le Cancer (l'ARC) de m'avoir financé six mois supplémentaires (bourse n°DOC20120604839) afin de terminer mes travaux.

Je tiens à remercier les membres du jury de thèse: Dr. Françoise Ochsenbein chercheuse au CEA, Dr. Marc Ruff chercheur au sein de l'IGBMC ainsi que Dr. Aimé Vazquez chercheur à l'UMRS 1014, de me faire l'honneur de juger mon travail.

Je veux remercier le Pr. Adam Telerman ainsi que le Dr. Robert Amson de m'avoir accueillie dans leur équipe, me donnant ainsi l'opportunité de travailler sur la protéine clef de la réversion tumorale : TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein).

Je veux dire Merci à l'équipe du Pr. Jean Cavarelli de m'avoir accueillie et formée. Je tenais à remercier le Dr. Christophe Romier de m'avoir appris le clonage, le Dr. Nathalie Troffer-Charlier de m'avoir montré les méthodes de purification et le Dr. Vincent Cura de m'avoir expliqué la cristallographie et le SAXS.

Merci à la plateforme de biologie structurale et tout particulièrement au Dr. Catherine Birck pour les études en ultracentrifugation analytique et en ITC, à Pierre Poussin et au Dr. Alastair Mac Ewen pour les études en cristallographie et au Dr. Isabelle Billas pour les expériences réalisées en SEC-MALS. Merci également à la plateforme de spectrométrie de masse et notamment à Adeline Page et à Franck Ruffenach.

Je tiens à remercier nos collaborateurs, le Pr. Bruno Kieffer (IGBMC) pour les études en RMN, le Dr. Sarah Cianferani et Johann Stojko de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien pour les analyses en spectrométrie de masse en condition native.

Un grand merci à Morgane Agez pour nos travaux communs et nos discussions enrichissantes sur le sujet de thèse qui m'ont donné matière à réfléchir. Merci pour les plusieurs relectures du manuscrit.

Merci à tous les étudiants qui ont contribué à ce qu'il règne une bonne ambiance au sein du laboratoire : Justine, Emeline, Marie-Laure, Pierre, Marie-Annick, Luc, Martin et Morgane.

Merci à Justine, Marie-Laure, Emeline et Morgane pour les gâteaux, vous avez touché mon point sensible !

Merci à tous les gens de l'institut avec lesquels j'ai passé de bons moments : Emiko, Denise, Anna, Heena, Benjamin, Maria, Morgan, Laura, Grigory, Firas et Iskander pour le foot et tant

d'autres. Un grand Merci aux membres du SPB, et au directeur Ismail, pour les animations proposées !!!

Un grand Merci à mon copain Jonathan (alias Shipmunk) pour m'avoir soutenue et écoutée tant d'heures au téléphone parler de biologie, un domaine qui lui est étranger mais maintenant qui l'est un peu moins.

Un grand Merci à ma famille mais surtout à mon Daddy qui m'a beaucoup soutenue et encouragée tout au long de ma thèse. Merci pour tes encouragements réguliers !! Evidemment une forte pensée pour ma mère qui m'a inspirée pour réaliser cette thèse.

Je tenais à remercier mes amis mais tout particulièrement Florence pour son aide au cours de la rédaction et Sophie pour nos conversations sur Skype.

Enfin, je voudrais remercier toutes les personnes de près ou de loin qui m'ont aidée au cours de cette thèse.

# Table des matières

---

<b>Remerciements</b> .....	<b>3</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>5</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>9</b>
<b>I. Introduction</b> .....	<b>13</b>
I.1. Mécanismes de l'apoptose .....	13
I.1.1. Les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose.....	13
I.1.2. Rôle des Bcl-2 dans la régulation de l'apoptose .....	16
I.1.3. Partenaires non canoniques de la famille des Bcl-2 .....	23
I.1.4. Médicaments ciblant la famille des Bcl-2.....	24
I.2. Mcl-1 et Bcl-xl, deux protéines clefs de l'apoptose.....	26
I.2.1. Description de Mcl-1 .....	26
I.2.2. Description de Bcl-xl.....	30
I.2.3. Comparaison structurale entre Mcl-1 et Bcl-xl.....	35
I.3. Régulation de l'apoptose par TCTP .....	36
I.3.1. Présentation de TCTP .....	36
I.3.2. L'action anti-apoptotique de TCTP .....	42
<b>II. Matériel et Méthode</b> .....	<b>49</b>
II.1. Génération des vecteurs d'expression .....	49
II.1.1. Clonage par restriction/ligation.....	49
II.1.2. Clonage par recombinaison homologue .....	53
II.1.3. Tableau des constructions élaborées.....	54
II.2. Expression des protéines .....	54
II.2.1. Dans les bactéries .....	54

II.2.2.	Dans les cellules d'insectes.....	56
II.3.	Minitests d'expression.....	57
II.3.1.	Réalisation des tests d'expression dans la bactérie.....	58
II.3.2.	Interprétation des résultats.....	59
II.4.	Production à grand volume dans les bactéries .....	61
II.4.1.	Transformation .....	61
II.4.2.	Préculture .....	62
II.4.3.	Culture.....	62
II.4.4.	Milieux.....	62
II.5.	Purification des protéines.....	63
II.5.1.	Lyse cellulaire.....	63
II.5.2.	Billes/Colonne d'affinité.....	63
II.5.3.	La chromatographie d'exclusion.....	64
II.5.4.	Echangeuse d'ions.....	65
II.6.	Caractérisation physico-chimique des protéines et complexes protéiques .....	65
II.6.1.	Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide .....	65
II.6.2.	Dosage des protéines .....	67
II.6.3.	« Dynamic Light Scattering » (DLS) .....	68
II.6.4.	« Thermal Shift Assay » .....	70
II.6.5.	« Isothermal Titration Calorimetry » (ITC) .....	72
II.6.6.	Spectrométrie de masse.....	74
II.6.7.	« Size Exclusion Chromatography » SEC-MALS.....	76
II.6.8.	Ultracentrifugation Analytique (UAC) .....	77
II.7.	Etude structurale en cristallographie et en RMN.....	79
II.7.1.	Principe de la cristallographie aux rayons X.....	79
II.7.2.	Cristallisation des macromolécules biologiques.....	82

II.7.3.	Principe de la RMN.....	85
<b>III.</b>	<b>Isolation du complexe TCTP/Bcl-xl.....</b>	<b>89</b>
III.1.	Etude en co-expression du complexe TCTP/Bcl-xL.....	89
III.1.1.	Minitests de co-expression.....	89
III.1.2.	Expression à grande échelle .....	95
III.2.	Etude en co-purification du complexe TCTP/Bcl-xl .....	104
III.2.1.	Mise en évidence de l'interaction entre TCTP et les différentes constructions de Bcl-xl .....	105
III.2.2.	Extraction des complexes sur colonne d'exclusion.....	108
<b>IV.</b>	<b>Isolation du complexe TCTP/Mcl-1 .....</b>	<b>113</b>
IV.1.	Etude en co-expression du complexe TCTP/Mcl-1.....	113
IV.1.1.	Minitests de co-expression.....	113
IV.1.2.	Expression à grande échelle .....	120
IV.2.	Eude en co-purification du complexe TCTP/Mcl-1.....	121
IV.2.1.	Production à grande échelle de CMcl-1 .....	121
IV.2.2.	Mise en évidence du complexe TCTP/CMcl-1 .....	125
IV.2.3.	Extraction du complexe TCTP/CMcl-1 sur colonne d'exclusion .....	126
<b>V.</b>	<b>Caractérisation des complexes.....</b>	<b>129</b>
V.1.	Caractérisation biochimique .....	129
V.1.1.	Influence de la température.....	129
V.1.2.	Influence du pH et du sel.....	132
V.1.3.	Etudes structurales en RMN et en Cristallographie.....	135
V.2.	Caractérisation biophysique .....	141
V.2.1.	Etude des complexes avec TCTP et les différentes formes de Bcl-xl .....	141
V.2.2.	Etude du complexe TCTP/CMcl-1 .....	146
V.3.	Détermination des zones d'interactions.....	152
V.3.1.	Etude de TCTP $\Delta$ loop.....	153

V.3.2.	Etude du mutant R21A de TCTP, TCTP(R21A).....	154
V.3.3.	Etude du mutant Y101K de Bcl-xlΔ27-81ΔTM .....	157
V.3.4.	Etude de compétition avec l'inhibiteur ABT-737 .....	158
V.3.5.	Etude de la partie N terminale de TCTP .....	160
V.3.6.	Alignement de séquences entre TCTP, Bim et Puma .....	162
V.3.7.	Etude de compétition entre TCTP+CMcl-1+ Bcl-xlΔ27-81ΔTM.....	164
V.4.	Différences d'interactions entre les deux partenaires .....	165
<b>VI.</b>	<b>Conclusion générale et Perspectives .....</b>	<b>167</b>
<b>VII.</b>	<b>Annexe.....</b>	<b>175</b>
<b>VIII.</b>	<b>Liste des figures .....</b>	<b>189</b>

# Abréviations

---

A1	:	Bcl-2-related gene A1
APAF-1	:	Apoptotic Protease Activating Factor-1
ARN	:	Acide Ribonucléique
ATP	:	Adenosine Triphosphate
Bad	:	Bcl-2 antagonist of cell death
Bax	:	Bcl-2-associated x protein
Bak	:	Bcl-2 antagonist killer 1
Bcl-2	:	B cell lymphoma 2
Bcl-xl	:	Bcl-2 related gene long isoform
Bcl-w	:	Bcl-2-like protein 2
BH	:	Bcl-2 Homology
Bid	:	Bcl-2-interacting domain death agonist
Bik	:	Bcl-2-interacting killer
Bim	:	Bcl-2-interacting mediator of cell death
Bmf	:	Bcl-2 modifying factor
Bok	:	Bcl-2 related ovarian killer
CASPASE	:	Cystein ASPartate-specific proteASE
C-terminal	:	Carboxy-terminal
CDK-1	:	Cyclin dependent kinase 1
CHES	:	<i>N</i> -Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid
DLS	:	Dynamic Light Scattering
DO	:	Densité Optique
DTT	:	Dithiothreitol
ET	:	Extrait Total
ES	:	Extrait Soluble
FL	:	Full Length
FT	:	Flow Thought
GSK-3	:	Glycogen Synthase Kinase-3
GST	:	Glutathion-S-Transferase
Hrk	:	Harakiri
HUWE	:	HECT, UBA and WWE Domain-Containing Protein 1
IAPS	:	Inhibitors of Apoptosis
ICAD	:	Inhibitor ofCaspase-Activated DNase
IGBMC	:	Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire
IP <sub>3</sub> R	:	1,4,5-Triphosphate Receptor
IPTG	:	IsoPropyl- D-ThioGalactoside
ITC	:	Isothermal Titration Calorimetry
LB	:	Lysogeny Broth
LBPA	:	Laboratoire de Biologie et Pharmacologie Appliquée
MALDI-TOF	:	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry
MBP	:	Maltose Binding Protein
Mcl-1	:	Myeloid cell leukemia 1
MOM	:	Mitochondrial Outer Membrane
MOM	:	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
Mule	:	Mcl-1 Ubiquitin Ligase E3
N-terminal	:	Amino-terminale

Noxa	:	Noxious
NP-40	:	Nonylphenoxypolyethoxyethanol
P3C	:	Prescission
Pb	:	Paires de bases
PCNA	:	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
PDB	:	Protein Data Bank
PEG	:	PolyEthylène Glycol
PEST domain	:	Proline, Glutamate, Serine, Threonine domain
PIC	:	Proteases Inhibitor Cocktail
PMSF	:	Phenylmethanesulfonylfluoride
RTN 1 ou 4	:	Reticulon 1 ou 4
RE	:	Reticulum endoplasmique
RMN	:	Résonance magnétique nucléaire
RPM	:	Rotation par minute
SAXS	:	Small Angle X-Ray Scattering
SCF	:	Skp1-Cullin-F-box
SDS	:	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	:	Sodium Dodecyl Sulfate - Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
SEC-MALS	:	Size Exclusion Chromatography-Multi Angle Light Scattering
siRNA	:	RNA Silencing
TCEP	:	Tris(2-CarboxyEthyl) Phosphine
TCTP	:	Translationally Controlled Tumor Protein
Temed	:	Tetramethylethylenediamine
Tev	:	Tobacco etch virus
TFB	:	Terrific Broth
TIM	:	Transporter Inner Membrane
TNF	:	Tumor necrosis factor
TOM	:	Transporter Outer Membrane
B-Trcp	:	F-box/WD repeat-containing protein 1A
Tris	:	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TritonX-100	:	Octyl Phenol Ethoxylate
TRX	:	Thioredoxine
UAC	:	Ultracentrifugation analytique
Usp34	:	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34
W	:	Wash

# Préambule

---

L'équipe d'Adam Telerman du LBPA (Laboratoire de Biologie et de Pharmacologie Appliquée) s'intéresse au processus biologique, dit de « réversion tumorale », au cours duquel une cellule cancéreuse perd son phénotype malin et devient révertante. L'équipe s'attache en particulier à élucider les mécanismes moléculaires de la reprogrammation des cellules tumorales en cellules révertantes (Amson et al., 2013a; Amson et al., 2013b; Amson et al., 1996; Nemani et al., 1996; Roperch et al., 1998; Susini et al., 2008; Telerman and Amson, 2009; Telerman et al., 1993; Tuynder et al., 2004; Tuynder et al., 2002).

Pour cela, l'équipe d'Adam Telerman, a mis en place des lignées de cellules révertantes à partir de plusieurs types de lignées cancéreuses. L'analyse différentielle de l'expression des gènes entre les cellules tumorales parentales et les cellules révertantes a permis d'identifier 300 gènes impliqués dans la réversion tumorale (analyse via quantification de l'ARN messenger). Le plus grand écart d'expression a été relevé pour le gène de TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein) dont l'expression est fortement réduite dans les cellules révertantes (Tuynder et al., 2002). Dans plusieurs lignées cancéreuses, une atténuation de l'expression de TCTP dans les cellules tumorales engendre leur transformation en cellules révertantes. Ces expériences soulignent que TCTP est un élément clef de la réversion tumorale et qui donc représente une cible thérapeutique cruciale.

TCTP est une protéine ubiquitaire, hautement conservée au cours de la phylogénie et multifonctionnelle qui interagit avec divers partenaires impliqués dans des mécanismes tels que la réparation de l'ADN, la biogenèse des protéines, la machinerie mitotique, la voie mTOR, l'axe p53-MDM2-NUMB et la machinerie apoptotique (Amson et al., 2013b). Cependant, aucun complexe avec TCTP n'a été caractérisé à ce jour.

Une partie du potentiel de reprogrammation de TCTP repose sur sa capacité à fonctionner comme un facteur de survie. En effet, d'une part, TCTP favorise la dégradation de p53, un suppresseur de tumeur, et d'autre part cette protéine augmente le potentiel anti-apoptotique de Mcl-1 et de Bcl-xL, deux protéines de la famille des Bcl-2.

Mon travail de thèse a consisté à élucider, au niveau moléculaire, le rôle de TCTP dans l'apoptose, en étudiant les complexes TCTP/Bcl-xl et TCTP/Mcl-1. Peu de publications existent au sujet de ces interactions et aucune ne les décrit précisément à l'échelle atomique. Ainsi, la compréhension des interactions entre TCTP et ses deux partenaires Mcl-1 et Bcl-xl apporterait un

nouvel éclairage sur sa fonction dans l'apoptose et peut-être de manière plus générale, sur son rôle dans la cellule.

Pour mener à bien ce projet qui aborde la caractérisation biophysique et structurale des interactions de TCTP avec deux de ses partenaires, nous avons établi une collaboration avec l'équipe de Jean Cavarelli du département de biologie structurale et intégrative de l'IGBMC (Institut de Génomique et de biologie Moléculaire et Cellulaire). Ainsi, nous avons bénéficié d'un ensemble de techniques biophysiques (ultracentrifugation analytique, SEC-MALS) et structurales (Cristallographie, RMN) nécessaire à la réalisation de ce travail de thèse. Nous avons également initié une étroite collaboration avec l'équipe de Sarah Cianferani au sein de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien dans le but de réaliser des expériences en spectrométrie de masse en condition native.

Le premier chapitre décrit les mécanismes de l'apoptose et plus précisément l'activité anti-apoptotique de Mcl-1, Bcl-xl et TCTP. Tout d'abord, les deux voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose ainsi que le rôle de la famille des Bcl-2 dans la perméabilisation de la mitochondrie sont explicités. Ensuite, nous présentons en détail l'implication dans l'apoptose de Mcl-1 et Bcl-xl, deux protéines de la famille des Bcl-2. Enfin, nous décrivons les différents mécanismes cellulaires dans lesquels est impliquée TCTP et plus précisément son activité anti-apoptotique et son interaction avec Mcl-1 et Bcl-xl.

Le deuxième chapitre montre les méthodes et techniques utilisées pour exprimer, produire et purifier les protéines ainsi que les outils biophysiques qui ont permis de caractériser les complexes. En effet, le clonage, les minitestes d'expressions, les cultures à grande échelle ainsi que la purification sur différents types de colonnes sont des étapes nécessaires à l'isolation des complexes.

Les troisième et quatrième chapitres expliquent les étapes d'optimisation en co-expression et en co-purification qui ont abouti à la détermination des conditions de formation des complexes et à leur isolation. Le troisième chapitre traite plus particulièrement des complexes entre TCTP et les différentes constructions de Bcl-xl tandis que le quatrième chapitre porte sur le complexe entre TCTP et une construction de Mcl-1.

Le cinquième chapitre est dédié à la caractérisation biochimique, biophysique et structurale des complexes obtenus. Nous avons étudié l'influence de plusieurs facteurs comme le pH, la température, la concentration en NaCl sur la formation et la stabilité des complexes. La stœchiométrie des différents partenaires et les zones de reconnaissance ont été déterminées par plusieurs techniques biophysiques sur les protéines natives et les mutants. Le résumé de l'ensemble des résultats et les perspectives à suivre sont décrits dans le dernier chapitre.

# I. Introduction

---

## I.1. Mécanismes de l'apoptose

L'apoptose est un processus par lequel les cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à un signal. Ce processus physiologique hautement régulé joue un rôle vital dans l'homéostasie des tissus, l'élimination de cellules infectées et endommagées, et la morphogenèse au cours du développement de l'embryon. Deux voies principales d'activation de l'apoptose sont actuellement identifiées : la voie intrinsèque via la mitochondrie et la voie extrinsèque faisant appel aux récepteurs à domaines de mort (Fas, TNF).

### I.1.1. Les voies intrinsèque et extrinsèque de l'apoptose

Nous allons décrire dans les paragraphes suivant les deux voies intrinsèque et extrinsèque qui déclenchent l'apoptose dans les cellules.

#### I.1.1.1. La voie intrinsèque via la mitochondrie

La voie intrinsèque est activée lorsque la cellule détecte des problèmes internes, tels que des dommages de l'ADN, de l'anoxie ou un déséquilibre des régulateurs de croissance. Cette réponse fait généralement appel au facteur de transcription p53, qui permet l'expression des protéines impliquées dans cette voie telles que les protéines de la famille des Bcl-2. Suite à un signal apoptotique, la membrane externe de la mitochondrie va se perméabiliser et libérer dans le cytosol le cytochrome C responsable de la cascade réactionnelle provoquant l'apoptose. Les séries de mécanismes déclenchées au cours de la voie intrinsèque sont résumées dans la figure 1 ci-dessous et vont être décrites plus en détail dans le paragraphe suivant.

Dans la figure 1, le signal « pro-apoptotique » est schématisé par des flèches rouges tandis que le signal « anti-apoptotique » est en vert. En réponse au signal « pro-apoptotique », la membrane externe de la mitochondrie va être perforée à l'aide des protéines de la famille des Bcl-2 (voir partie I.1.2), ce qui va libérer dans le cytosol deux types de protéines : le cytochrome C et une protéine nommée Smac/DIABLO (voir figure 1). La perméabilisation de la membrane extérieure de la mitochondrie (MOMP) est considérée comme un point de non retour de l'apoptose.

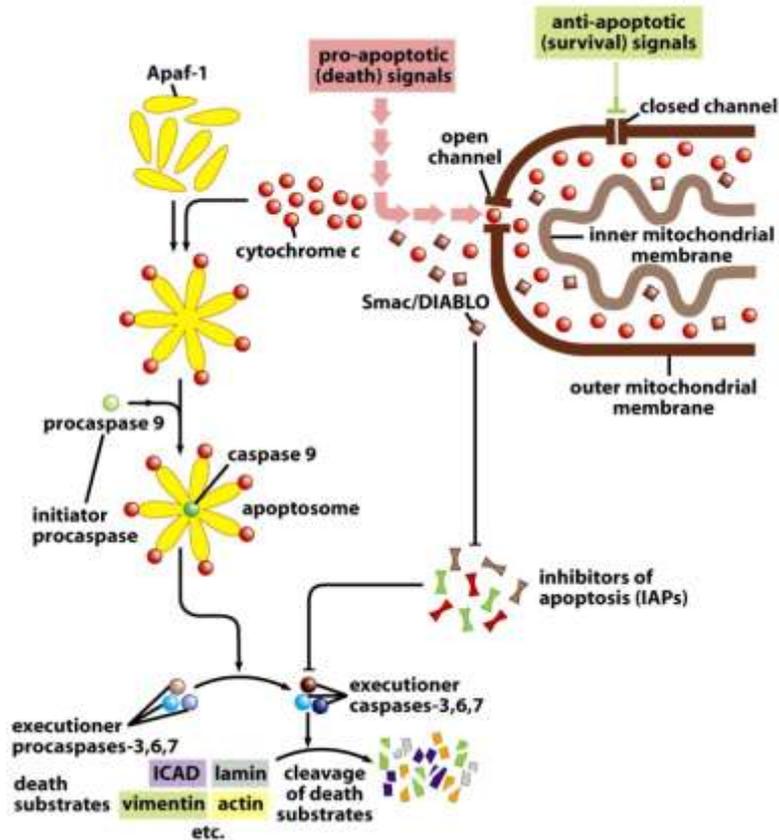


Figure 1 : Schéma des mécanismes de la voie intrinsèque (D'après la figure 9-29, The Biology of Cancer, Garland Science 2007).

D'un côté, le cytochrome C va s'associer à une protéine adaptatrice Apaf-1 pour former un complexe nommé l'apoptosome qui s'apparente à une roue à sept rayons. Chaque rayon est formé d'une protéine d'Apaf-1 (en jaune) et d'un cytochrome C (en rouge). Ensuite, l'enzyme de clivage pro-caspase 9, schématisée en rond vert sur la figure 1, va venir se loger au niveau du dôme de l'apoptosome pour être activée et cliver d'autres pro-caspases qui vont être à l'origine du démantèlement de la cellule (Acehan et al., 2002; Riedl et al., 2005).

De l'autre côté, la protéine Smac/DIABLO, schématisée en carré marron sur la figure 1, va désactiver la famille anti-apoptotique des IAPS (Inhibitors of apoptosis) qui inhibent l'action des caspases dans les cellules saines. La famille des IAPS agissent soit en se liant directement aux caspases pour bloquer leur activité protéolytique, soit en favorisant l'ubiquitination des caspases et ainsi leur dégradation (Salvesen and Duckett, 2002). Sans l'intervention continue des IAPS, les caspases sont libres d'initier les clivages en chaîne conduisant à la mort cellulaire.

Les caspases sont des protéines clés de l'apoptose car elles sont responsables du démantèlement de la cellule. Elles sont minutieusement régulées par les facteurs de transcription E2F1 et E2F, qui sont susceptibles d'accroître de cinq à quinze fois la transcription de leurs gènes.

Cette amplification en tant que telle n'engendre pas d'apoptose mais sensibilise la cellule à des stimuli pro-apoptotiques. Les caspases sont composées de deux sous-familles, les initiatrices qui sont à l'origine de la cascade réactionnelle et les exécutrices qui sont responsables de la destruction des composantes de la cellule. La caspase 9 appartient aux initiatrices, tandis que les caspases 3, 6 et 7 font partie des exécutrices (voir figure 1). Ces dernières sont à l'origine du clivage des lamins situées dans la paroi interne de la membrane nucléaire, entraînant ainsi une condensation de la chromatine et un rétrécissement du noyau (pyknosis). Les caspases exécutrices vont cliver également des ICAD (inhibiteurs de protéases d'ADN), conduisant au relargage des ADNases et à la fragmentation de l'ADN des chromosomes.

Ensuite, les exécutrices vont digérer les protéines du cytosquelette telles que l'actine, la plectine, la vimentine et la gelsoline induisant l'effondrement du cytosquelette, la formation de cloques protubérantes à la surface du cytoplasme ainsi que la création de corps apoptotiques. Les protéines impliquées dans la chaîne respiratoire vont être à leur tour clivées, ce qui va engendrer une perturbation du transport des électrons, une perte de la production en ATP et une libération d'espèces oxydantes provenant de la mitochondrie. Au cours de l'apoptose, 400 à 1000 types de protéines sont clivés par les caspases exécutrices (Zamzami and Kroemer, 2001).

#### **I.1.1.2. La voie extrinsèque**

La voie extrinsèque est initiée par des ligands extracellulaires qui vont activer les récepteurs de la mort situés à la surface des cellules. Ces ligands appartiennent à la famille de protéines nommées les « tumor necrosis factor » TNF, et pour chaque type de récepteur il existe des ligands spécifiques. Le génome humain code pour une trentaine de ces récepteurs qui partagent un domaine cytoplasmique dénommé « le domaine de la mort ».

Lorsque le ligand va activer le récepteur, le domaine cytoplasmique du récepteur va se lier à la protéine FDD (Fas-associated death domain protein) dans le cytoplasme, formant ainsi le complexe DISC (death-inducing signaling complex). Celui-ci va recruter les pro-caspases 8 et 10, appartenant aux caspases initiatrices, et induire leur auto-clivage ainsi que leur activation. Les caspases 8 et 10 vont à leur tour activer les caspases exécutrices 3, 6 et 7, conduisant à la digestion des composantes de la cellule (Ashkenazi, 2002). Par ailleurs, la caspase 3 peut cliver et activer Bid, une protéine de la famille des Bcl-2, qui va induire la perforation de la mitochondrie et la libération du cytochrome C. Le programme extrinsèque peut ainsi recouper la voie intrinsèque grâce à la protéine Bid.

Certaines cellules peuvent utiliser aussi bien la voie intrinsèque que la voie extrinsèque, tandis que d'autres sont limitées à une seule voie. En cas d'altération du système intrinsèque,

certaines cellules peuvent activer elles-mêmes la voie extrinsèque en sécrétant des ligands spécifiques à leurs récepteurs de la mort.

Une autre voie extrinsèque existe faisant intervenir les lymphocytes cytotoxiques T et les « natural killers » (NK). Ces cellules appartenant au système immunitaire peuvent induire l'apoptose soit en activant les récepteurs de la mort par leur destruction, soit en ancrant une protéase, nommée granzyme B, à la surface des cellules afin qu'elle s'introduise dans le cytoplasme et active les procaspases 3, 8 et 9.

Par la suite, nous allons nous intéresser à l'action de la famille des Bcl-2 qui tient un rôle important dans la machinerie apoptotique.

## **I.1.2. Rôle des Bcl-2 dans la régulation de l'apoptose**

Tout d'abord, nous allons présenter brièvement d'un point de vue structural et fonctionnel la famille des Bcl-2, puis nous allons expliquer son rôle dans la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie au cours de l'apoptose. Ensuite, nous verrons que la famille des Bcl-2 peut être régulée par des protéines « non canoniques » et que des inhibiteurs ont été mis au point pour contrer leur action.

### **I.1.2.1. Présentation de la famille des Bcl-2**

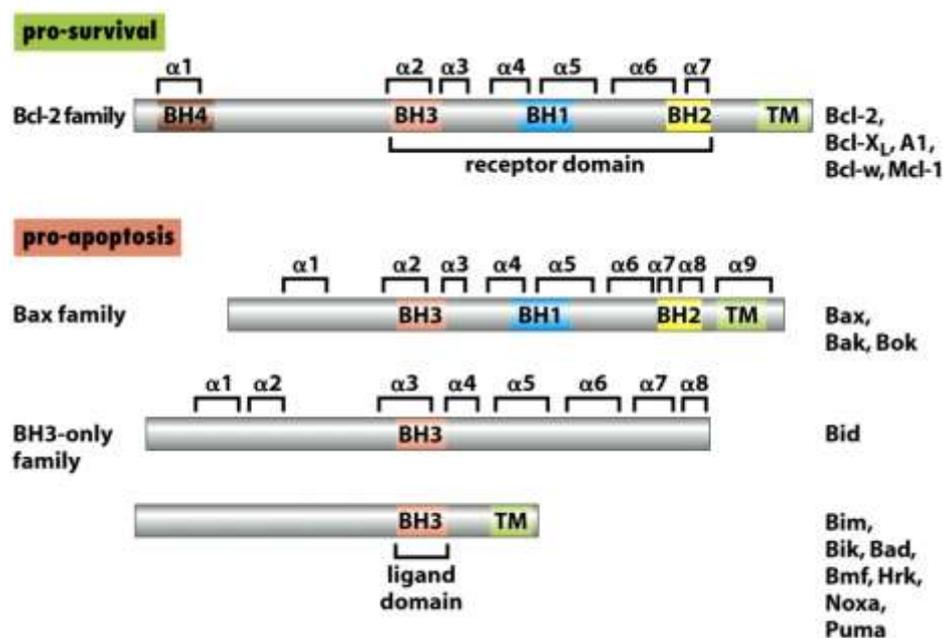
Le nom de cette famille provient de la protéine Bcl-2 (B cell lymphoma 2) qui a été découverte dans les lymphomes folliculaires car son taux d'expression était surélevé à cause d'une translocation des chromosomes t (14 : 18) (Tsujimoto et al., 1984).

Dans un premier temps, nous décrirons les caractéristiques structurales de cette famille puis leurs fonctions principales dans la cellule.

D'un côté, nous trouvons la sous-famille des protéines anti-apoptotiques ou pro-survies à domaines multiples, constituée de protéines présentant les quatre domaines BH1, BH2, BH3 et BH4 telles que Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Mcl-1 et A1 (voir figure 2).

De l'autre, la sous-famille des protéines pro-apoptotiques divisée en deux groupes, les protéines à domaines multiples et les protéines constituées uniquement du domaine BH3 (voir figure 2).

- Les protéines pro-apoptotiques à domaines multiples, qui sont également nommées effecteurs, présentent les quatre domaines conservés : BH1, BH2, BH3 et BH4, et comprennent uniquement Bax, Bak et Bok.
- Les protéines BH3-only ne possèdent à contrario qu'une région conservée : le domaine BH3. Cette cohorte contient Bad, Bim, Bid, Noxa, Puma, Bik/Blk, Bmf, Hrk/DP5, Beclin-1 et Mule (liste non exhaustive).

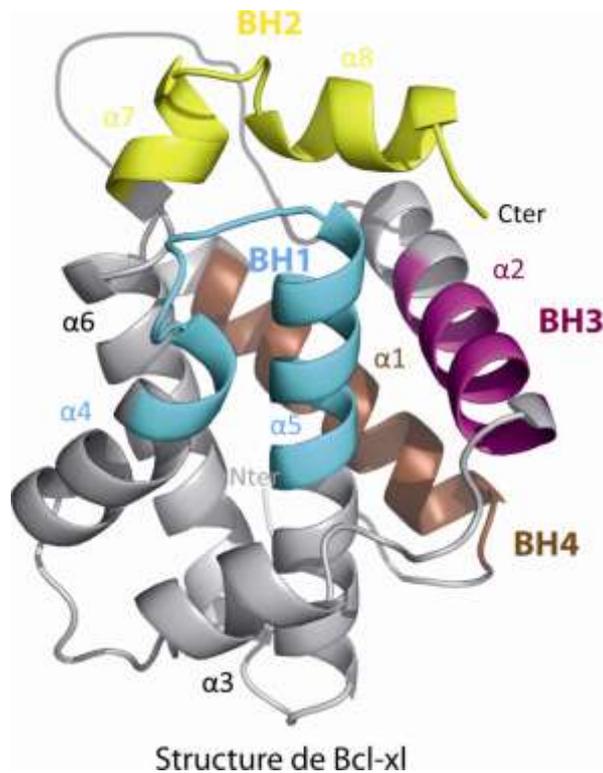


**Figure 2: Protéines de la famille des Bcl-2.** Ce schéma montre les deux sous-familles de la famille des Bcl-2 : les anti-apoptotiques ou pro-survies et les pro-apoptotiques (D'après la figure 9-25a, *The Biology of Cancer*, Garland Science 2007).

Les protéines à domaines multiples, aussi bien anti-apoptotiques que pro-apoptotiques, ont toutes en commun « un cœur Bcl-2 », c'est-à-dire un domaine globulaire qui comprend six à sept hélices alpha amphipathiques arrangées autour de deux hélices principalement hydrophobes,  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  (voir figure 3). Les domaines BH1 (portions entre  $\alpha 4$  -  $\alpha 5$ ) et BH2 (portions entre  $\alpha 7$  -  $\alpha 8$ ) d'un côté, et le domaine BH3 ( $\alpha 2$ ) et l'hélice  $\alpha 3$  d'un autre côté, délimitent un sillon hydrophobe. La structure de Bcl-xl est représentée dans la figure 3, avec les domaines BH1 en bleu cyan, BH2 en

jaune, BH3 en magenta et BH4 en marron. D'après les interactions mises en évidence, le sillon hydrophobe présente une affinité particulière avec le domaine BH3 du partenaire (voir partie I.1.2.2).

Le domaine BH4 a été caractérisé par le motif structural  $\phi\phi XX\phi'\phi$ , où  $\phi$  est un acide aminé hydrophobe, X est un acide aminé quelconque et  $\phi'$  est un résidu aromatique (Westphal et al., 2010). Ces protéines détiennent une hélice alpha 9 transmembranaire qui leur permet de s'insérer dans les membranes de la mitochondrie ou dans le réticulum endoplasmique, mais qui n'est pas représentée dans la figure 3.



**Figure 3 : Structure de Bcl-xl avec les domaines BH1, BH2, BH3 et BH4 (code PDB : 1R2D).**

Au sein de la famille des Bcl-2, certaines particularités se démarquent suivant les protéines. Par exemple, Mcl-1 est la seule à détenir une partie N terminale déstructurée et Bid est l'unique protéine de la famille des BH3-only à présenter une forme globulaire similaire à celle des protéines à domaines multiples (voir figure 2). De plus, Bid possède une boucle non structurée entre la première et la deuxième hélice, tout comme Bcl-2, Bcl-xl, et Bax.

Contrairement à Bid, les protéines de la famille BH3-only comme Bim, Bad et Bmf sont intrinsèquement désordonnées en absence de partenaires, mais subissent un changement conformationnel dans la région BH3 à la suite d'une interaction avec les protéines anti-apoptotiques (Hinds et al., 2007).

Des études phylogénétiques montrent que les protéines BH3-only ont évolué différemment des protéines à domaines multiples, à l'exception de Bid qui partage une origine commune avec Bcl-2, Bcl-xl et Bax (Aouacheria et al., 2005). Ceci laisse à penser que Bid est apparue avant les autres protéines BH3-only.

Les protéines de la famille des Bcl-2 sont principalement impliquées dans le développement de l'organisme ainsi que dans la régulation du calcium, de l'autophagie et de l'apoptose.

#### Développement de l'organisme :

Les protéines de la famille des Bcl-2 jouent un rôle considérable au cours du développement de l'organisme : Bcl-2 permet un bon développement du thymus, de la rate et des reins chez la souris tandis que Bcl-xl s'avère être essentiel à l'embryogenèse et au bon fonctionnement des cellules hématopoïétiques et neuronales. De plus, chez les souris Bax-/-, l'absence de Bax provoque une hyperplasie des lymphocytes T et B ainsi que des problèmes reproductifs (Chipuk et al., 2010).

#### Régulation du calcium dans le réticulum endoplasmique (RE) :

La famille des Bcl-2 régule l'homéostasie du calcium dans le RE et réside dans la membrane du RE. L'apport de calcium dans le RE est contrôlé par la  $Ca^{2+}$ -ATPase et sa libération par le récepteur 1,4,5-triphosphate inositol ( $IP_3R$ ). Bcl-xl inhibe directement l'activité de  $IP_3R$  via son domaine BH4 et empêche ainsi la libération de calcium du RE (Rong et al., 2009). Bax et Bak promeuvent le stockage de calcium dans le RE ainsi que son relargage en réponse au stress (Oakes et al., 2005).

#### Régulation de l'autophagie :

L'autophagie correspond à la dégradation d'une partie du cytoplasme de la cellule par ses propres lysosomes. Ce processus débute par la formation d'une vacuole qui s'agrandit pour former un amphisome qui va fusionner avec les lysosomes. Ce mécanisme permet l'élimination et le remplacement continuels des protéines et des organites non fonctionnels. L'axe Beclin-1 Vps34 régule la machinerie de l'autophagie. Vps34 est une kinase phosphatidylinositol de classe III qui contrôle le processus autophagique et qui est directement régulée par Beclin-1, une protéine « échafaudage » essentielle à l'induction de l'autophagie. Beclin-1 est connue pour interagir de manière constitutive avec Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1 ainsi qu'avec des homologues viraux de Bcl-2, conduisant à une baisse de l'activité de Vps34 et de la formation des autophagosomes (Erlich et al., 2007; Maiuri et al., 2007; Wei et al., 2008).

Beclin-1 possède un domaine BH3 qui va se lier aux sillons hydrophobes des protéines à domaines multiples de la famille des Bcl-2. Deux mécanismes peuvent expliquer la libération de Beclin-1 de l'emprise des membres de la famille des Bcl-2 : (i) des modifications post-traductionnelles

de Beclin-1 et/ou des protéines Bcl-2, (ii) la compétition du sillon hydrophobe des protéines Bcl-2 par les protéines BH3-only (Wei et al., 2008; Zalckvar et al., 2009).

#### Régulation de l'apoptose :

Le déclenchement de l'apoptose dépend du ratio entre protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. Si l'équilibre penche vers les protéines pro-apoptotiques, cela engendre la perforation de la mitochondrie, la libération du cytochrome C et ainsi l'apoptose. Cette fonction sera expliquée plus en détails dans la partie suivante. Par ailleurs, les mécanismes qui poussent les protéines Bcl-2 à promouvoir l'apoptose plutôt que l'autophagie demeurent inconnus.

#### **I.1.2.2. La famille des Bcl-2 régule la perméabilisation de la MOM**

Suite à un signal apoptotique, les protéines de la famille des Bcl-2 vont converger au niveau de la membrane extérieure de la mitochondrie, où les effecteurs Bax et Bak vont s'oligomériser pour former des pores afin de perforer la mitochondrie. Plusieurs modèles tentent d'expliquer les mécanismes à l'origine de l'oligomérisation des effecteurs, suivant les interactions qui ont été mises en évidence entre protéines de cette famille.

Pour l'instant, le mode d'action commun à ces protéines repose sur l'interaction du domaine BH3, correspondant à l'hélice  $\alpha_2$ , avec le sillon hydrophobe, formé des domaines BH1-BH2-BH3 (voir figure 3), du partenaire. Les seules protéines à détenir le sillon hydrophobe sont les protéines anti-apoptotiques et les effecteurs. En revanche, toutes les protéines de la famille des Bcl-2 possèdent un domaine BH3.

Suivant leur fonction dans la cellule, les protéines BH3-only sont considérées soit comme des activateurs, soit comme des senseurs, (Letai et al., 2002). Dans les cellules saines, les activateurs sont bloqués par les protéines anti-apoptotiques pour les empêcher d'induire l'apoptose. Suite à un signal apoptotique, les senseurs, qui sont localisés à différents endroits de la cellule, vont venir libérer les activateurs en rentrant en compétition avec les protéines anti-apoptotiques. Les activateurs libérés vont pouvoir interagir avec les effecteurs Bax et Bak à l'origine des pores au niveau de la mitochondrie (Kim et al., 2006). Un exemple qui illustre bien ce mécanisme est celui de Bad qui va libérer Bid de l'interaction avec Bcl-xl, ce qui va permettre à Bid d'activer Bax et d'induire la perforation de la mitochondrie (Certo et al., 2006).

Les activateurs se lient, via leur domaine BH3, aux sillons hydrophobes de toutes les protéines anti-apoptotiques tandis que les senseurs interagissent spécifiquement avec une gamme de protéines anti-apoptotiques. Les activateurs Bim, tBid (Bid après clivage) et Puma interfèrent avec

l'ensemble des protéines anti-apoptotique : Bcl-2, Bcl-W, Bcl-xl, Mcl-1 et A1 (liste non exhaustive), voir figure 4. En revanche, les senseurs Bad et Bmf se lient uniquement à Bcl-2, Bcl-xl et Bcl-W. De même, les senseurs Bik et Hrf s'associent à Bcl-xl, Bcl-W et A1, et Noxa interagit seulement avec Mcl-1 et A1 (Letai et al., 2002). Le schéma de la figure 4 ci-dessous résume la plupart de ces interactions.

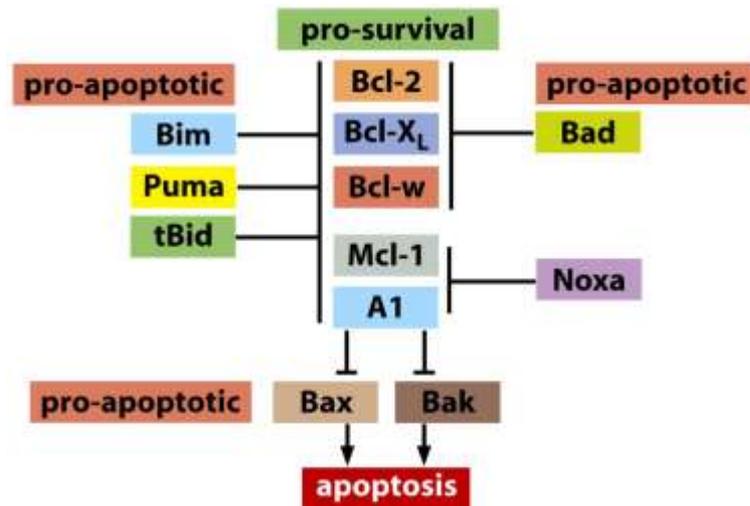


Figure 4 : Schéma des interactions entre protéines pro et anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2 (D'après la figure 9-27c, *The Biology of Cancer*, Garland Science 2007).

Par ailleurs, d'autres expériences montrent que les protéines anti-apoptotiques peuvent également interagir avec les effecteurs afin de les empêcher de s'oligomériser et de perméabiliser la membrane. D'après des études en biologie structurale, Bcl-xl et Mcl-1 s'associent avec les peptides BH3 de Bax et de Bak (Willis and Adams, 2005). La figure 5 schématise l'interaction entre un effecteur (sphère marron) et une protéine anti-apoptotique (sphère bleue), où le domaine BH3 (en rouge) de l'effecteur interagit avec le sillon hydrophobe de la protéine anti-apoptotique.

Les senseurs ont aussi comme rôle de libérer les effecteurs de l'interaction des protéines anti-apoptotiques. Par exemple, suite à un signal apoptotique, Noxa va se lier à Mcl-1 dans le but de dissocier le complexe Mcl-1/Bak et de libérer Bak qui va pouvoir s'oligomériser (Willis and Adams, 2005). De manière similaire, Bik libère Bak en interagissant avec Mcl-1 et Bcl-xl (Shimazu et al., 2007).

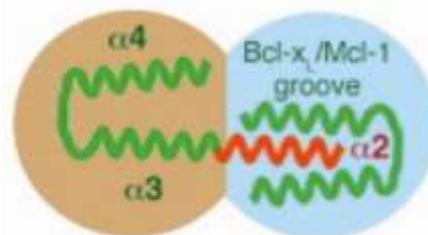
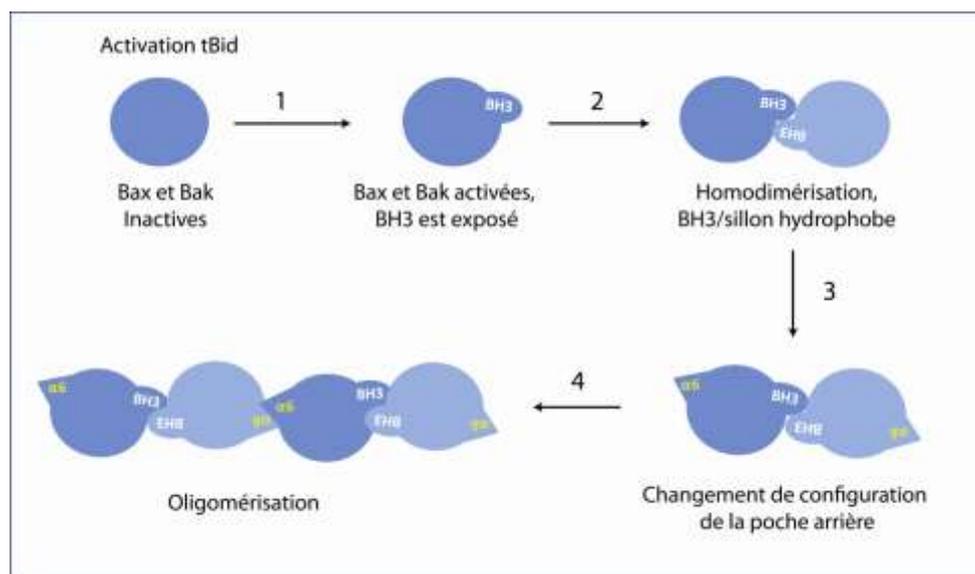


Figure 5 : Hétérodimère entre un effecteur et une protéine anti-apoptotique (Westphal et al., 2011).

Ces interactions ayant lieu dans la paroi extérieure de la mitochondrie, la membrane est un paramètre à prendre en compte, puisque l'environnement lipidique influe sur la localisation et la conformation des protéines. Par exemple, les cardiolipines facilitent l'insertion de Bid et de Bax dans la membrane (Christenson et al., 2008; Lucken-Ardjomande et al., 2008).

Il a été suggéré que l'oligomérisation de Bax et de Bak suit une succession d'étapes (voir figure 6). Tout d'abord, les effecteurs sont activés par les activateurs BH3-only conduisant à la libération de leur domaine BH3 (étape 1, figure 6). Ensuite, des homodimères sont formés via l'interface BH3/sillon hydrophobe BH1-BH2-BH3 (étape 2, figure 6), ce qui engendre un changement de conformation de la « poche arrière », libérant ainsi l'hélice  $\alpha_6$  (étape 3, figure 6). Enfin, l'oligomérisation se poursuit par l'intermédiaire de l'interface  $\alpha_6$ - $\alpha_6$  (étape 4, figure 6).

L'activation de Bax et de Bak se caractérise par des changements conformationnels continus et des interactions dynamiques avec les activateurs. Cela explique pourquoi il est difficile de mettre en évidence ces complexes.



**Figure 6 : Etapes d'oligomérisation de Bax et de Bak (Dewson et al., 2009).**

Une autre zone d'interaction a été identifiée entre les hélices  $\alpha_9$  qui pourrait expliquer la formation de pores. Les hélices  $\alpha_5$  et  $\alpha_6$  seraient également impliquées dans ce mécanisme (Kim et al., 2009; Zhang et al., 2002). La nature de la perforation est encore en discussion, il pourrait s'agir soit de pores lipidiques, soit d'un canal de protéines.

Il est à noter que des facteurs non protéiques comme la chaleur, les détergents non ioniques et un pH alcalin peuvent déclencher l'activation de Bax et de Bak. Des préparations de mitochondries chauffées à 43°C relâchent du cytochrome C conduisant à l'oligomérisation de Bak, effet qui est

contré par la présence de Bcl-xl (Pagliari et al., 2005). De même, des détergents non ioniques provoquent un changement de conformation de Bax et de Bak aboutissant à leur activation. En effet, les détergents NP-40 et Triton X-100 sont capables d'induire la formation d'hétérodimères ou d'oligomères de la famille des Bcl-2 (Hsu and Youle, 1997).

### **I.1.3. Partenaires non canoniques de la famille des Bcl-2**

Il existe des protéines qui régulent l'apoptose en interagissant avec la famille des Bcl-2 sans partager aucune de leurs caractéristiques. Des protéines telles que RAD9A, Aiolos, RTN1 et RTN4 peuvent capturer des protéines anti-apoptotiques soit dans le cytosol, soit dans le RE, pour les empêcher d'agir dans la membrane extérieure de la mitochondrie (Komatsu et al., 2000; Tagami et al., 2000). Il existe également des protéines comme p53 qui active directement Bax et Bak et dont l'action est contrée par Bcl-xl (Chipuk et al., 2004).

Par ailleurs, la famille des Bcl-2 interagit avec les caspases, qui font également partie de la machinerie apoptotique, afin de les rendre inactives. Par exemple, Bcl-2 se lie à la pro-CASP8 pour la maintenir inactive tandis que Bcl-xl interagit avec CASP9 et APAF-1 pour bloquer la formation de l'apoptosome (Hu et al., 1998; Poulaki et al., 2001).

Ces exemples non exhaustifs montrent qu'un large réseau de protéines est engagé dans la régulation des protéines de la famille des Bcl-2. Environ 55 protéines (voir annexe 1) ont été répertoriées en tant que partenaires « non canoniques » des protéines de la famille des Bcl-2 (Beverly, 2012). D'après les zones d'interactions, plus d'une vingtaine de protéines dévoilent un motif proche du domaine BH3, nommé domaine BH3 « non canonique ». Malgré les variations entre ces motifs, un consensus d'environ 10 acides aminés de long a pu être établi :  $\Sigma\text{XXXLXXX}\beta\text{DXXXXX}$  (voir figure 7), où la leucine en position 5 et l'acide aspartique en position 10 sont fortement conservées,  $\Sigma$  représente un résidu hydrophobe tel que la leucine, l'isoleucine, la valine, l'alanine et rarement la thréonine, X correspond à un résidu quelconque et  $\beta$  peut être soit la glycine, la sérine, l'alanine ou la cystéine.



Figure 7 : Alignement de séquences d'acides aminés entre protéines non canoniques (Beverly., 2012).

La figure 7 montre un alignement des domaines BH3 « non canoniques » de plusieurs partenaires de la famille des Bcl-2, le consensus ayant été rajouté dans la dernière ligne de l'alignement. Parmi ces protéines, il y a HUWE1a une E3 ligase de Mcl-1, USP9Xa une déubiquitineuse de Mcl-1 et CASP9a une caspase interagissant avec Bcl-xl.

#### I.1.4. Médicaments ciblant la famille des Bcl-2

Les protéines anti-apoptotiques sont de potentiels oncogènes car lorsqu'elles sont surexprimées dans les cellules cancéreuses, le potentiel de survie de la cellule augmente. Dans le modèle des souris transgéniques, il existe une synergie entre l'oncogène myc, qui favorise l'activité mitotique des cellules mais induit l'apoptose, et les oncogènes de la famille des Bcl-2. Lorsque ces protéines sont surexprimées ensemble, la tumorigénicité des cellules cancéreuses augmente de manière considérable par rapport à celle induite par les protéines seules (Strasser et al., 1990). De plus, dans les carcinomes du sein, les glioblastomes et les cancers du poumon à petites cellules, la protéine Bcl-2 est amplifiée au niveau de la transcription et de la traduction (Weyhenmeyer et al., 2012). De même, l'expression de Mcl-1 est très élevée dans la leucémie myéloïde chronique et dans les myélomes (Beroukhim et al., 2010; Wertz et al., 2011).

Non seulement la surexpression des protéines anti-apoptotiques joue un rôle dans le développement du cancer, mais il existe une corrélation entre leur taux très élevé et la résistance des cancers à des thérapies telles que la chimiothérapie et la radiothérapie (Kang and Reynolds, 2009). Des études récentes ont dévoilé le phénomène « d'addiction aux oncogènes » : en absence d'agents anticancéreux, de nombreuses cellules tumorales sont « accros » à la présence des protéines anti-

apoptotiques et leur survie dépend de l'activité de ces oncogènes (Weyhenmeyer et al., 2012). Il est donc crucial de réduire l'activité des protéines anti-apoptotiques. Ces protéines sont donc des cibles thérapeutiques contre le cancer.

Comme vu dans la partie I.1.2.2, les protéines anti-apoptotiques avec leur sillon hydrophobe vont bloquer l'activité des protéines pro-apoptotiques en interagissant avec leur domaine BH3, correspondant à l'hélice  $\alpha 2$ . Par conséquent, des mimétiques du domaine BH3 ont été élaborés en vue de rompre cette interaction et de libérer les protéines pro-apoptotiques afin qu'elles puissent induire l'apoptose.

La première drogue développée ciblant les protéines anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2 est l'Oblimersen sodium (G3139, Genasense), qui est un inhibiteur de la traduction de Bcl-2 (Klasa et al., 2002). Cet agent chimique n'a pas été validé par la « US Food and Drug Administration » car il inhibe uniquement Bcl-2, permettant aux cellules cancéreuses de résister en surexprimant d'autres protéines anti-apoptotiques.

Un composé d'origine naturel, le Gossypol (AT-101, Ascenta), a été découvert inhibant à la fois Bcl-2, Bcl-xl et Mcl-1 (Wei et al., 2009). Cette molécule est toxique et donne des résultats décevants dans les essais en phase II (Baggstrom et al., 2011). Des dérivés ont été générés, Apogossypol et Sabutoclax qui présentent une plus grande affinité et une moindre toxicité. Ces composés vont bientôt entrer en phase clinique. Le mécanisme d'action demeure inconnu mais ces molécules interagissent en absence de Bax et de Bak et semblent induire l'autophagie en bloquant l'interaction entre Beclin-1 et Bcl-2 (Lian et al., 2010).

A la suite d'un criblage d'agents naturels qui dissocient les interactions entre membre de la famille des Bcl-2, le composé Obatoclax (GX-15-70, Gemin X Biotechnologies) a été mis en évidence se liant à Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w et Mcl-1 *in vitro* (Zhai et al., 2006). Des résultats prometteurs ont été observés en phase I et comme le Gossypol, l'autophagie a été mise en avant pour expliquer son action (Vogler et al., 2009).

ABT-737 (Abbot) a été découvert à la suite d'un criblage d'une panoplie d'analogues du domaine BH3 qui se lient fortement au sillon hydrophobe de Bcl-xl. Ce composé n'inhibe pas Mcl-1 mais interagit avec une affinité de l'ordre du nanomolaire avec Bcl-2, Bcl-xl et Bcl-w (Vogler et al., 2009). Cependant, l'administration du médicament reste problématique et des résistances ont été observées dans des cellules qui expriment Mcl-1 (Konopleva et al., 2006). Contrairement aux autres inhibiteurs, ABT-737 se comporte comme une protéine BH3-only et nécessitent la présence de Bax et de Bak ainsi que de la caspase 9 pour inhiber l'apoptose (van Delft et al., 2006). D'ailleurs, la

structure de Bcl-xl en complexe avec cet inhibiteur a été résolue (code PDB : 2YXJ) et montre que ce composé interagit au niveau du sillon hydrophobe comme les protéines BH3-only.

La difficulté réside dans l'élaboration d'inhibiteurs qui interagissent avec toutes les protéines anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2, sinon les cellules cancéreuses peuvent résister en surexprimant les protéines qui ne sont pas inhibées. Ces composés sont d'autant plus efficaces qu'ils sont combinés avec d'autre anticancéreux comme le docetaxel, l'étoposide et le carboplatin.

## **1.2. Mcl-1 et Bcl-xl, deux protéines clefs de l'apoptose**

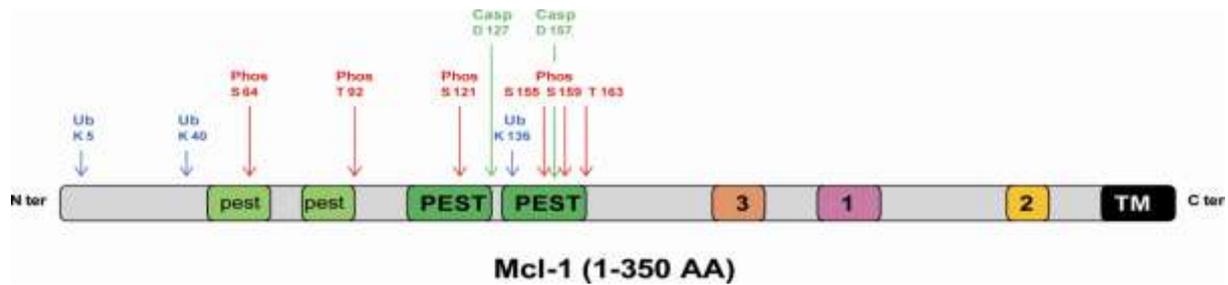
TCTP est connue pour interagir avec trois protéines de la famille des Bcl-2 : Mcl-1, Bcl-xl et A1 (Yang et al., 2005; Zhang et al., 2002). Les expériences les plus approfondies au sujet de ces interactions concernent Mcl-1 et Bcl-xl. Dans ce chapitre, nous allons présenter plus en détail ces deux protéines d'un point de vue fonctionnel et structural et leurs différences structurales vont être étudiées.

### **1.2.1. Description de Mcl-1**

Nous allons tout d'abord décrire les caractéristiques structurales de Mcl-1 puis son mode de régulation dans la cellule ainsi que ses différentes fonctions.

Mcl-1 appartient à la famille des Bcl-2 et se différencie des autres membres par sa taille, puisqu'elle comprend 350 résidus contrairement à Bcl-2 et à Bcl-xl qui en possèdent respectivement 239 et 233. Mcl-1 est la seule protéine de la famille des Bcl-2 qui possède une partie N terminale non structurée, formée des 170 premiers acides aminés. Les résidus compris entre les positions 170 et 300 partagent une forte homologie structurale et fonctionnelle avec les protéines à multi-domaines et présentent les trois domaines BH1, BH2 et BH3, comme le montre la figure 8. Uniquement la structure de Mcl-1 dépourvue de sa partie N terminale et de l'hélice transmembranaire a été résolue, avec et sans partenaires.

Ces structures mettent en avant l'interaction entre le sillon hydrophobe de Mcl-1 et le domaine BH3 de ses partenaires : Puma, Noxa, Bid, Bim et Bax (Czabotar et al., 2011; Day et al., 2008; Liu et al., 2010). Les caractéristiques moléculaires de la partie N terminale ont été étudiées par l'équipe de Kozopas (Kozopas et al., 1993) qui a identifié plusieurs domaines enrichis en proline (P), acide glutamique (E), sérine (S), thréonine (T), nommés des régions « PEST » ainsi que quatre paires d'arginine. De plus, ces régions sont dotées de nombreux sites de phosphorylation, d'ubiquitination et de clivage par les caspases. L'ensemble de ces caractéristiques est indiqué sur la figure 8. Ces domaines sont caractéristiques des protéines labiles à faible durée de vie dans les cellules.



**Figure 8 : Schéma de la protéine Mcl-1 avec ses domaines PEST, BH1-2-3 et ses sites post-traductionnels.** Les domaines PEST sont en vert, le domaine BH3 en orange, BH2 en jaune, BH1 en rose ainsi que la partie transmembranaire en noir.

Mcl-1 se distingue des autres membres de la famille des Bcl-2 car elle est la seule, avec A1, à pouvoir être induite après stimulation (Karsan et al., 1996a; Karsan et al., 1996b). Le niveau intracellulaire de cette protéine peut fluctuer rapidement en réponse à une grande variété de stimuli extracellulaires. Par exemple, certains agents cytotoxiques peuvent réduire drastiquement le niveau de Mcl-1 et provoquer l'apoptose. Tandis que des facteurs de croissance et des cytokines peuvent accroître rapidement la quantité de Mcl-1 dans les cellules favorisant leur survie, c'est le cas des interleukines (IL)-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, du facteur de croissance épidermal, de l'érythropoïétine, du gonadotropin et de l'activin A (Karsan et al., 1996a; Karsan et al., 1996b).

Mcl-1 est régulée dans la cellule par des modifications post-traductionnelles et des clivages.

Comme vu précédemment, Mcl-1 présente dans sa région N terminale plusieurs sites de clivage par les caspases. L'équipe de Han (Han et al., 2005) a identifié trois de ces sites comme des cibles de la Granzyme B (GrB). Il a été décrit que ces clivages engendrent une diminution de l'activité anti-apoptotique de Mcl-1, puisque Mcl-1 dépourvue de sa partie N terminale se lie à la forme entière, l'empêchant ainsi d'interagir avec les protéines pro-apoptotiques (Herrant et al., 2004). Par conséquent, ces clivages ont une incidence sur la fonction anti-apoptotique de Mcl-1.

La dégradation de Mcl-1 par le protéasome a été mise en évidence par Nijhawan (Nijhawan et al., 2003) dans des cellules HeLa exposées à des radiations UV. Trois nouvelles E3 ubiquitin-ligase, responsable de la polyubiquitination de Mcl-1, ont été découvertes et se nomment Mcl-1 Ubiquitin Ligase E3 (MULE), beta transducin-containing protein ( $\beta$ -TrCP) et SCF<sup>FW7</sup> E3 (Ding et al., 2007; Inuzuka et al., 2011; Zhong et al., 2005). Réciproquement, il existe une déubiquitinase, appelée USP9X, qui stabilise Mcl-1 en enlevant les polyubiquitines (Schwickart et al., 2010).

La phosphorylation est un mécanisme rapide, réversible qui régit de nombreuses fonctions et propriétés de la protéine comme sa localisation, sa structure, sa stabilité ainsi que ses interactions.

Les régions PEST de Mcl-1 sont riches en sites de phosphorylation. Les résidus phosphorylés et leur effet sur Mcl-1 sont indiqués dans le tableau en annexe (voir annexe 2) (Thomas et al., 2010).

Mcl-1 agit en tant que facteur de survie dans les cellules, mais récemment un rôle dans le maintien de l'intégrité de la mitochondrie lui a été découvert.

#### Facteur de survie:

Le gène codant pour Mcl-1 a été à l'origine identifié comme un « early gene » induit au cours de la différenciation des cellules de la leucémie myéloblastique (Kozopas et al., 1993). Pendant la prolifération et la différenciation, les cellules sont plus sensibles aux stimuli apoptotiques. Il a été montré que Mcl-1 interagit et régule négativement PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), un élément essentiel au cycle cellulaire qui permet la transition de la phase G1 à la phase S. Ainsi, Mcl-1 contribue au ralentissement du cycle cellulaire pour renforcer la survie de la cellule en cours d'adaptation (Zhang et al., 2002).

Des études sur des cellules U937 traitées à l'ester de phorbol, ont montré qu'une diminution de l'expression de Mcl-1, induite par des ARN anti-sens, provoque l'apoptose dans ces cellules. De plus, la surexpression de Mcl-1 dans des tissus hématopoïétiques de souris transgéniques améliore la survie des cellules (Reynolds et al., 1994; Zhou et al., 1997). Ces exemples illustrent le rôle anti-apoptotique de Mcl-1 dans la cellule.

Dans le système immunitaire, Mcl-1 est vite dégradée dans les neutrophiles qui ont une durée de vie extrêmement courte (Moulding et al., 1998). De plus, la survie des macrophages dépend uniquement de l'expression de Mcl-1 (Liu et al., 2001) et des expériences sur le système lymphoïde montrent l'importance de Mcl-1 dans le développement et le maintien des lymphocytes T et B (Opferman et al., 2003).

Cette protéine joue également un rôle crucial dans le développement embryonnaire puisqu'en son absence, les embryons meurent à l'étape de la péri-implantation (Rinkenberger et al., 2000). Par conséquent, l'expression de Mcl-1 promeut la survie des cellules au cours de la différenciation et de l'embryogenèse ainsi que le maintien des cellules immunitaires.

#### Fonction dans le maintien de la mitochondrie :

Une nouvelle fonction de Mcl-1, qui concerne la régulation de la fonction et de la structure de la membrane interne de la mitochondrie, a été découverte récemment (Perciavalle et al., 2013). Les cellules expriment trois isoformes de Mcl-1 de tailles respectives 36 Kda, 38 Kda et 40Kda, qui exercent des fonctions distinctes et qui sont localisées dans des compartiments différents de la mitochondrie. Les formes de 40 et 38 Kda résident dans la paroi extérieure de la mitochondrie où

elles antagonisent les protéines pro-apoptotiques. Au cours de la translocation vers la matrice, via les translocases TOM et TIM, la région N terminale de Mcl-1 subit des clivages qui aboutissent à la forme de 36KDa. Cette espèce tronquée de Mcl-1 est fixée dans la membrane interne de la mitochondrie et exposée vers la matrice. Elle est responsable de la stabilité structurale de la membrane interne ainsi que de la fusion et de l'équilibre bioénergétique de la mitochondrie.

De plus, Mcl-1 est indispensable à la stabilisation du taux d'ADN mitochondrial, la formation du complexe IV et à l'assemblage de  $F_1F_0$ -ATP synthase en oligomères. Ainsi, Mcl-1 joue un rôle dans le bon fonctionnement de la mitochondrie au cours de la prolifération et de la différenciation cellulaire. Dans les cellules cancéreuses, en dehors de sa fonction anti-apoptotique, Mcl-1 pourrait contribuer dans la mitochondrie au maintien de la synthèse élevée de biomolécules impliquées dans l'hyper-prolifération (DeBerardinis et al., 2008). Ainsi, Mcl-1 résidant dans la matrice s'avère être une nouvelle cible thérapeutique contre le cancer.

#### Durée de demi-vie :

Suivant la méthode utilisée les durées de demi-vie diffèrent, la technique de « pulse-chase analysis » calcule 30 à 40 minutes tandis que la méthode par blocage à la cycloheximide mesure 1,5 heure. Cette divergence pourrait s'expliquer par l'existence de deux types de Mcl-1, une forme fraîchement synthétisée et une autre forme mature (Liu et al., 2005). Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour mieux appréhender ces formes.

#### Localisation :

Dans les cellules au repos, Mcl-1 est localisée dans différents compartiments cellulaires comme dans la mitochondrie (Akgul et al., 2000), l'enveloppe nucléaire (Leuenroth et al., 2000), le cytosol, ou encore dans le noyau (Jamil et al., 2005). Mcl-1 peut s'insérer dans la membrane extérieure de la mitochondrie à l'aide du récepteur Tom70 et grâce à ses séquences internes (ses 79 premiers résidus), sa région EELD (entre les acides aminés 124 et 127) et sa partie transmembranaire (Germain et al., 2013 ; Chou et al., 2006). Mcl-1 est localisée au niveau de la mitochondrie dans le but de contrecarrer l'activité des protéines pro-apoptotiques Bak et Bax (Germain and Duronio, 2007). La localisation nucléaire de Mcl-1 a été attribuée à son interaction avec les protéines CDK-1 et PCNA. Cependant, le mode de transport de Mcl-1 à travers la membrane nucléaire n'a pas encore été élucidé.

## I.2.2. Description de Bcl-xl

Dans cette partie, nous allons décrire les différentes fonctions de Bcl-xl dans la cellule ainsi que ses caractéristiques structurales.

### **Fonctions :**

Bcl-xl est connue en tant que facteur de survie dans les cellules et peut agir de différentes manières dans la mitochondrie pour empêcher l'apoptose.

#### Fonction de survie dans le développement des embryons et dans le maintien des lymphocytes:

Le gène Bcl-x, issu du poulet, a été découvert par la méthode d'hybridation, en prenant comme sonde la forme murine de l'ADN complémentaire de Bcl-2 (Boise et al., 1993). La forme entière de Bcl-xl, constituée de 233 résidus, a été identifiée ainsi que la forme Bcl-xs de 170 résidus dépourvue des domaines BH1 et BH2. Bcl-xl inhibe la mort cellulaire tandis que Bcl-xs la facilite. Des souris déficientes en Bcl-x (sans Bcl-xl, ni Bcl-xs) meurent au bout du treizième jour de l'embryogenèse, à cause d'une apoptose surabondante des cellules de la moelle épinière, des ganglions de la racine dorsale et des neurones immatures du cerveau en cours de développement (Motoyama et al., 1995). La délétion de Bax, une protéine pro-apoptotique, dans les souris Bcl-x -/- améliore significativement la survie des neurones, ce qui suggère que Bax et Bcl-x régulent la survie des neurones immatures (Shindler et al., 1997).

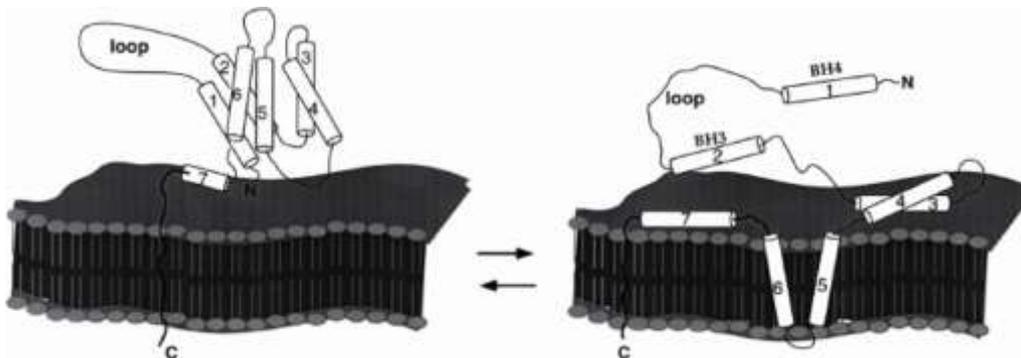
Bcl-xl joue un rôle crucial dans le développement des lymphocytes T et B, son expression est spécifiquement induite dans les cellules Pre-B par des signaux extérieurs comme LPS, Ig ou CD40 (Grillot et al., 1996). La protéine Bcl-xl est nécessaire aussi bien à leur survie qu'à leur fonction (Boise et al., 1995; Murrack and Kappler, 1994).

#### Fonction anti-apoptotique via son interaction avec Bax et sa capacité à former des canaux ioniques :

Comme vu précédemment, Bcl-xl inhibe l'apoptose en interagissant avec des protéines pro-apoptotiques comme Bax et Bim (Czabotar et al., 2011). Des mutants ponctuels de Bcl-xl ont été construits de façon à casser l'interaction avec Bax, mais sans affecter la structure globale de la protéine. Les résidus mutés sont : Y101K dans le domaine BH3, Y195G du domaine BH2, et L130A du domaine BH1. Ces mutants sont transfectés dans des lignées stables FL5.12 en vue d'évaluer leur capacité à protéger ces cellules de l'apoptose. Malgré l'incapacité de ces mutants à se lier à Bax, ces cellules transfectées retiennent suffisamment d'activité anti-apoptotique, par conséquent l'hétérodimérisation entre Bcl-xl et Bax n'est pas le seul facteur qui inhibe l'apoptose.

Des études sur la toxine diphtérique montrent que leurs deux hélices centrales sont engagées dans la formation de canaux ioniques dans les membranes (Silverman et al., 1994). Ces deux hélices sont équivalentes structurellement aux hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  de Bcl-xl qui sont présentées dans la figure 9. Les charges des résidus de la boucle entre les deux hélices de la toxine diphtérique jouent un rôle dans la formation des pores et lorsque les charges sont inversées la toxine est incapable de former des pores. Pour les protéines anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2, cette région est négativement chargée, tandis que pour les protéines pro-apoptotiques, comme Bax ou Bak, cette boucle est positivement chargée.

Dans le but de tester la contribution de cette région dans la fonction apoptotique de Bcl-xl, la connexion entre ses hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  a été remplacée par la partie équivalente de Bax, cette protéine chimérique est nommée XB. En vue d'étudier uniquement l'effet de la boucle sur l'apoptose, la mutation Y101K a été introduite de façon à casser les hétérodimères. La protéine XB/Y101K a été transfectée stablement dans les cellules FL5.12 et son activité anti-apoptotique a presque totalement disparu, contrairement à la protéine Y101K. Par conséquent cette région est impliquée dans l'activité anti-apoptotique de Bcl-xl. Ces expériences montrent qu'il existe deux mécanismes distincts pour protéger les cellules de l'apoptose, l'un via hétérodimérisation de Bcl-xl avec Bax et avec d'autres protéines pro-apoptotiques, et l'autre via les propriétés liées à la région chargée entre les hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  de Bcl-xl, impliquée dans la formation de canaux ioniques (Minn et al., 1999).



**Figure 9 : Insertion des hélices  $\alpha 5$  et  $\alpha 6$  de Bcl-xl dans la membrane au cours de la formation des canaux ioniques.**

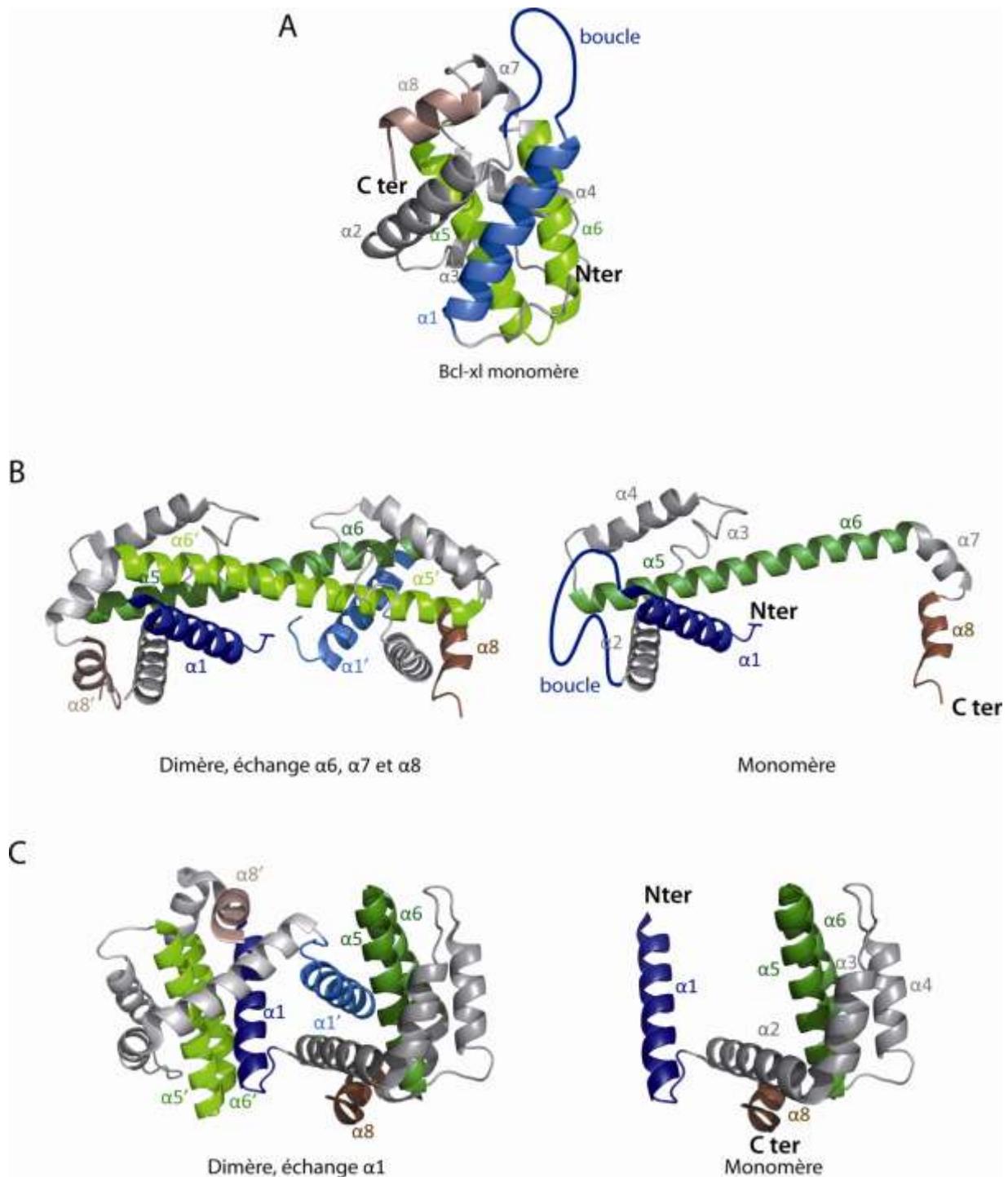
**Structure :**

Bcl-xl, comme Bax, Bid et Bcl-2, présente une caractéristique particulière, qui est la boucle entre les hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  formée des résidus 26 à 83, et qui est représentée en trait plein bleu dans la figure 10.A. Des études sur le rôle de cette boucle dans l'apoptose montrent que des mutants de Bcl-xl et Bcl-2 dépourvus de cette boucle protègent davantage les cellules FL5.12 de l'apoptose que les protéines entières. De plus, la boucle n'intervient pas dans l'interaction avec Bax, puisque les mutants sans boucle se lient aussi bien à Bax qu'aux protéines entières. Ces données soulignent que la boucle joue un rôle dans l'apoptose en dehors de l'hétérodimérisation avec Bax ou Bak (Chang et al., 1997; Cheng et al., 1996).

**Dimérisation :**

Des études structurales en cristallographie et en RMN ont identifié un dimère de Bcl-xl formé par les permutations des hélices  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$  et  $\alpha 8$ , comme l'indique la figure 10.B. La première structure a été résolue en cristallographie avec le dimère isolé sur gel filtration dans des conditions alcalines à pH=10 (O'Neill et al., 2006). Une cartographie de la zone d'interaction du dimère a été réalisée en RMN, avec le dimère provenant du chauffage du monomère à plus de 50°C. Les spectres RMN des dimères de Bcl-xl obtenus par chauffage et à pH 10 sont identiques, indiquant que ces deux dimères sont formés par les mêmes permutations (Denisov et al., 2007).

Des études de cinétique de formation du dimère, réalisées à 1mM, à 55°C et à pH neutre, ont révélé que 70% de Bcl-xl se trouve sous forme dimérique au bout de 2 heures. La conversion de monomère en dimère à 30°C et à 1mM est 1 000 fois plus rapide à pH=10 qu'à pH=7.



**Figure 10 : Structures des différentes formes de Bcl-xL.** La figure A représente le monomère de Bcl-xL (code PDB : 1R2D), la figure B le dimère par permutation des hélices  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$  et  $\alpha 8$  (code PDB : 2B48) et la figure C le dimère par permutation de l'hélice  $\alpha 1$  (code PDB : 3INQ).

De plus, la formation du dimère n'est pas sensible à la concentration en sels à pH neutre et sa constante de dissociation a été estimée à 0,3mM à 55°C (Denisov et al., 2007). D'après l'article de O'Neill (O'Neill et al., 2006), les dimères accroissent l'activité de formation de pores par rapport aux

monomères, ce qui montre que le dimère a un rôle biologique dans l'apoptose. Des expériences avec le peptide BH3 Bid montrent qu'il se lie aussi bien au dimère qu'au monomère de Bcl-xl, indiquant que les interfaces de dimérisation et d'interaction avec le peptide ne se recoupent pas. De plus, le peptide BH3 Bid et le gossypol, un inhibiteur de Bcl-xl, ralentissent la conversion entre ces deux formes. Après un jour d'incubation à 55°C de Bcl-xl sous forme de monomère et de dimère respectivement avec 1mM de peptide Bid, aucune conversion n'est détectée aussi bien pour le monomère que pour le dimère. Ainsi, le peptide Bid peut empêcher la conversion d'une forme vers une autre.

Un autre type de dimère a été observé avec une permutation de l'hélice  $\alpha_1$ , voir figure 10.C. La structure révèle que la connexion reliant l'hélice  $\alpha_1$  à l'hélice  $\alpha_2$  est trop rigide pour que l'hélice  $\alpha_1$  puisse se loger dans le sillon formé par les hélices  $\alpha_2$  et  $\alpha_5$ . Par conséquent, l'hélice  $\alpha_1$  va se placer dans le sillon d'une autre protéine, formant ainsi un dimère artificiel. Nous pouvons observer la structure de ce dimère et de son unité monomérique dans la figure 10.C.

Ce phénomène de permutation d'hélices concerne d'autres protéines de la famille des Bcl-2 comme Bcl-W (Lee et al., 2011), Bax (Czabotar et al., 2013) ainsi que des protéines virales apparentées à cette famille telle que F1L (Kvansakul et al., 2008). Ce ne sont pas toujours les mêmes hélices qui rentrent en jeu, pour Bcl-W les hélices  $\alpha_4$  et  $\alpha_3$  vont être échangées avec celles du partenaire, tandis que pour F1L ce sont uniquement les hélices  $\alpha_1$  qui vont être permutées. Seulement Bax présente le même type de permutation avec les hélices  $\alpha_6$ ,  $\alpha_7$  et  $\alpha_8$ .

#### Agrégation :

Différents types d'agrégats de Bcl-xl ont été mis en évidence *in vitro* à pH neutre, selon la température. Des agrégats de type micellaire ont été visualisés à 37°C tandis qu'à 70°C des fibres amyloïdes sont détectées. Alors que la structure des protéines reste préservée dans les agrégats micellaires, les fibres amyloïdes sont formées de protéines de Bcl-xl ayant perdues leur structure tertiaire initiale. Au cours de la formation des fibres amyloïdes, le chauffage va permettre de casser la structure tertiaire de Bcl-xl et de former des feuillets  $\beta$  à partir d'hélices  $\alpha$ , qui sont stabilisés par des interactions intermoléculaires (Chenal et al., 2012).

#### Environnement lipidique :

Dans le but d'appréhender la conformation de Bcl-xl dans un environnement lipidique, la structure de Bcl-xl a été caractérisée dans des micelles lipidiques par des études en RMN. Il a été montré que les interactions protéines-protéines sont remplacées par des interactions protéines-détergent. De plus, la structure secondaire de Bcl-xl est modifiée car des différences dans la longueur

et la localisation des hélices  $\alpha$  entre la forme liée aux micelles et la forme libre sont détectées. De manière générale, Bcl-xl dans les micelles est plus relâchée et mobile que dans l'eau. Des analyses de l'interaction protéine-détergent par la méthode NOE couplées à de la protéolyse ont dévoilé que  $\alpha 1$ ,  $\alpha 6$  et la partie initiale de la boucle sont insérés dans le cœur hydrophobe des micelles contrairement aux autres hélices qui se situent à la surface des micelles ou sans contact avec les détergents (Losonczi et al., 2000).

### **I.2.3. Comparaison structurale entre Mcl-1 et Bcl-xl**

Mcl-1 et Bcl-xl inhibent l'apoptose, mais se lient à des partenaires différents. Par exemple, Mcl-1 se lie à Noxa mais pas à Bad, tandis que Bcl-xl interagit avec Bad mais pas avec Noxa (Certo et al., 2006; Chen et al., 2005). Des études structurales ont apporté une meilleure compréhension sur leur spécificité.

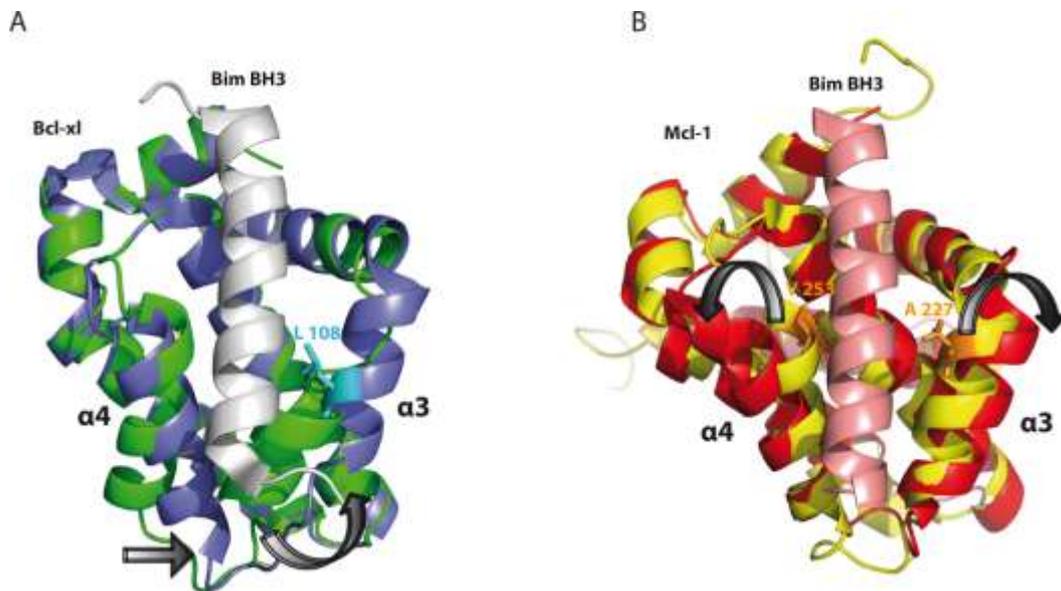
Mcl-1 présente une structure très proche de celle de Bcl-xl car son RMSD (écart quadratique moyen de la chaîne principale) est inférieur à 2Å, mais elle partage uniquement 25% d'homologie de séquence avec Bcl-xl. De plus, la séquence du domaine BH3 de Mcl-1 diffère significativement de celle de Bcl-xl, bien qu'elle présente deux résidus conservés, la glycine et l'acide aspartique (en gras) :  $BH3_{Mcl-1} = \text{VGDGVXXN}$  et  $BH3_{Bcl-xl} = \text{AGDEFXXR}$ , où X représente un acide aminé quelconque (Czabotar et al., 2007).

Les structures des protéines seules ainsi que celles des complexes avec Bim ont été résolues (Czabotar et al., 2007). Dans la figure 11, la structure de la protéine Mcl-1 seule est représentée en jaune et celle du complexe avec Bim en rouge, tandis que la structure de Bcl-xl seule se trouve en vert et celle du complexe avec Bim en bleue. Les structures des protéines seules montrent que Le sillon hydrophobe de Mcl-1 est plus chargé et plus exposé au solvant que celui de Bcl-xl (Czabotar et al., 2007). La poche hydrophobe de Bcl-xl est moins accessible car elle est obstruée par de longues chaînes d'acides aminés telles que le glutamate en position 129 sur l'hélice  $\alpha 4$ , la tyrosine 195 dans la région BH2 et l'arginine conservée 139 dans le domaine BH1 (Chipuk et al., 2010).

Comme le montrent les flèches noires de la figure 11.B, lorsque Mcl-1 interagit avec Bim, son sillon va s'élargir, et la distance entre la valine 253 en C terminale de l'hélice  $\alpha 4$  et l'alanine 227 en N terminale de l'hélice  $\alpha 3$  va passer de 11.2 Å à 15.6 Å, ces résidus sont indiqués en orange.

En interagissant avec Bim, Bcl-xl va s'accommoder au peptide en décalant ses hélices  $\alpha 3$  et  $\alpha 4$  vers la droite, comme l'indiquent les flèches noires de la figure 11.A. Ainsi la leucine 108 de l'hélice  $\alpha 3$ , marquée en bleu cyan sur la figure, est déplacée de 7.2 Å vers la droite. De plus, lorsque

Bcl-xl interagit avec le peptide BH3 de Bim, l'hélice  $\alpha 2$  prend des tours additionnels (q)  $\alpha 2$ qqqqqq et l'hélice  $\alpha 3$  se débobine (voir figure 11.A) (Chipuk et al., 2010).



**Figure 11 : Comparaison de l'effet de Bim sur Bcl-xl et Mcl-1.** Nous observons une superposition des structures des protéines seules (codes PDB : 1R2D, 1WSX), avec celles des complexes avec Bim (codes PDB : 3FDL, 2PK).

Ces études montrent que Bcl-xl et Mcl-1 interagissent différemment avec le peptide Bim, leur sillon hydrophobe adoptant des changements conformationnels différents en contact avec le peptide.

### I.3. Régulation de l'apoptose par TCTP

#### I.3.1. Présentation de TCTP

La protéine TCTP a été identifiée initialement comme un facteur impliqué dans la croissance cellulaire (Thomas and Luther, 1981; Yenofsky et al., 1982) et son nom « Translationally Controlled Tumor Protein » provient du fait qu'elle a été clonée à partir de carcinome mammaire et qu'elle soit régulée au niveau de la traduction (Bohm et al., 1989). Cette protéine possède plusieurs appellations : histamine releasing factor (HRF), fortilin, P21, P23, TPT-1 et Q23, du fait qu'elle soit impliquée dans de nombreux mécanismes de la cellule tels que la prolifération cellulaire, la réponse au stress, la régulation des gènes, la réponse au choc thermique et le cancer (Cans et al., 2003; Gnanasekar et al., 2009; Jung et al., 2004; Liu et al., 2005; MacDonald et al., 2001; Yarm, 2002). Cette protéine a également une fonction extracellulaire qui consiste à relarguer de l'histamine (MacDonald-Jankowski et al., 1995). TCTP s'exprime de façon ubiquitaire dans toutes les cellules et semble être essentielle à leur viabilité.

TCTP étant une protéine multifonctionnelle et régulée à différents niveaux, nous allons décrire dans les paragraphes suivant, le gène codant pour cette protéine et la protéine elle-même : sa structure, sa location, son mode de régulation ainsi que l'ensemble de ces fonctions intra et extracellulaire.

#### Caractérisation du gène *tpt1* codant pour TCTP :

Le gène *tpt1* qui code pour la protéine TCTP est localisé sur le chromosome 13 chez l'homme (Chr. 13q12->q14) et comprend six exons dont cinq codants (MacDonald et al., 1999). Le promoteur de TCTP, d'une longueur d'environ 500bp, contient une TATAbox en position -30 du site de transcription « ATG » ainsi que des sites de liaisons pour des facteurs de transcription comme Sp1, NF1, AP1, c-Ets 1, CP2, MZF1 et d'autres. Il a été montré que le cobalt peut induire la transcription de *tpt1* en se liant à son promoteur (Schmidt et al., 2007). Le gène *tpt1* est transcrit sous deux formes d'ARNm, de tailles différentes, générées par deux sites de polyadénylation AATAAA dans leur partie 3'UTR non traduite (Li et al., 2001). L'ARNm le plus court est le plus abondant au niveau des tissus et possède dans sa partie 5'UTR un poly T suivi d'une région riche en GC, qui est une caractéristique des gènes régulés au niveau transcriptionnel. De plus, l'ARNm de *tpt1* peut adopter une structure secondaire grâce à sa partie riche en GC et interagir avec la protéine PKR (Protein Kinase RNA activated) qui régule TCTP au niveau transcriptionnel (Bommer et al., 2002). Par ailleurs, 15 pseudogènes de TCTP ont été mis en évidence dans le génome humain grâce à des criblages par BLAST, les séquences découvertes présentent 100% d'homologie avec le gène *tpt1* mais ne possèdent pas d'introns (Thiele et al., 2000). Il s'agit de gènes rétrotransposés ou de gènes insérés dans le génome après rétrotranscription.

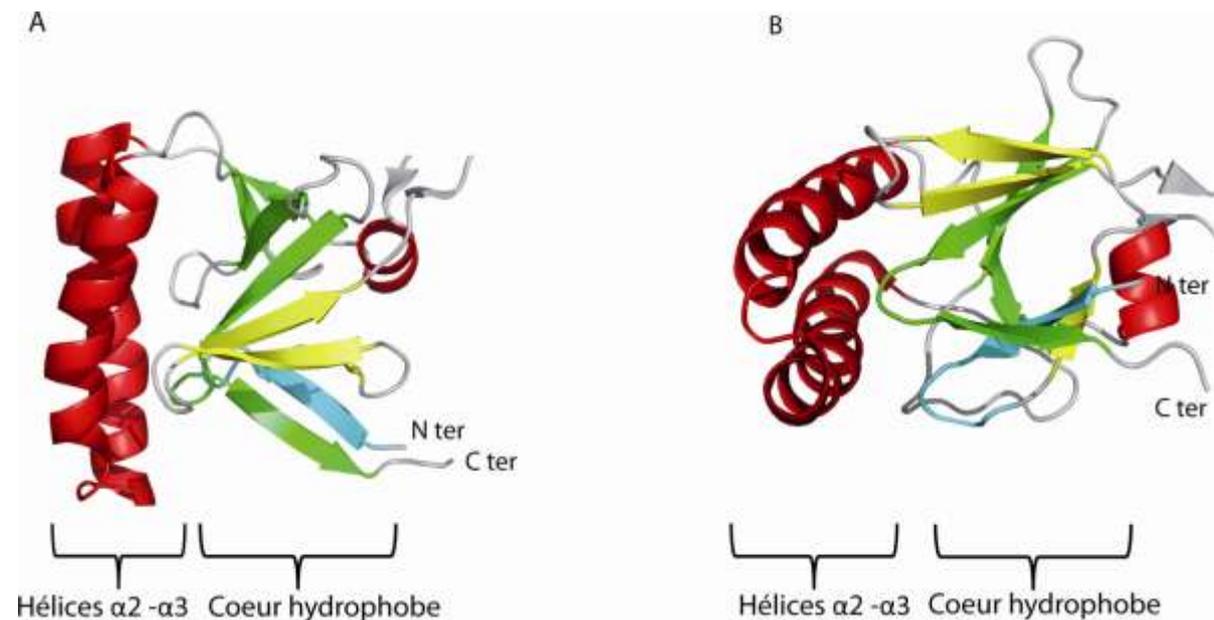
#### Caractérisation de la protéine TCTP :

TCTP est composée de 172 acides aminés pour un poids moléculaire de 20 Kda et un point isoélectrique de 4.9. Cela signifie que dans les tampons physiologiques, TCTP est sous forme basique. La comparaison de la séquence d'acides aminés de TCTP avec les séquences connues dans les banques de protéines n'a révélé aucune homologie avec d'autres familles protéiques. La protéine TCTP est présente dans l'ensemble des eucaryotes allant de l'unicellulaire, levure, plantes et invertébrés aux vertébrés. De plus, deux domaines TCTP-1(47-LIGGNASAEGPEG-59) et TCTP-2 (130-FKNYQFFIGENMNPDGMVALLD-151) communs à toutes les protéines de TCTP sont hautement conservés à travers la phylogénie sur une longue période de l'évolution (Bohm et al., 1989). En effet, il existe environ 86% d'homologie dans la séquence nucléique entre TCTP humain et murin et 96 % d'homologie dans la séquence protéique entre ces deux mêmes espèces (Bohm et al., 1989). Le degré de conservation de la séquence protéique de TCTP entre ces deux organismes est

particulièrement important : 96% alors qu'il est de 72% pour Bcl-2 entre ces deux même espèces (Li et al., 2001). Cette forte conservation appuie l'hypothèse d'une fonction physiologique cellulaire importante.

#### Structure de TCTP :

Les structures de TCTP ont été résolues chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* (1H6Q et 1H7Y), le parasite *Plasmodium knowlesi* (1TXJ) et l'humain (2HR9). Ces structures sont très similaires et nous avons pris la structure de TCTP humain, résolue au laboratoire (Susini et al., 2008), pour les décrire, voir figure 12. Elles présentent toutes un cœur hydrophobe formé principalement de brins  $\beta$ , en vert et en jaune, de deux longues hélices  $\alpha$  en forme d'épingle à cheveux, en rouge, et d'une boucle non structurée, en gris. TCTP est une protéine hydrophile qui présente deux régions acides séparées par une région basique entre les résidus 79 à 123 d'après l'étude de la distribution des résidus en fonction de leur charge. Lorsque les 10 premiers résidus de TCTP, indiqués en bleu dans la figure 12, sont greffés sur des peptides, cela permet leur insertion dans des cellules (Kim et al., 2011).



**Figure 12 : Structure de TCTP suivant deux angles de vue (code PDB : 2HR9).**

#### Localisation de TCTP :

TCTP est une protéine cytoplasmique qui n'est associée à aucun organe de la cellule en particulier. Dans les lignées COS et NIH-3T3, TCTP est colocalisée avec les microtubules en immunofluorescence et chez la levure elle se retrouve au niveau de la mitochondrie en réponse à un signal apoptotique (Gachet et al., 1997; Rinnerthaler et al., 2006). Cette protéine est retrouvée également dans le noyau co-localisée avec Mcl-1 (Zhang et al., 2002).

### Régulation de TCTP :

TCTP est exprimée aussi bien dans les cellules cancéreuses que dans les cellules saines (Li et al., 2001; Thiele et al., 2000), mais est davantage présente dans les cellules tumorales (Tuynder et al., 2002). Le taux d'expression de TCTP varie en fonction du type, de l'état de différenciation (Yan et al., 2000) et de l'activité mitotique de la cellule. TCTP est d'autant plus exprimée que les cellules poursuivent des mitoses (Bohm et al., 1989). D'ailleurs, au cours de la phase exponentielle de croissance de *Saccharomyces Cerevisiae*, TCTP est exprimée à 100 000 copies/cellules en comparaison à l'actine qui n'est exprimée qu'à seulement 60 000 copies/cellule (Norbeck et al., 1997). Ainsi, TCTP est classée parmi les 20 protéines les plus exprimées dans la croissance cellulaire (Thomas and Luther, 1981).

Le taux d'expression de TCTP est régulé à deux niveaux : au cours de la transcription et de la traduction, et fluctue en fonction des signaux extracellulaires que reçoit la cellule, comme des signaux de stress, de croissance, d'apoptose et certaines cytokines.

La régulation transcriptionnelle de TCTP est sensible aux conditions extérieures de la cellule. En effet, chez la levure, sa transcription est inhibée à la suite d'une privation en ammonium ou face à un excès de sel (Bonnet et al., 2000). En revanche, un stress osmotique (sucrose) induit une augmentation de la transcription de TCTP.

La régulation traductionnelle dépend de réserves en ARNm de *tpt1*. Il s'agit d'ARNm non traductibles emprisonnés dans des polysomes qui les libèrent en réponse à des signaux mitotiques. Ainsi, la traduction de TCTP se déroule très rapidement par l'intermédiaire de ces stockages en ARNm (Chitpatima and Brawerman, 1988; Chitpatima et al., 1988; Yenofsky et al., 1983).

TCTP est une protéine multifonctionnelle car elle interagit avec un grand nombre de partenaires impliqués dans des mécanismes cellulaires divers. L'analyse de l'ensemble de ses fonctions permet une meilleure compréhension de son action globale.

### ***Fonction intracellulaire de TCTP :***

#### TCTP et p53 se régulent via une boucle répressive :

Il a été montré que p53 interagit avec un « Response element » présent dans le promoteur de TCTP conduisant à la répression de sa transcription, donc TCTP fait partie d'un petit nombre de protéines réprimées par p53 (Amson et al., 2011). De plus, TCTP stabilise Mdm2 en empêchant son auto-ubiquitination, et promeut ainsi la dégradation de p53. L'activité de Mdm2 est inhibée par NUMB qui rentre en compétition avec TCTP au niveau du complexe p53-MDM2. Par conséquent, NUMB inhibe l'ubiquitination de p53 alors que TCTP la facilite.

### Rôle dans l'homéostasie de la cellule :

TCTP a été décrit comme se liant au calcium avec une faible affinité en impliquant les résidus suivant : l'asparagine 131, la glutamine 132 et l'acide aspartique 150 (Feng et al., 2007). Dans la cellule, une hausse de la concentration cytoplasmique en calcium déclenche une augmentation de l'expression de TCTP au niveau de la transcription et de la traduction. Une concentration trop soutenue en calcium peut engendrer la mort cellulaire par apoptose et nécrose. TCTP jouerait un rôle de tampon en séquestrant les molécules de calcium et en les libérant à la suite de stimuli apoptotiques (Graidist et al., 2007; Trump and Berezsky, 1996).

### Régulation du cycle cellulaire :

TCTP est connu pour se lier de manière dynamique aux  $\mu$ -tubules pendant le cycle cellulaire formant les fuseaux mitotiques. La protéine TCTP reste liée aux  $\mu$ -tubules depuis la phase G1-S-G2 et au début de la phase M jusqu'à la métaphase. Au cours de la transition métaphase-anaphase, TCTP se détache des  $\mu$ -tubules (Gachet et al., 1997). Ce détachement est provoqué par la phosphorylation des résidus 46 et 64 de TCTP par la kinase PLK-1 (Yarm, 2002).

### Synthèse des protéines :

eEF1A et eEF1B $\beta$ , deux protéines impliquées dans l'étape d'élongation de la synthèse des protéines, ont été identifiées comme partenaires de TCTP par double hybride dans la levure en prenant comme appât TCTP (Cans et al., 2003; Langdon et al., 2004). La protéine eEF1A est une protéine G qui recrute les acides aminés chargés sur l'ARNt. Elle est active sous sa forme GTP et se lie à l'ARNt-aminoacyl. Une fois placée sur le ribosome, le GTP s'hydrolyse et eEF1A-GDP est relarguée. L'activité d'eEF1A est restaurée par les facteurs d'échange de guanine (GEF). La protéine eEF1B $\beta$  remplace le GDP par le GTP. Il a été montré que TCTP stabilise la forme GDP de la protéine eEF1A et inhibe l'activité GEF d'eEF1B $\beta$ . TCTP aurait une activité inhibitrice sur la dissociation de GDP(GDI) (Cans et al., 2003; Langdon et al., 2004).

### TCTP et la pompe Na, K-ATPase

TCTP interagit et réprime la pompe Na, K-ATPase, la modulation intracellulaire de l'équilibre ionique par Na, K-ATPase est un mécanisme important par lequel la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose sont régulés (Jung et al., 2004).

### TCTP est vitale pour le développement des embryons :

TCTP est nécessaire à la survie cellulaire au cours de l'embryogenèse de la souris (Susini et al., 2008). Une lignée de souris a été élaborée à partir d'un clone hétérozygote ( $tctp^{\Delta 3-5/+}$ ) qui exprime TCTP délétée des exons 3 à 5 et TCTP entier. Ces souris hétérozygotes  $tctp^{\Delta 3-5/+}$  sont viables et fertiles. En revanche, les accouplements de ces souris ne donnent pas une descendance constituée d'homozygotes  $tctp^{\Delta 3-5/\Delta 3-5}$  viables, indiquant un phénotype récessif létal. Une recherche plus poussée révèle que la plupart des embryons homozygotes  $tctp^{\Delta 3-5/\Delta 3-5}$  meurent *in utero* entre les stades E6.5 et E9.5 et présentent une croissance globale déficiente. Au cours de l'embryogenèse, l'absence de TCTP dans les cellules engendre une croissance déficiente liée à une atténuation de la prolifération cellulaire et à une mort cellulaire surabondante. Bien que les cellules provenant de souris hétérozygotes  $tctp^{\Delta 3-5/+}$  expriment moins de TCTP que les cellules contrôles, elles prolifèrent et répondent au signal apoptotique de la même manière que les cellules contrôles. Cela signifie que les cellules hétérozygotes  $tctp^{\Delta 3-5/+}$  agissent comme des cellules wild-type et que TCTP n'est pas haploinsuffisante.

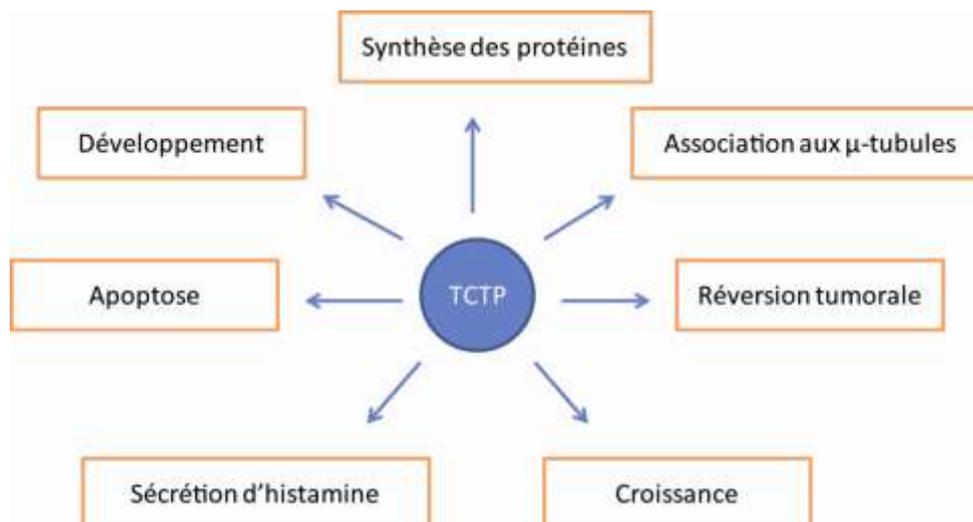
### Régulation de l'apoptose :

TCTP protège également la cellule de l'apoptose. En effet, une élévation du niveau de TCTP dans des cellules exposées à l'étoposide engendre une inhibition de l'apoptose (Li et al., 2001). De même, un abaissement de l'expression de TCTP via des siRNA conduit plus facilement à la mort cellulaire (Zhang et al., 2002). De plus, TCTP se lie à des protéines anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2, comme Mcl-1, Bcl-xl et A1, et augmentent leur potentiel de survie (Liu et al., 2005; Yang et al., 2005). Cette fonction sera étudiée plus précisément dans les paragraphes qui suivent.

### ***Fonction extracellulaire de TCTP :***

TCTP a été identifiée dans le surnageant des cellules tumorales U937 comme étant capable d'induire la sécrétion d'histamine des basophiles, des éosinophiles et des lymphocytes T (MacDonald et al., 1995). Cette protéine permet également la sécrétion des cytokines IL-4, IL-8 et IL-13 de manière IgE dépendante ou non (Bommer and Thiele, 2004; Schroeder et al., 1996). Ainsi, TCTP est impliquée dans les réponses inflammatoires et allergiques. C'est une protéine membranaire de la famille des STEAPs, TSAP6 qui contrôle la sécrétion de TCTP par les exosomes suivant la voie non-classique.

Le schéma de la figure 13 résume l'ensemble des mécanismes dans lesquels est impliqué TCTP.



**Figure 13 : Schéma indiquant les mécanismes dans lesquels est impliqué TCTP.**

Nous pouvons constater que l'ensemble des fonctions de TCTP suggère que cette protéine est un moteur pour la cellule et nécessaire à son bon fonctionnement. Cependant, le mode d'action de TCTP n'est pas encore élucidé et nous ne savons pas si cette protéine agit de la même manière avec tous ces partenaires ou de manière différente avec chacun d'entre eux.

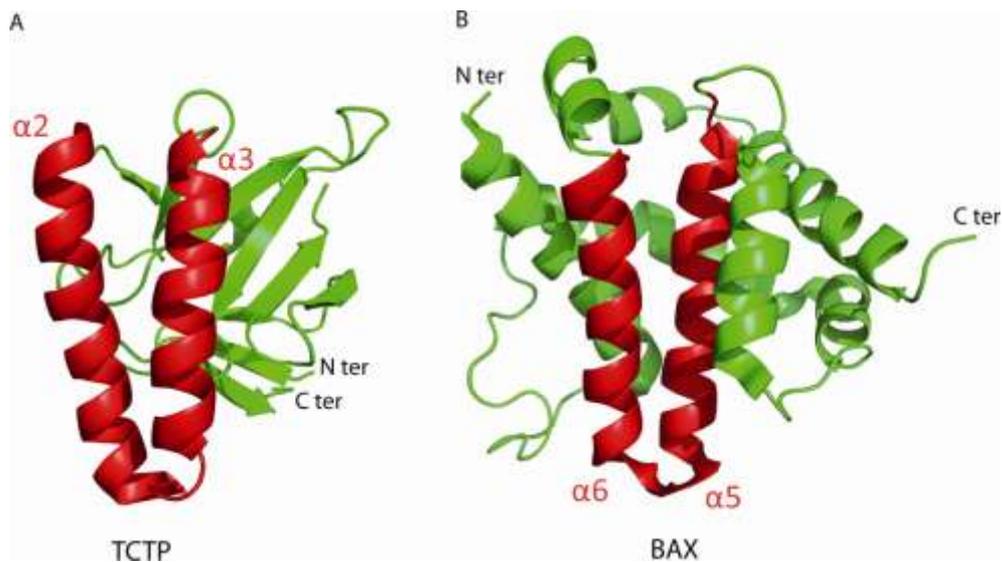
Nous nous sommes ensuite intéressés à son rôle dans l'apoptose.

## **I.3.2. L'action anti-apoptotique de TCTP**

### **I.3.2.1. TCTP s'ancre dans les membranes**

TCTP est un facteur de survie qui présente des effets comparables à d'autres protéines anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2, bien qu'elle n'en fasse pas partie (Li et al., 2001).

Des études structurales ont révélé une forte ressemblance entre les hélices  $\alpha 2$ - $\alpha 3$  de TCTP et les hélices  $\alpha 5$ - $\alpha 6$  des protéines de la famille des Bcl-2, notamment celles de Bax (voir en rouge les hélices de la figure 14), malgré une faible homologie de séquence des acides aminés. Il est intéressant de remarquer qu'au sein de la famille des Bcl-2, ces hélices présentent également peu d'homologie de séquence. Par ailleurs, les mutations K102A et E109A de TCTP, au niveau de la connexion entre les deux hélices, amoindrissent son action anti-apoptotique (Susini et al., 2008). Afin d'évaluer le rôle des hélices de TCTP dans l'apoptose, les hélices  $\alpha 5$ - $\alpha 6$  de Bax ont été remplacées par les hélices  $\alpha 2$ - $\alpha 3$  de TCTP. La protéine chimérique exprimée dans les cellules 293T dévoile une fonction pro-apoptotique comparable à celle de Bax wild type. De plus, les mêmes mutations entre les hélices  $\alpha 2$ - $\alpha 3$  de TCTP dans la protéine chimérique affaiblissent son action dans l'apoptose. Cela signifie que les hélices de TCTP et de Bax ont un rôle similaire dans les membranes.



**Figure 14 : Structures de TCTP et de Bax, mettant en avant les hélices similaires en rouge (codes PDB : 2HR9 et 1F16).**

Des expériences réalisées sur des mitochondries isolées montrent que TCTP s'ancre dans la paroi mitochondriale, inhibe l'action de Bax et que le double mutant K102A et E109A de TCTP peut s'insérer dans la membrane. Dans le but de voir si TCTP et Bax interagissent ensemble, des GST-IVT pull down et des co-immunoprécipitations ont été menés avec les protéines endogènes et surexprimées. Les résultats montrent clairement qu'il n'y a pas d'interaction entre TCTP et Bax, et que la modulation de l'activité de Bax par TCTP se produit de manière indirecte.

Par ailleurs, il a été montré que TCTP inhibe la formation de dimère de Bax dans la mitochondrie, contrairement au double mutant de TCTP. Par conséquent, les mutations K102A et E109A de TCTP n'ont pas d'impact sur l'insertion de TCTP dans la mitochondrie mais plutôt sur le processus de dimérisation de Bax dans la membrane (Susini et al., 2008).

### **1.3.2.2. TCTP stabilise Mcl-1**

L'interaction entre TCTP et Mcl-1 a été mise en évidence par double hybride chez la levure, en prenant comme appât Mcl-1. Les clones de TCTP isolés par cette méthode correspondent aux parties : 5-172, 11-172 et 14-94. Pour valider cette interaction, des « GST pull-down » ont été effectués avec des protéines marquées à la méthionine [ $^{35}\text{S}$ ] et synthétisées dans un système de transcription-traduction *in vitro*. Les résultats soulignent que Mcl-1 a une affinité pour GST-TCTP $\Delta$ 10 (TCTP sans ses dix premiers acides aminés), mais pas pour GST-TCTP entier. Inversement, cette affinité est retrouvée entre GST-Mcl-1 et TCTP $\Delta$ 10. Des co-immunoprécipitations *in vivo* dans des cellules CHOP et COS-7, transfectées avec des vecteurs de TCTP et de Mcl-1 montrent une interaction entre les protéines entières (Liu et al., 2005; Zhang et al., 2002).

Des études d'immunocolocalisation ont été menées dans des cellules NIH 3T3 avec les protéines endogènes, et dans les cellules U2OS avec les protéines surexprimées (Liu et al., 2005; Zhang et al., 2002). Dans le premier cas, Mcl-1 se trouve principalement dans le cytoplasme et partiellement colocalisée avec TCTP tandis que dans le deuxième cas, TCTP et Mcl-1 se situent au niveau du nucléoplasme. Il est donc difficile de conclure quant à leur colocalisation.

Lorsque les siRNA-Mcl-1 sont transfectés dans des cellules U2OS, où les protéines sont surexprimées, l'expression de TCTP est fortement diminuée. Des expériences en RT-PCR montrent qu'il ne s'agit pas d'une diminution du niveau d'ARN messager de TCTP mais plutôt d'un abaissement de la quantité de protéines en TCTP. En revanche, lorsque les cellules U2OS sont transfectées avec des siRNA-TCTP, le taux de Mcl-1 reste inchangé (Zhang et al., 2002). Ces tests montrent que Mcl-1 stabilise TCTP mais que l'inverse n'est pas constaté.

Cependant, ces mêmes expériences ont été réalisées en présence de cycloheximide, et lorsque le niveau de TCTP est atténué avec des siRNA dans des cellules HeLa, la durée de demi-vie de Mcl-1 décroît de 1,5 heure à 45 minutes. Par conséquent, un abaissement de l'expression de TCTP déstabilise Mcl-1. De plus, cet effet n'est pas observé pour d'autres protéines comme Bax et Bcl-2 qui ne dépendent pas de TCTP (Liu et al., 2005).

Des expériences sont réalisées afin d'évaluer l'effet d'une surexpression de TCTP sur Mcl-1. Des lignées stables Ba/F3/Mcl-1 surexprimant Mcl-1 ont été mises en place. Lorsque ces cellules sont transfectées avec du plasmide FLAG-TCTP, l'expression de Mcl-1 est intensifiée par rapport aux cellules transfectées avec un vecteur vide. Par ailleurs, ces cellules transfectées avec du FLAG-TCTP affichent un taux de survie supérieure aux cellules transfectées avec un vecteur vide. Ces observations soutiennent l'idée que TCTP renforce l'action anti-apoptotique de Mcl-1. L'inverse n'a pas été observé, le taux de TCTP demeure inchangé lorsque la quantité en plasmide de Mcl-1 augmente dans les cellules (Liu et al., 2005). L'élévation de la quantité de Mcl-1 en réponse à une augmentation en plasmide de TCTP dans les cellules s'explique, soit par une recrudescence de la synthèse protéique de Mcl-1, soit par une inhibition de la dégradation protéique, soit par les deux.

De façon à évaluer l'influence de TCTP sur la synthèse protéique de Mcl-1, le taux de synthèse de Mcl-1 a été suivi, grâce au marquage à la méthionine [<sup>35</sup>S], dans les cellules Ba/F3/Mcl-1 surexprimant TCTP et dans les cellules Ba/F3/Mcl-1 seules. Le taux de synthèse entre ces deux lignées est identique par conséquent TCTP n'influe pas à ce niveau-là. Des tests à partir de cycloheximide, molécule bloquant la synthèse protéique, signalent que TCTP rallonge la durée de demi-vie de Mcl-1 de 1,5 heure à 4,5 heures. Ainsi, TCTP renforce la stabilité de Mcl-1 en limitant sa dégradation par le protéasome.

TCTP est connue pour interagir avec Mcl-1 et A1, deux protéines similaires qui se comportent différemment des autres membres de la famille des Bcl-2. A la suite d'un alignement de séquence entre A1, Mcl-1 et les autres membres des Bcl-2, des résidus spécifiques à A1 et Mcl-1 sont mis en évidence. Plusieurs mutations de ces acides aminés ont été étudiées, mais une seule s'est avérée intéressante : K257V. La valine a été choisie pour substituer la lysine car elle est retrouvée dans cette position-là dans Bcl-2. Le mutant K257V de Mcl-1 décroît fortement son affinité pour TCTP en gardant celle pour Bim et Bax, contrairement au mutant K260V qui ne modifie pas le champ d'action de Mcl-1. Comme le mutant K257V reste fonctionnelle, la mutation n'altère pas la conformation globale de Mcl-1. Par ailleurs, le taux de demi-vie de Mcl-1 K257V est nettement inférieur (40 min) à celui de Mcl-1 FL et de Mcl-1 K260V (1,5 heure). Il y a donc une forte corrélation entre la stabilité de Mcl-1 et sa capacité à se lier à TCTP. De même, son rôle anti-apoptotique est lié à son aptitude à interagir avec TCTP (Liu et al., 2005).

D'autres manipulations ont dévoilé l'importance du rôle de l'arginine en position 21 de TCTP dans l'interaction avec Mcl-1. En co-immunoprécipitation *in vivo* dans les cellules COS-7, le mutant R21A de TCTP ne retient pas Mcl-1. De plus, cette protéine mutée se dégrade plus facilement dans les cellules U2OS que la protéine normale (Zhang et al., 2002). Il existe alors une corrélation entre la stabilité de TCTP et l'interaction entre TCTP et Mcl-1. Peut-être que Mcl-1 jouerait le rôle de chaperonne de TCTP.

D'après le modèle de Zhang, Mcl-1 pourrait être une chaperonne de TCTP. Or, la durée de demi-vie de TCTP dans les cellules est de 6 heures tandis que celle de Mcl-1 est d'environ 1 heure. La cellule devrait produire constamment du Mcl-1 pour stabiliser TCTP, ce qui représente une forte perte d'énergie. Réciproquement, TCTP pourrait jouer le rôle de chaperonne de Mcl-1, en contribuant à la maturation et à la fonctionnalité de Mcl-1.

Le modèle qui pourrait concilier les deux articles serait de considérer TCTP comme un cofacteur de Mcl-1. Dans ce cas, Mcl-1 accomplirait sa fonction biologique seulement en association avec TCTP. Ainsi, ces protéines, en interagissant ensemble, se stabiliseraient mutuellement. L'interaction entre TCTP et Mcl-1 permettrait de cacher les sites d'ubiquitination de Mcl-1, et ainsi de la protéger de la dégradation. D'après les expériences de Zhang, le mutant R21A de TCTP incapable de se lier à Mcl-1, est plus vite dégradé que la protéine native, donc Mcl-1 pourrait également protéger TCTP de la dégradation. L'appréhension de cette interaction est loin d'être complète, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour éclaircir le mode d'action de ces protéines.

### I.3.2.3. TCTP interagit avec Bcl-xl

L'interaction entre TCTP et Bcl-xl a été mise en évidence par double hybride dans la levure en prenant comme appât la protéine entière murine Bcl-xl (Yang et al., 2005). Dans le but de vérifier si l'interaction est directe, des GST-pull downs ont été réalisés avec des protéines marquées au [<sup>35</sup>S] avec un système *in vitro* de transcription et traduction (TNT). Ces expériences ont été réalisées en tirant sur GST-TCTP, GST-Bcl-xl et GST. Dans les deux premiers cas, le partenaire est récupéré, contrairement à GST seule. Ces résultats soulignent le caractère spécifique et direct de l'interaction. De même, des expériences en co-immunoprécipitation montrent que TCTP se lie à Bcl-x, que ce soit en tirant avec des anticorps anti-TCTP ou anti-Bcl-xl. Des expériences en immunofluorescence dans des cellules HeLa font ressortir que TCTP et Bcl-xl sont partiellement colocalisées aussi bien dans le cytosol que dans la mitochondrie.

De façon à déterminer les zones d'interactions entre TCTP et Bcl-xl, des mutants contenant des délétions de TCTP ont été mis au point : TCTP 1-50 AA, TCTP 40-172 AA et TCTP 1-150 AA, sachant que TCTP possède 172 résidus. Les tests montrent que Bcl-xl se lie aux mutants TCTP 1-50 AA et TCTP 1-150 AA mais pas au mutant TCTP 40-172 AA. Ainsi, la zone d'interaction se situe dans la partie N terminale de TCTP entre les résidus 1 à 40. Des recherches supplémentaires sur la région N terminale de TCTP dégagent une séquence (<sub>20</sub>IREIADGL<sub>27</sub>) hautement conservée parmi la souris, le lièvre et l'humain. Les acides aminés Ile<sub>20</sub>, Arg<sub>21</sub>, Glu<sub>22</sub> et Asp<sub>25</sub> ont été mutés en Alanine pour casser les interactions avec Bcl-xl, sans perturber la structure globale de TCTP (Shangary and Johnson, 2002, Gibbs and Zoller, 1991). Le mutant contenant ces quatre substitutions est appelé TCTP<sub>N ter mutants</sub>. Des GST pull down montrent que GST- TCTP<sub>N ter mutants</sub> ne précipite pas Bcl-xl contrairement à GST-TCTP wild type. De plus, GST- TCTP<sub>N ter mutants</sub> précipite la β-tubulin, donc il s'agit bien d'une protéine correctement repliée. Par conséquent, la partie N terminale de TCTP est impliquée dans l'interaction entre TCTP et Bcl-xl. En outre, TCTP WT et TCTP<sub>N ter mutants</sub> ont été transfectées dans des cellules HeLa et Jurkat T de façon à étudier l'influence de la région N terminale dans la fonction de TCTP au cours de l'apoptose. Dans des cellules induites au Taxol et à l'étoposide, deux agents apoptotiques, TCTP WT inhibe l'apoptose tandis que TCTP<sub>N ter mutants</sub> n'y parvient pas. Cela souligne le rôle crucial de la partie N terminale dans la fonction anti-apoptotique de TCTP qui est corrélé à l'interaction avec Bcl-xl (Yang et al., 2005).

D'autres GST pull down montrent que GST-Bcl-xl et GST-Bcl-xly, un isoforme de Bcl-xl dépourvue de sa partie transmembranaire, retiennent TCTP par conséquent la partie C terminale n'est pas impliquée dans l'interaction. Ensuite, des tests d'interactions mettent en avant que les

peptides du domaine BH3 de Bcl-xl interagissent avec TCTP, et que la leucine 90 et l'aspartate 95 de Bcl-xl sont impliquées dans l'interaction.



## II. Matériel et Méthode

### II.1. Génération des vecteurs d'expression

Les gènes de TCTP et de Mcl-1 étaient présents au laboratoire, par contre les gènes qui codent pour Bax et Bcl-xl ont été achetés auprès de la banque Plasmid (Harvard Medical School) avec les références respectives : HsCD00331673 et HsCD00004711.

#### II.1.1. Clonage par restriction/ligation

##### II.1.1.1. Construction des amorces

Les amorces sont construites de telle manière que la somme des températures d'hybridation des acides nucléiques soit égale à 60°C, où la thymine et l'adénine comptent pour 2 °C et la guanine et la cytosine pour 4°C. Ensuite, des acides nucléiques correspondant aux sites des enzymes de restriction sont agrémentés en 3' des amorces, le site de NdeI pour l'amorce sens et le site de BamHI ou BglII pour l'amorce anti-sens. Afin de faciliter par la suite la digestion des sites de restrictions des produits PCR formés par ces amorces, plusieurs nucléotides sont rajoutés en 3', se référer au tableau 1 ou au site de New England Biolabs.

Enzyme	Séquence des oligos	% séquence digérée 2h	% séquence digérée 20h
NdeI	GGGTTT <i>CATATG</i> AAAACCC	0	0
	GGAATTC <i>CATATG</i> GGAATTC	75	>90
BamHI	<i>CGGATCCG</i>	10	25
	CG <i>GGATCCCG</i>	>90	>90
BglII	<i>CAGATCTG</i>	0	0
	GA <i>AGATCTTC</i>	75	>90

**Tableau 1 : Tableau illustrant l'influence des nucléotides rajoutés aux sites de restriction sur la digestion du site.**

Dans le tableau 1, les séquences des sites de restriction des enzymes se trouvent en rouge italique. Ces données montrent qu'en fonction des acides aminés rajoutés aux sites de restriction, la digestion est plus ou moins efficace.

Lorsque des mutations ponctuelles ou des délétions sont mises au point, il suffit de créer des amorces prenant en compte la mutation, et ajouter de part et d'autre de celle-ci des acides nucléiques dont la température d'hybridation globale soit égale à 30°C.

##### II.1.1.2. Réaction de polymérisation en chaîne

La réaction de PCR va permettre d'obtenir de grandes quantités d'un fragment d'ADN contenant le gène d'intérêt. Elle est réalisée par une enzyme polymérase, l'ADN polymérase, qui va catalyser l'ajout de désoxyribonucléotides (dNTP) à l'extrémité 5' d'une amorce par complémentarité

à la matrice. Les amorces utilisées vont permettre d'introduire aux extrémités du fragment amplifié : un codon initiateur ATG en 5', un codon stop en 3' ainsi que des séquences reconnues spécifiquement par des enzymes de restriction aux deux extrémités du fragment. Les réactions ont été réalisées avec l'enzyme Phusion car elle introduit très peu d'erreurs. Les conditions de la réaction de PCR sont présentées dans le tableau 2 ci-dessous.

Composés	Volume réactionnel de 50µL
Matrice (50ng/µL)	0,5µL
Amorces sens et anti-sens	0,5µL de chaque
Tampon de l'enzyme Phusion (5x)	10µL
Déoxyribonucléotides (dNTP) (2mM)	5µL
DMSO	3,5µL
Phusion 5U/µL	0,5µL
Eau milliQ	qsp. 50µL

Tableau 2 : Mélange réactionnel de la PCR avec la Phusion.

La PCR se déroule suivant les étapes indiquées dans le tableau 3 ci-dessous.

Cycle	Explications	Conditions	
Dénaturation	Ouverture complète des matrices doubles brins	1 min, 95°C	
40 cycles	Dénaturation	Dissociation des brins synthétisés de la matrice	10 secondes, 95°C
	Hybridation	Hybridation des amorces sens et anti-sens à la matrice	10 secondes, entre 55 et 58°C, en fonction des amorces
	Elongation	Synthèse du brin d'ADN complémentaire à la matrice	Temps dépend de la longueur du brin à synthétiser : 15 secondes/1000 nt, 72°C
Elongation finale	L'enzyme complète les fragments	10 minutes, 72°C	
Conservation finale	L'échantillon est conservé	Temps infini, 4°C	

Tableau 3 : Cycles de la réaction PCR

Le produit de la réaction est ensuite déposé sur un gel d'agarose, les bandes correspondantes au produit de l'amplification sont découpées et les fragments sont extraits du gel à l'aide du kit Nucleospin® Extract II (Macherey Nagel) avec un volume d'élution de 27µL. Dans le cas de la PCR du gène de Mcl-1, le DMSO est un composé crucial pour obtenir une bande uniforme du produit PCR sur gel d'agarose.

### II.1.1.3. Digestion du fragment PCR

Pour l'insertion de fragments d'ADN dans les vecteurs d'expression, les produits de la réaction PCR sont digérés avec les enzymes de restriction, NdeI et BamHI ou BglII, et purifiés sur les colonnes Nucleospin® Extract II (Macherey Nagel) afin d'éliminer le tampon de l'enzyme de restriction. Parallèlement, le vecteur est digéré avec NdeI et BamHI, déphosphorylé avec la phosphatase SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, Fermentas), pour éviter qu'il ne se recircularise, et

également purifié sur gel. Les conditions de digestion des produits PCR et du vecteur sont indiquées dans le tableau 4 ci-dessous.

Composés	Produit PCR (Volume total 31µL)	Vecteur (Volume total 30µL)
Produit PCR/Vecteur	27µL (volume d'éluion)	1à 1,5 µg
Tampon NE Buffer 3	3µL	3µL
Enzymes de restriction	1µL de chaque	1,5µL de chaque
BSA (100x)	---	0,3µL
Eau milliQ	---	qsp. 30µL
SAP	---	0,7 µL (au bout d'1h30)

**Tableau 4 : Mélange réactionnel de digestion du produit PCR et du vecteur.**

Contrairement à BamHI qui est très robuste, l'enzyme de restriction NdeI possède une durée de demi-vie d'une demie heure, il est donc important de la renouveler régulièrement.

#### II.1.1.4. Ligation du fragment PCR

Une réaction de ligation est ensuite réalisée avec la T4 DNA ligase (Epicentre) entre l'insert et le vecteur ouvert en respectant un ratio molaire de 5 : 1 (insert : vecteur). Les conditions de ligation sont montrées dans le tableau 5 ci-dessous.

Composés	Ligation (Volume total 10µL)
Insert	5µL
Vecteur	0,5µL
Tampon de ligation	1 µL
T4 ligase	0,5µL
Eau milliQ	3µL

**Tableau 5 : Mélange réactionnel d'une ligation.**

Le produit de ligation est transformé au bout de deux à douze heures dans des cellules DH5α. Tout d'abord, 48µL de bactéries sont incubés avec 3µL à 5µL de produit de ligation pendant 20 minutes dans la glace, puis la transformation se fait par choc thermique pendant 45 secondes à 42°C dans un bain marie. Ensuite, les bactéries sont remises dans la glace pour quelques minutes avant d'être incubées avec 300µL de milieu 2LB, sans antibiotique, à 37°C pendant une heure. Les bactéries sont ensuite étalées sur boîte agar contenant les antibiotiques (dilués au 1000<sup>ème</sup>) nécessaires à la sélection des bactéries ayant intégré le plasmide et le lendemain les clones sont isolés.

#### II.1.1.5. Vérification de l'insertion

Différentes techniques sont employées afin de vérifier la présence de l'insert cloné dans le vecteur avant le séquençage du vecteur. Tout d'abord, une réaction de PCR sur colonies peut être effectuée, qui consiste à réaliser une réaction de PCR sur la culture bactérienne liquide avec des amorces spécifiques au gène, l'enzyme Taq de *Thermus thermophilus* étant utilisée. Au cours de cette réaction, le premier cycle de dénaturation va durer 3 minutes afin de casser les parois

bactériennes, la totalité de l'ADN bactérien (génomique et plasmidique) servant alors de matrice. Ainsi, si le gène d'intérêt est présent dans le vecteur il va être amplifié et sera détecté sur gel d'agarose.

Composés	Volume réactionnel de 20 $\mu$ L
Matrice	1 à 2 $\mu$ L
Amorces sens et anti-sens	0,25 $\mu$ L de chaque
Tampon de l'enzyme Phusion (10x)	2 $\mu$ L
Déoxyribonucléotides (dNTP) (2mM)	2 $\mu$ L
DMSO	1,4 $\mu$ L
Taq	0,25 $\mu$ L
Eau milliQ	qsp. 20 $\mu$ L

**Tableau 6 : Mélange réactionnel de la PCR avec la Taq.**

La PCR se déroule en trois étapes : dénaturation de l'ADN pendant 3 min à 95°C, amplification des brins synthétisés suivant 40 cycles de 30s à 95°C, 30 s à 55°C et 1 minute à 72°C (1minute/1000nt), et conservation de l'échantillon à 4°C.

De plus, après purification du plasmide, les enzymes dont les sites de reconnaissances ont été placés en 5' et 3' du gène peuvent être utilisées afin de digérer le vecteur. Le dépôt sur gel d'agarose permettra alors de vérifier la présence d'un insert de bonne taille.

#### **II.1.1.6. Les vecteurs utilisés**

La majorité des vecteurs d'expression que nous avons utilisés vont notamment permettre d'introduire en amont du gène de la protéine (i) un site de fixation de la polymérase T7 qui va transcrire le gène, (ii) un site de fixation des ribosomes (*rbs*, « Ribosome Binding Site ») qui vont traduire l'ARN messenger produit au cours de la transcription et, en fonction des besoins, (iii) une séquence codant pour une étiquette de purification et d'un site de coupure par une protéase qui permettra la purification par chromatographie d'affinité de la protéine. En aval du gène des codons Stops et un terminateur sont placés qui permettent l'arrêt de la traduction et de la transcription respectivement.

Les vecteurs utilisés font partie de la suite de vecteurs construits par le Dr. Romier (site web en annexe). Cette suite de vecteurs permet de tester différentes étiquettes de purifications placées soit à l'extrémité amino-terminale, soit à l'extrémité carboxy-terminale de la protéine ainsi que des sites de coupure par des protéases différents (Tableau 10). Elle permet également la réalisation de tests de co-expression (décrits dans le paragraphe II.3.2.2), puisque certains de ces vecteurs permettent l'expression de protéines natives, c'est-à-dire ne portant pas d'étiquette de purification et que chacun de ces vecteurs porte des gènes de résistance à un antibiotique et des origines de répliation différentes.

## II.1.2. Clonage par recombinaison homologue

La technologie Gateway<sup>®</sup> est une technique de clonage basée sur les propriétés de recombinaison du bactériophage  $\lambda$  (Landy, 1989). La recombinaison du bactériophage  $\lambda$  lui permet d'intégrer son génome dans le chromosome d'*E.coli* grâce à des sites d'attachement spécifique, *att*, qui se trouvent sur le chromosome d'*E.coli* (*attB*) et sur le bactériophage  $\lambda$  (*attP*). Dès l'intégration du bactériophage, la recombinaison se fait entre les sites *attB* et *attP* pour donner les sites *attL* et *attR*.

Le système Gateway<sup>®</sup> comporte deux réactions : la BP et la LR.

La réaction BP catalyse l'échange entre les sites *attB* du produit de PCR (amplicon), avec les sites *attP* du vecteur donneur (pDONR207). C'est une réaction directionnelle car *attB1* s'échange avec *attP1* et *attB2* avec *attP2*. La réaction catalysée par les réactifs BP, contenant la BP clonase, permet d'obtenir le vecteur d'entrée, qui contient le gène d'intérêt flanqué des sites *attL*, voir figure 15.

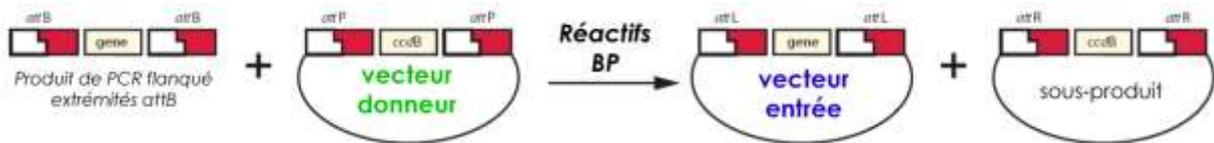


Figure 15 : La réaction de recombinaison BP (Invitrogen).

Le vecteur d'entrée permet désormais de transférer le gène dans n'importe quel type de vecteur destination contenant les sites *attR*. Des vecteurs commerciaux ou « fait-maison » au laboratoire, sont disponibles et permettent de créer énormément de combinaisons différentes de vecteurs d'expression (différents hôtes d'expression, fusion d'étiquettes pour la purification, site de coupure protéase spécifique). Cette étape est appelée réaction LR car elle permet l'échange des bornes *attL* du vecteur d'entrée avec les bornes *attR* du vecteur destination (figure 16).

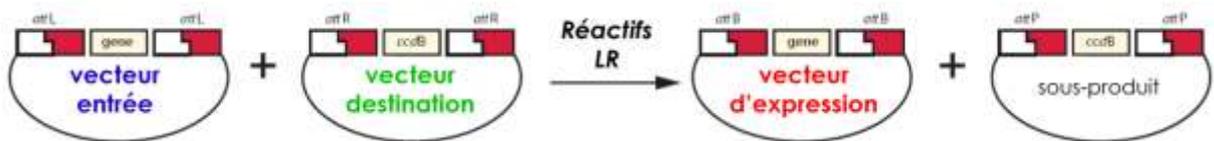


Figure 16 : La réaction de recombinaison LR (Invitrogen).

La présence du gène *ccdB* permet une sélection négative des vecteurs donneur et destination dans *E.Coli* après la recombinaison et la transformation. Les cellules qui reçoivent un vecteur ayant le gène *ccdB* sont incapables de se multiplier, ce qui permet d'obtenir le clone d'intérêt avec une grande efficacité. Les protocoles des réactions de BP et de LR sont disponibles en annexe (annexe 3).

### II.1.3. Tableau des constructions élaborées

Pour les minitests de co-expression une multitude de constructions ont été élaborées et se trouvent en annexe (annexes 4 et 5). Les constructions les plus couramment utilisées, notamment pour la co-purification, sont décrites dans le tableau 7.

Protéine	Vecteur	Méthode d'obtention	Sites de restrictions	Etiquette	Enzyme
TCTP	pGGWA	gateway	Pas de sites	GST (N ter)	Tev
TCTP $\Delta$ loop	pGex	Restriction/ligation	NdeI/BamHI	GST (N ter)	Thrombine
CMcl-1	pnea-vHM	Restriction/ligation	NdeI/BamHI	His-MBP (N ter)	Tev
Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM	pnea-tH	Restriction/ligation	NdeI/BamHI	His (N ter)	Thrombine
Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM	pnea-tH	Restriction/ligation	NdeI/BamHI	His (N ter)	Thrombine
Bcl-xl $\Delta$ TM	pnea-tH	Restriction/ligation	NdeI/BamHI	His (N ter)	Thrombine

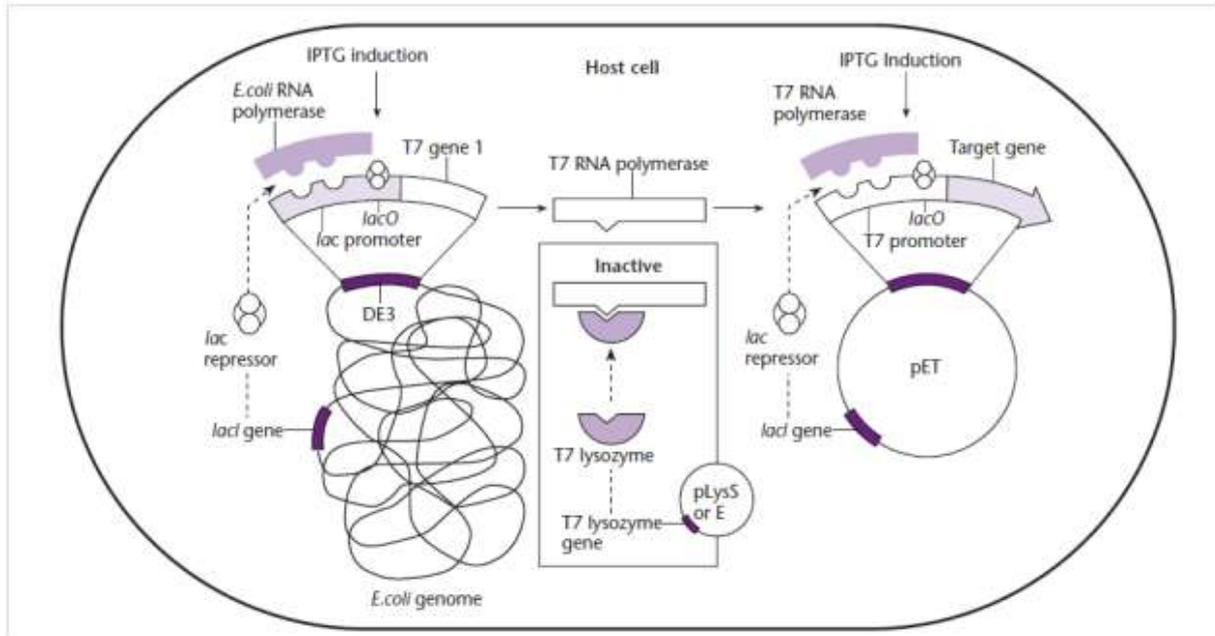
Tableau 7 : Ensemble des constructions les plus fréquemment utilisées.

L'ensemble des cartes de ces vecteurs sont présentées dans l'annexe 6.

## II.2. Expression des protéines

### II.2.1. Dans les bactéries

Les vecteurs d'expression de la suite du Dr. Romier sont basés sur le système d'expression pET, construit par William Studier (Studier et al., 1990) et développé depuis par Novagen®. Ce système permet un double niveau de régulation lors de la production de la protéine d'intérêt, basé sur la régulation par l'opéron lactose (figure 17). Ainsi, deux fragments d'ADN ont été insérés dans le génome des bactéries : le segment DE3 du phage  $\lambda$  (les bactéries sont dites lysogènes) ainsi que le gène codant pour l'inhibiteur LacI. Le segment DE3 du phage  $\lambda$  a été inséré dans le gène *int* de la bactérie qui code pour une intégrase, empêchant ce segment de se recirculariser en l'absence d'un plasmide helper. Le segment DE3 du phage  $\lambda$  contient le gène qui code pour la polymérase T7, placé sous la dépendance d'un promoteur LacUV5 inductible par ajout de lactose ou de son analogue non hydrolysable l'isopropyl  $\beta$ -D-1- thiogalactopyranoside (IPTG).



**Figure 17 : Le système d'expression bactérien pET (Novagen).**

En condition de croissance bactérienne, le répresseur LacI est transcrit par la polymérase bactérienne, bloquant la production de la polymérase T7 et par conséquent la transcription du gène présent dans le vecteur. Au moment de l'induction, l'ajout de lactose ou d'IPTG, va induire un changement de conformation de l'inhibiteur LacI qui ne pourra plus se fixer sur le promoteur LacUV5, permettant la production de la polymérase T7 et par conséquent de la protéine d'intérêt. De plus, le même type de répression s'applique en aval du promoteur présent sur le vecteur d'expression permettant également une régulation directe de l'expression de la protéine d'intérêt. Ce système d'expression permet ainsi une répression de l'expression de la protéine, ce qui est surtout nécessaire lors de l'expression de protéines toxiques. Ce système de répression n'est cependant pas complet puisqu'un faible taux d'ARN polymérase T7 (niveau basal) est détecté en l'absence d'IPTG.

Au laboratoire nous avons eu recours à la souche BL21(DE3) pRARE2 qui contient un plasmide pRARE2 codant pour les ARN de transferts rares chez la bactérie. En effet la fréquence d'utilisation des codons chez les bactéries est différente de celle des autres organismes et, par conséquent, les ARN de transfert complémentaires à ces codons sont également moins présents. L'utilisation du vecteur pRARE2 va parfois permettre l'expression ou la solubilisation de protéines dont les gènes contiennent un fort taux de ces codons rares, et notamment dans le cas de l'expression de protéines eucaryotes.

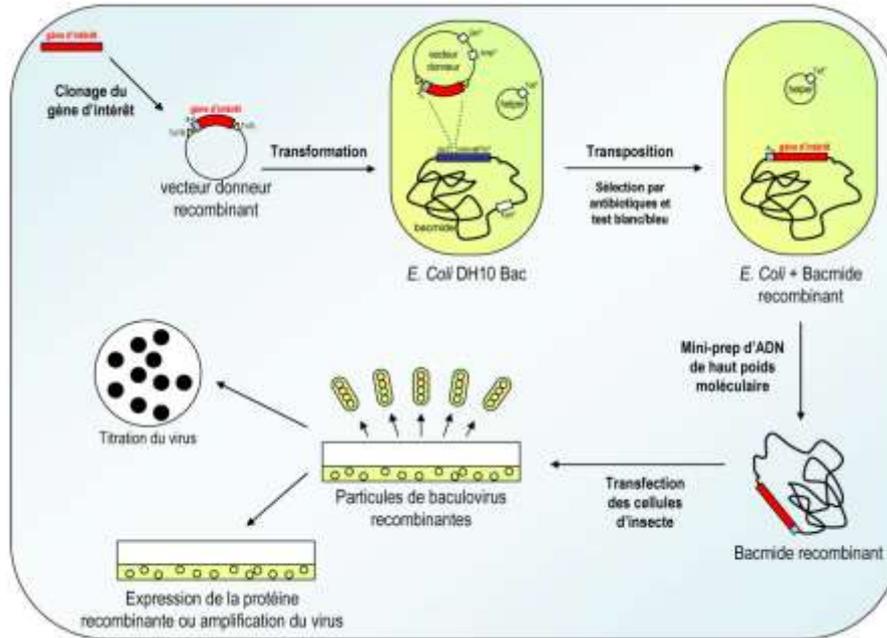
## II.2.2. Dans les cellules d'insectes

Chez E. coli les protéines eucaryotes peuvent être mal exprimées voire insolubles, ce qui est dû à l'absence de certaines modifications post-traductionnelles propres aux cellules eucaryotes ou au manque de protéines chaperonnes eucaryotes, dont le rôle est de replier correctement certaines protéines après leur synthèse. Ce problème peut-être résolu en utilisant le système d'expression eucaryote en cellules d'insectes infectées par un baculovirus. Le baculovirus utilisé pour infecter les cellules d'insectes est l'AcNPV (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) isolé des larves d'Autographa californica (insectes lépidoptère). La stratégie consiste à utiliser le promoteur fort de la polyhédrine (PolH), une protéine fortement exprimée non essentielle à la réplication du virus, pour produire une autre protéine.

Le gène d'intérêt est inséré dans un vecteur de transfert contenant des séquences virales permettant la recombinaison dans le génome viral. Une première méthode consiste à co-transfecter les cellules d'insectes avec le vecteur de transfert et l'ADN de baculovirus sauvage. Une recombinaison entre les régions homologues du plasmide et du génome viral peut s'effectuer permettant l'obtention d'un virus recombinant portant le gène à exprimer. Le virus purifié est utilisé pour infecter en masse des cellules d'insectes (cellules de Spodoptera frugiperda ou cellules Sf9) et produire la protéine d'intérêt. L'insertion du gène dans le génome viral peut également être réalisée dans la bactérie par un système appelé Bac to Bac<sup>®</sup>, qui a été utilisé au cours de ce travail, le génome viral est alors appelé Bacmide.

### Génération des Bacmides grâce au système Bac to Bac<sup>®</sup> :

Tout d'abord, le vecteur donneur recombinant est transfecté dans des bactéries DH10Bac dans lesquelles la réaction de transposition va être réalisée (figure 18). Ces bactéries contiennent le génome du virus qui porte une résistance à la gentamycine et un plasmide helper qui porte une résistance à la kanamycine. Le plasmide helper code pour une transposase qui va réaliser la réaction de transposition entre le vecteur et le génome viral, un gène LacZ placé en aval du promoteur PolH dans le génome viral permet une sélection blanc/bleu des bactéries dans lesquelles la réaction a eu lieu.



**Figure 18 : Expression de protéines recombinantes en cellules d'insecte en utilisant la méthode Bac toBac®.**

La présence du gène d'intérêt dans le génome est confirmée par PCR et les bacmides sont extraits des bactéries blanches par extraction à l'isopropanol 100% suivi d'un lavage à l'éthanol. Le bacmide est alors fourni à la plateforme baculovirus de l'IGBMC, où il sera utilisé pour transformer des cellules Sf9 afin de générer les premiers virus qui seront par la suite utilisés pour produire les protéines.

### II.3. Minitests d'expression

Les tests d'expression vont permettre de répondre à différentes questions tout au long du processus de détermination des conditions d'expression et de purification d'une protéine. Ils vont ainsi permettre (i) d'identifier si une protéine est soluble et quel tampon favorise sa solubilité et (ii) dans le cas de la co-expression d'identifier rapidement les zones d'interaction de chaque protéine. Ces tests d'expression, pouvant être réalisés aussi bien chez la bactérie que dans des cellules d'insecte, consistent en la réalisation de mini-purifications sur une résine d'affinité. Les protéines liées à la résine sont détachées par l'ajout direct de tampon de charge pour gel d'acrylamide dénaturant et déposées directement sur gel SDS-PAGE. Les tests effectués au cours de cette thèse ont principalement été réalisés chez la bactérie.

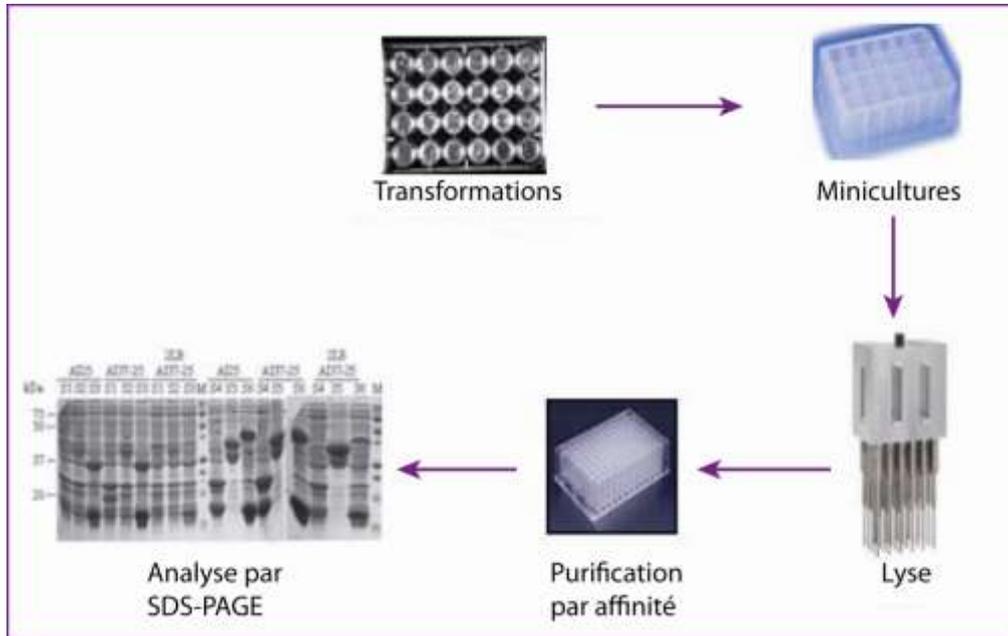
### **II.3.1. Réalisation des tests d'expression dans la bactérie**

La plateforme de Biologie Structurale offre la possibilité de réaliser un grand nombre de tests en parallèle par l'utilisation de sondes de sonication à quatre têtes et de robots de pipetage. Lors de la réalisation de tests d'expression, deux tampons ont été testés en parallèle : 50 et 400 mM NaCl avec 10mM tris pH=8, afin d'évaluer l'effet de la salinité sur la solubilisation des protéines. De la même manière, lors de la réalisation de tests de co-expression, (i) l'influence de la salinité des tampons de lyse sur la formation du complexe (ii) la position de l'étiquette de purification (iii) ainsi que différentes constructions de chaque protéine vont également pouvoir être testés rapidement.

Dans un premier temps, les vecteurs codant pour les protéines sont transformés dans les bactéries BL21(DE3) pRare2 qui sont ensuite étalées sur des plaques 6 puits remplies d'agar. Le lendemain, les colonies sont inoculées dans le milieu de culture qui est laissé sous agitation à 37°C pendant 3 à 4 heures permettant aux cellules de se multiplier jusqu'à atteindre la densité optique à 600nm fixée. La température est alors baissée à 25°C afin de ralentir la croissance des bactéries et ainsi favoriser le repliement correct des protéines d'intérêt, puis l'expression des protéines est induite. Les cultures sont laissées sous agitation à 25°C sur la nuit. Les cultures sont réalisées soit en falcon de 50mL pour un volume de culture de 10mL, soit en boîtes de culture de 24 puits pour un volume de culture de 2,5mL, ces boîtes étant scellées avec un film protecteur permettant l'oxygénation des cultures et empêchant les contaminations (voir figure 19).

Les cultures, lorsqu'elles sont réalisées en falcon sont transférées dans des boîtes de culture de 24 puits afin de faciliter les étapes de sonication et de transfert sur la résine. Les boîtes de culture sont alors centrifugées (15 minutes à 2500 rpm) afin d'éliminer le milieu de culture, et du tampon de lyse est ajouté avant sonication. Un échantillon est alors prélevé, l'extrait total, qui permet de vérifier que nos protéines d'intérêts sont bien exprimées. Les boîtes de culture sont alors centrifugées (20 minutes à 4000 rpm) afin d'éliminer les débris cellulaires ainsi que les protéines insolubles. Le robot de pipetage de la plateforme est alors utilisé pour transférer l'extrait soluble dans une boîte de 96 puits dans laquelle aura été placée la résine d'affinité préalablement équilibrée avec le tampon de lyse (25µL de résine par test). Un échantillon de l'extrait soluble est prélevé en vue d'examiner la solubilité des protéines. Ensuite, la boîte est placée sous agitation à 4°C pendant deux heures puis est centrifugée à faible vitesse (5 minutes à 1000 rpm) afin de faire sédimenter la résine. Le robot de pipetage est utilisé afin d'éliminer l'extrait soluble (qui contient les protéines non retenues sur la résine) et ajouter le tampon de lavage. Une nouvelle étape de lavage est réalisée, puis du tampon de charge (30µL de Laemmli) est ajouté sur la résine sèche afin de décrocher les protéines retenues. Ces

échantillons sont alors déposés sur un gel d'acrylamide dénaturant contenant de 15 à 20% d'acrylamide qui est ensuite coloré au bleu de coomassie. Ainsi, pour chaque test, trois échantillons sont obtenus : (i) un extrait total qui contient toutes les protéines produites, (ii) un extrait soluble et (iii) un échantillon de purification qui contient les protéines retenues par affinité à la résine.



**Figure 19 : Les différentes étapes des tests de co-expression (adapté de Vijayachandran et al., 2011).**

L'ensemble des étapes des minitests d'expression est résumé dans la figure 19 : les transformations, les mini-cultures dans les boîtes 24 puits, la sonication avec la sonde à quatre têtes, le transfert de l'extrait soluble dans les boîtes 96 puits contenant la résine et l'analyse des protéines retenues sur la résine en gel SDS-PAGE.

## II.3.2. Interprétation des résultats

### II.3.2.1. Tests d'expression d'une protéine seule

Au cours de ces minitests d'expression, différents cas de figure peuvent se présenter : (i) si la protéine est produite et est soluble, les tests d'expression vont permettre de déterminer dans quel tampon la protéine est la plus soluble par comparaison de l'intensité des bandes observées sur le gel. (ii) Si aucune bande n'est visible dans les extraits totaux et solubles, alors la protéine n'est pas exprimée dans l'hôte choisi. Dans ce cas, l'ajout à l'étiquette de purification d'une étiquette de solubilisation GST, TRX, MBP ou NusA peut permettre d'exprimer la protéine. Un changement d'hôte de production peut également permettre d'exprimer la protéine, comme par exemple la production en cellules d'insectes. (iii) Si une bande est visible dans l'extrait total mais pas dans l'extrait soluble alors la protéine est exprimée mais n'est pas soluble. Dans ce cas, le changement du tampon de lyse

peut permettre la solubilisation de la protéine ainsi que l'ajout d'une étiquette de solubilisation. (iv) Si des bandes sont visibles dans les extraits totaux et solubles mais pas à l'issue des tests d'expression, dans ce cas la protéine est exprimée et soluble mais ne lie pas la résine car son étiquette de purification n'est pas exposée. Le remplacement de l'étiquette de purification et son positionnement à l'autre extrémité de la protéine peut permettre de retenir la protéine sur la résine d'affinité.

Ainsi à l'issue de ces tests il peut être décidé de produire la protéine en plus grande quantité si les conditions d'expression et de purification ont pu être définies.

### **II.3.2.2. Tests de co-expression**

Les tests de co-expression vont permettre de vérifier la formation d'un complexe et de définir les zones d'interaction en testant différentes régions de chacune des protéines. La co-expression va également présenter de nombreux avantages pour l'expression de complexes protéiques. En effet, dans de nombreux cas, l'expression dans une même bactérie de deux interactants va permettre leur co-solubilisation. Ainsi, même les protéines insolubles lors de la réalisation des tests d'expression simples seront testées lors de la réalisation de tests de co-expression. De plus, de la même manière que dans le cas de l'expression de protéines seules, différentes concentrations salines vont également être testées puisque la quantité de sels présente dans le tampon de lyse va également influencer sur la formation des complexes. La formation du complexe va également dépendre de la position de l'étiquette de purification. En effet, la fusion d'un fragment protéique à l'extrémité d'une protéine peut masquer le site d'interaction de son partenaire. Par conséquent, les étiquettes de purification seront toujours placées successivement sur les deux partenaires et aux deux extrémités.

De plus, afin de s'assurer que le complexe observé résulte bien de l'interaction entre les deux protéines et non d'une interaction de la protéine native avec la résine, cette protéine native va être exprimée seule, son incubation avec la résine permettant de tester la possibilité d'une interaction aspécifique. Ce test va également permettre de vérifier la solubilité de la protéine native et son profil de migration, qui sera différent du profil observé pour cette même protéine portant l'étiquette de purification, la présence de l'étiquette augmentant le poids moléculaire de la protéine et donc sa mobilité électrophorétique.

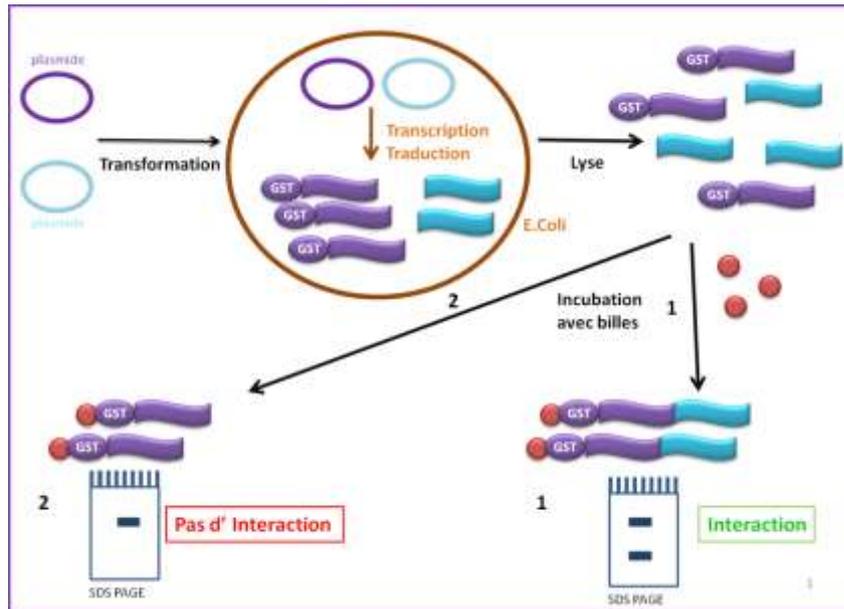


Figure 20 : Schéma explicatif des tests de co-expression.

C'est la présence de deux bandes correspondant à chaque protéine qui sera vérifiée sur le gel d'acrylamide réalisé à la fin des tests, l'intensité des deux bandes devant être équivalente en cas de complexe stœchiométrique. Si une seule bande est observée sur le gel qui correspond à la protéine portant l'étiquette de purification, le test d'expression réalisé va vraisemblablement refléter l'absence d'interaction entre les deux partenaires (voir figure 20). Dans ce cas, d'autres paramètres comme la position de l'étiquette sur la protéine, l'étiquette sur l'autre partenaire et la salinité doivent être testés pour s'assurer qu'il n'y a pas d'interaction.

Les tests de co-expression sont donc un outil essentiel pour définir rapidement les zones de deux protéines formant un complexe.

## II.4. Production à grand volume dans les bactéries

### II.4.1. Transformation

Un volume de 48 $\mu$ L de bactéries BL21(DE3) pRare2 est transformé avec 0,7 $\mu$ L du plasmide d'intérêt par choc thermique. Tout d'abord, les bactéries sont incubées avec le plasmide pendant 20 minutes dans la glace puis le choc thermique est réalisé à 42°C dans un bain marie pendant 45 secondes, ensuite les bactéries sont replongées dans la glace pour quelques minutes. Nous ajoutons 300 $\mu$ L de 2LB sans antibiotique dans les bactéries pour être incubées pendant une heure à 37°C. Enfin, les bactéries sont étalées sur une boîte agar contenant les antibiotiques (dilués au 1000ème) nécessaires à la sélection des bactéries ayant intégré les plasmides et un tapis est observé le lendemain.

## II.4.2. Préculture

Au laboratoire, des précultures solides sont préférées aux précultures liquides car une plus forte sélection des colonies est favorisée, ce qui permet d'obtenir une meilleure expression des protéines. Il suffit juste d'étaler les bactéries de la transformation sur plusieurs grandes boîtes de pétri en fonction du nombre de litres que nous souhaitons réaliser. Typiquement, pour 6L de bactéries nous étalons 6 grandes boîtes.

## II.4.3. Culture

Le lendemain, les bactéries des grandes boîtes sont récupérées à l'aide de râteaux réalisés à partir de pipettes pasteur en verre. Une boîte de pétri permet d'inoculer un litre de milieu de culture. Les cultures sont laissées sous agitation à 37°C, à 180 rpm afin d'atteindre une densité optique à 600nm d'environ de 1. Ensuite, suivant les protéines, la température des cultures est abaissée à 25 ou à 18°C pendant environ une heure de façon à atteindre la DO fixée proche de 1,7. L'induction de l'expression des protéines est effectuée par l'ajout de 600µL d'IPTG à 1M. Les cultures sont laissées sous agitation sur la nuit et récupérées le lendemain pour être centrifugées pendant 30 min à 4000 rpm. Les culots sont conservés à -20°C.

## II.4.4. Milieux

Différents milieux de culture bactériens ont été utilisés au cours de cette thèse. Les milieux 2LB et TFB ont été testés afin d'obtenir une grande quantité de bactéries et donc de protéines. Le milieu Graffinity a surtout été utilisé pour les minitests d'expression alors que le milieu minimum a servi à produire des protéines marquées au N<sup>15</sup> et C<sup>13</sup> (voir tableau 8).

Milieu	Composition pour 1L	Induction	Autres
2LB	20g bactotryptone, 10g d'extrait de levure et 20g NaCl	600µL IPTG à 1M	Possibilité de rajouter 10% de sucrose pour un meilleur repliement des protéines
TFB	12g tryptone, 24g d'extrait de levure, 4mL de glycérol et ajout de sels après autoclave	600µL IPTG à 1M	Sels = 0,17M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> et 0,72M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Graffinity	475mL 2LB + 25mL glucose 10%	470mL 2LB + 25mL Lactose 12% + 10mL Hepes 1M pH=7 + 750µL IPTG à 1M	-----
Minimum	800mL H <sub>2</sub> O + 100mL M9 10x + 100mL NH <sub>4</sub> Cl(N <sup>15</sup> ) 1% + 20mL Glucose(C <sup>13</sup> ) 10% + sels + vitamines	600µL IPTG 1M	Sels M9 10x (1L) : 150g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O + 30g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + 15g NaCl

Tableau 8 : Composition des différents milieux utilisés.

## II.5. Purification des protéines

### II.5.1. Lyse cellulaire

1L de culture est resuspendu dans 80mL de tampon de lyse et placé dans un bécher dans la glace. Les cellules sont soniquées à une amplitude de 45% et une impulsion de 0,5 seconde, pendant 4 minutes espacées d'une minute de repos. Les cellules d'insectes sont soniquées à une amplitude de 30% au total 1 minute 30 secondes avec les mêmes impulsions que les bactéries, leurs membranes étant plus fragiles que les parois bactériennes. L'extrait total obtenu est centrifugé à 15000rpm pendant 45 minutes afin de précipiter les débris cellulaires et d'obtenir l'extrait soluble.

Les conditions de lyse peuvent être optimisées, avec les minitests d'expression, afin de mieux solubiliser la protéine en jouant sur les conditions de tampons (pH, concentration en NaCl, glycérol, détergents, additifs). Les protocoles de purification des protéines étudiées se trouvent en annexe (annexes 9,10 et 11).

### II.5.2. Billes/Colonne d'affinité

La chromatographie par affinité est basée sur l'affinité particulière de l'étiquette de purification exprimée en fusion avec la protéine pour un ligand qui est couplé à une résine d'agarose ou de sépharose. Après fixation spécifique de la protéine fusionnée sur le substrat, la résine portant le complexe est lavée pour éliminer les interactions aspécifiques, puis la protéine isolée est décrochée de la matrice par élution (compétition avec un éluant) ou par coupure du tag. Les étiquettes de purification utilisées dans le cadre de cette thèse, leur ligand fixé à la résine et le mode d'élution employé pour chacune est présenté dans le tableau 9 ci-dessous.

<b>Etiquette de purification</b>	<b>Ligand couplé à la résine</b>	<b>Mode d'élution de la résine</b>	<b>Référence des résines</b>
Poly-histidine (His) <sub>6</sub>	Cobalt	Imidazole ou coupure par une protéase	Talon® superlow de Clontech
Poly-histidine (His) <sub>6</sub>	Nickel	Imidazole ou coupure par une protéase	Ni-NTA Qiagen
Glutathion-S-Transférase (GST)	Glutathion réduit	Glutathion ou coupure par une protéase	Glutathione Sepharose 4B de GE Healthcare

**Tableau 9 : Les étiquettes utilisées pour les purifications.**

L'élution de la protéine par coupure de l'étiquette de purification permet d'obtenir une protéine plus pure. En effet lors de l'élution, les contaminants restants sont élués avec la protéine alors que, lorsqu'une protéase est utilisée, seule la protéine d'intérêt qui est fusionnée avec la séquence reconnue par la protéase est décrochée de la résine (les protéases les plus utilisées sont dans le tableau 10).

Protéases	Site de coupure	Spécificité	Temps de coupure
Thrombine	L-V-P-R/G-S	Moyennement spécifique	Sur la nuit à 4°C ou à 30°C
TEV	E-N-L-Y-F-Q/G	spécifique	Sur la nuit à 4°C ou à 30°C
P3C	L-E-V-L-F-Q/G-P	spécifique	Sur la nuit à 4°C

**Tableau 10 : Les protéases les plus utilisées au laboratoire.**

Nous avons utilisé les billes Ni-NTA et la résine TALON-Co<sup>2+</sup> qui présentent des modes d'utilisation différents. De manière générale, les billes Ni-NTA interagissent davantage avec le tag His que les billes TALON mais également avec les impuretés. La résine Ni-NTA tolère 10mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol tandis que la résine TALON 5mM, et les lavages à l'imidazole sont souvent aux alentours de 20mM pour la résine Ni-NTA et environ de 5mM pour la résine TALON. Pour se décider, les deux résines doivent être testées.

Les chromatographies d'affinité peuvent être réalisées soit sur des systèmes de chromatographie de type Akta, soit en vrac. C'est principalement la technique en vrac qui a été utilisée au cours de cette thèse, le principe de ces deux méthodes étant identique. Une colonne IMAC peut également être choisie mais elle est fournie dépourvue d'ions métalliques et doit être chargée en ions Ni<sup>2+</sup> ou Co<sup>2+</sup> avant utilisation.

### II.5.3. La chromatographie d'exclusion

Cette technique de purification, plus couramment connue sous le nom de gel filtration, permet de séparer les protéines en fonction de leur rayon hydrodynamique. La résine utilisée pour la séparation est un gel formé de billes poreuses. La taille des pores est choisie en fonction de la masse moléculaire des protéines à séparer. Les protéines dont le diamètre est supérieur à celui des pores, ne peuvent y entrer et sont éluées rapidement au niveau du volume mort. Les protéines ayant un diamètre inférieur à celui des pores progressent à travers les billes et sont donc retardées et éluées plus tardivement. Les protéines s'éluent alors dans l'ordre inverse de leur taille. Certaines protéines peuvent avoir un comportement anormal sur la colonne de gel filtration surtout celles qui ne sont pas globulaires. En général, une protéine allongée s'élué plus tôt qu'une protéine globulaire de la même taille. Dans certains cas, surtout quand la salinité du tampon utilisé est faible, certaines protéines peuvent interagir avec la résine de la colonne et s'élué plus tardivement.

La chromatographie d'exclusion peut être utilisée comme étape de purification pour séparer une protéine d'intérêt de ses contaminants mais aussi pour séparer les différents états oligomériques d'une protéine. Les colonnes utilisées pour les étapes de gel filtration sont choisies en fonction de leur pouvoir résolutif (maillage du gel). Pour la purification des protéines étudiées dans

cette thèse nous avons utilisé des colonnes HiLoad 16/60 Superdex S75 et S200 (AmershamBiotech) ainsi que la colonne analytique 10/300 Superdex S200 (AmershamBiotech). Le volume de l'échantillon injecté doit être inférieur ou égal à 1% du volume de la colonne pour atteindre une bonne résolution. Pour une colonne 10/300, le volume d'injection doit se situer entre 25 à 500 $\mu$ L tandis que pour une colonne 16/60 le volume d'injection doit être entre 0,6 et 4,8 mL. Les colonnes sont lavées régulièrement avec 0,5M NaOH afin d'éliminer les protéases et les protéines collées sur la résine.

#### **II.5.4. Echangeuse d'ions**

Cette technique consiste à séparer des protéines en fonction de leur différence de charge à un pH donné. En chromatographie d'échange d'ions, une phase stationnaire peut contenir soit des groupements fonctionnels anioniques (pour les échanges de cations), soit cationiques (pour les échanges d'anions). Les molécules en solution ayant une charge opposée que la phase stationnaire seront retenues alors que les molécules ayant la même charge sortent dans les fractions non retenues.

Une protéine donnée est chargée négativement à un pH supérieur à son point isoélectrique (pI) et peut donc s'accrocher sur une résine chargée positivement comme l'UNO<sup>TM</sup> Q. Cette résine comporte des groupements basiques d'ammonium quaternaires ( $-N^+(CH_3)_3$ ). Par contre, à un pH inférieur à son pI, la protéine est chargée positivement et peut s'accrocher sur une résine chargée négativement telle l'UMO<sup>TM</sup> S. cette dernière comporte des groupes acides sulfoniques ( $-SO_3^-$ ). Ainsi en fonction de son pI et du pH utilisé, la protéine d'intérêt sera retenue sur l'une ou l'autre des différentes résines échangeuses d'ions. L'élution se fait soit par variation du pH du tampon d'élution soit en augmentant sa force ionique.

### **II.6. Caractérisation physico-chimique des protéines et complexes protéiques**

#### **II.6.1. Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide**

Cette technique permet de séparer les protéines, qui sont chargées, dans un champ électrique par électrophorèse en gel de polyacrylamide appelée PAGE pour « PolyAcrylamide Gel Electrophoresis ». Les gels de polyacrylamide sont constitués d'acrylamide qui est l'unité de base et de bis-acrylamide qui est l'agent pontant, permettant la polymérisation. En fonction des différents

taux de ces deux substances nous obtenons différents maillages et donc différentes densités de gel. La réaction de polymérisation se fait grâce à l'ajout de deux substances réactives : le TEMED et l'ammonium persulfate qui, en réagissant avec la lumière, deviennent des anions hyper réactifs enclenchant la polymérisation.

### II.6.1.1. PAGE en conditions natives : Gel natif

La séparation de protéines par PAGE en conditions natives permet d'analyser l'échantillon dans un état proche des conditions physiologiques et se fait en fonction de différents facteurs comme : la charge, la taille, la forme, la présence de divers groupements: polysaccharides (glycoprotéines), acides gras (lipoprotéines) ou encore de modifications post-traductionnelles. Les protéines et complexes protéiques sont conservés et repliés dans leur état physiologique. Le pH du tampon de migration, qui est le tampon remplissant la cuve d'électrophorèse dans laquelle baigne le gel, doit être choisi en fonction du point isoélectrique (PI) de la protéine car il détermine sa charge. Afin que les protéines migrent toutes vers l'anode, nous optons pour un pH supérieur au pi de chaque protéine testée. Dans un gel natif, 1 à 2 µg de protéines sont déposés dans chaque puit, la composition du gel natif est décrite dans le tableau 11.

H <sub>2</sub> O	Tampon 5x	Acryl 40%	APS 10%	Temed
3,05mL	1,25ml	750µL	25µL	5µL

Tableau 11: Composition pour 1 gel natif.

Le tampon de migration 5x est composé de 30,3g de tris Base et de 7,7g d'acide borique dissous dans un 1L d'eau milliQ pour obtenir une solution à pH=8,5. Le tampon de charge 2x contient 50% de glycérol, 25% de tampon de migration 1X et 0,01% de bleu de bromophénol. L'électrophorèse a lieu à 200V à 20mA.

### II.6.1.2. PAGE en conditions dénaturantes : SDS-PAGE

La séparation de protéine en conditions dénaturantes se fait par SDS-PAGE. Le détergent SDS pour Sodium Dodécyl Sulfate dénature et confère une charge négative aux échantillons protéiques. La séparation des différents échantillons se fait donc uniquement en fonction de la masse de monomères dénaturés (voir composition du gel SDS-PAGE dans le tableau 12). Cette analyse permet aussi un contrôle de la pureté de l'échantillon, car nous voyons la présence éventuelle de contaminants. Le gel SDS-PAGE est formé dans sa partie haute d'un gel de concentration et dans sa partie basse d'un gel de séparation. Le gel de concentration permet une entrée homogène de l'échantillon dans le gel de séparation tandis que le gel de séparation permet de séparer les échantillons, le pourcentage est choisi en fonction de la résolution voulue. Les compositions des gels SDS-PAGE à différentes densités sont décrites dans le tableau 12. Le tampon de charge facilite le

dépôt des échantillons grâce au glycérol ainsi que la dénaturation des échantillons par la présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol qui casse les ponts disulfures.

Pour 2 gels	%	H <sub>2</sub> O	Acrylamide 40%	Tris 3M pH8,8	Tris 1M pH6,8	SDS 10%	APS 10%	Temed
stacking	5%	3,625mL	625 $\mu$ L		625 $\mu$ L	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L	10 $\mu$ L
resolving	8%	4mL	1,5mL	1,9mL		70 $\mu$ L	160 $\mu$ L	16 $\mu$ L
	10%	3,6mL	1,9mL	1,9mL		70 $\mu$ L	160 $\mu$ L	16 $\mu$ L
	12%	3,2mL	2,3mL	1,9mL		70 $\mu$ L	160 $\mu$ L	16 $\mu$ L
	15%	2,7mL	2,85mL	1,9mL		70 $\mu$ L	160 $\mu$ L	16 $\mu$ L
	20%	1,7mL	3,8mL	1,9mL		70 $\mu$ L	160 $\mu$ L	16 $\mu$ L

**Tableau 12 : Composition pour deux gels dénaturants.**

Le tampon de migration est formé de 100mL de tampon TG 10X, de 10mL SDS 10% et de 890mL d'eau déminéralisée. Le tampon TG 10X contient 30g de tris base et de 143g de glycine dans 1L d'eau déminéralisée. Le tampon de charge est constitué de 9,5 mL de la solution stock (4% SDS, 20% glycerol, 0.004% bleu de bromophénol et 0.125 M Tris HCl, pH=6.8) et de 0,5mL de  $\beta$ -mercaptoéthanol à 14,3M.

A la suite de la migration, le gel est incubé dans deux tampons de façon à colorer uniquement les bandes de protéines avec du bleu de coomassie. Cette méthode est rapide et permet d'obtenir un gel sans coloration de fond. Le gel est chauffé dans le tampon 1 (500mL d'éthanol, 100mL d'acide acétique et 400mL d'eau déminéralisée) pendant 5 min à 400W puis laisser sous agitation pendant 15 min. Au cours de cette étape le gel va rétrécir. Ensuite, le tampon 1 est remplacé par le tampon 2 (50mL d'éthanol, 75 mL d'acide acétique et 875mL d'eau déminéralisée) et 1mL de bleu de coomassie à 0.025% est ajouté, le gel est également chauffé puis laissé sous agitation pendant 15 minutes. Au cours de cette étape, le gel va s'agrandir facilitant l'absorption du bleu de coomassie par les protéines.

## II.6.2. Dosage des protéines

Il existe plusieurs façons de doser un échantillon protéique. Deux techniques ayant recours à la spectrophotométrie sont couramment utilisées au laboratoire : la technique de Bradford et l'absorbance à 280 nm.

### II.6.2.1. Dosage par la méthode de Bradford

La méthode de Bradford est un dosage colorimétrique, basé sur un changement d'absorbance, par le changement de la couleur du bleu de coomassie après liaison avec les acides aminés aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus basiques (arginine et histidine) présents dans la protéine. La forme anionique (liée aux protéines) du bleu de coomassie possède un

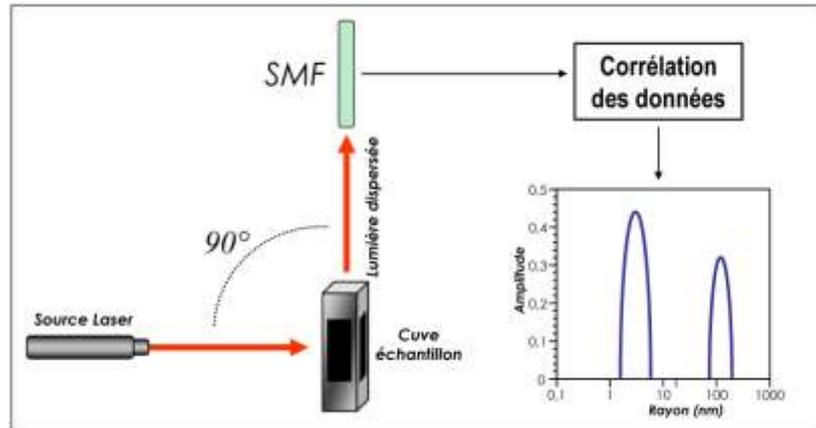
pic d'absorption maximal à 595 nm. L'absorbance est proportionnelle à la quantité de colorant lié, et donc à la concentration en protéines dans l'échantillon. Contrairement aux autres méthodes de mesure des protéines, la méthode de Bradford est peu sensible aux interférences par divers agents présents dans les échantillons de protéine (acides nucléiques). Elle est toutefois affectée par les détergents, les poly-phénols de haut poids moléculaire, et modifiée par le pH. Des cuves de 1 mL sont utilisées, où l'on mélange 800  $\mu$ L d'eau, 200  $\mu$ L de réactif Bio-Rad® Protein Assay Dye Reagent et 2  $\mu$ L d'échantillons protéique à mesurer. Nous mesurons l'absorbance à 595 nm et la concentration est déterminée en utilisant une courbe d'étalonnage.

#### **II.6.2.2. Absorption à 280nm**

Le tryptophane absorbe fortement à 280 nm et dans une moindre mesure, la tyrosine, la phénylalanine et la cystéine. Il est donc possible de doser les protéines en mesurant l'absorbance à 280 nm (Layne 1957). Cette méthode permet de déterminer approximativement la concentration des protéines en appliquant la relation de Beer-Lambert ( $A = \epsilon lC$  avec A l'absorbance,  $\epsilon$  le coefficient d'absorption molaire en  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ , l la largeur de cuve en cm et C la concentration de la solution en mol/L). La valeur du coefficient d'absorption molaire peut être calculée pour chaque protéine sur le site expasy protparam en indiquant la séquence protéique. Au laboratoire, nous utilisons l'appareil Nanodrop Thermo Scientific© qui permet de mesurer le spectre d'absorption de 230 à 600 nm avec un volume d'échantillon de l'ordre du microlitre. La présence de contaminants ayant une absorption proche de 280 nm peut fausser les résultats, par exemple la présence d'acide nucléique.

#### **II.6.3. « Dynamic Light Scattering » (DLS)**

La diffusion dynamique de lumière ou DLS (Dynamic Light Scattering) est une technique utilisée pour mesurer la taille hydrodynamique et la polydispersité d'un échantillon protéique. Ce sont des paramètres importants pour la cristallisation d'une protéine. La DLS mesure la lumière d'un laser diffusée par des particules en suspension à 90° du faisceau incident. Nous mesurons les fluctuations de la lumière dispersée due au mouvement brownien des molécules et particules en solution. L'appareil que nous avons utilisé possède une diode laser de couleur rouge comme source lumineuse et une fibre optique monomode (Single mode fiber SMF) pour récupérer la lumière dispersée perpendiculaire à l'émission (figure 21). Au laboratoire nous disposons d'un appareil de type DynaPro© Nanostar system (Wyatt), qui permet d'analyser un échantillon à une concentration de 1 mg/mL dans un volume de 5  $\mu$ L dans les cuves en quartz (Wyatt) ou dans un volume de 60  $\mu$ L dans les cuves en plastique (Uvette eppendorf). L'échantillon est filtré ou centrifugé 10 minutes à 15 000 rpm au préalable, pour éliminer toute poussière ou gros agrégat.



**Figure 21: Principe de la DLS.** Un rayonnement de laser rouge est envoyé sur la cuve échantillon. Le rayon lumineux dispersé à un angle de 90° du faisceau incident est mesuré par une fibre optique monomode SMF (Single Mode Fiber). Les données sont ensuite traitées et le résultat est présenté sous forme de courbe de corrélation où l'intensité est exprimée en fonction du rayon des particules.

Comme les plus grosses particules bougent plus lentement que les petites, il en résulte une fonction de corrélation qui permet de déduire le coefficient de diffusion  $D$  des molécules en modélisant les données obtenues. Le rayon hydrodynamique des particules est calculé en utilisant l'équation :

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D_t}$$

Avec  $R_H$  : le rayon de Stokes,  $k$  : la constante de Boltzmann,  $T$  : la température de l'échantillon,  $\eta$  : la viscosité du solvant et  $D_t$  : le coefficient de diffusion translationnel. Ces mesures permettent la détermination de la polydispersité  $Pd$  de l'échantillon. Il s'agit de l'écart de la distribution de taille d'une population de particules. Pour la cristallisation des protéines une faible polydispersité est généralement requise, et nous considérons qu'un indice de polydispersité supérieur à 20 % réduit la probabilité de nucléation et de croissance cristalline (Saridakis et al., 1999).

Lors des premières analyses d'un échantillon protéique, nous réalisons en routine au laboratoire un criblage de conditions tampons par DLS. Ce criblage de 24 solutions tampons de pH=3 à pH=10 (tableau 13) permet de choisir le tampon le plus approprié pour optimiser l'homogénéité et les chances de cristallisation de l'échantillon (Jancarik et al., 2004).

#	Tampon (100mM)	pH	#	Tampon (100mM)	pH
1	Glycine	3	13	Cacodylate	6,5
2	Acide citrique	3,2	14	Acétate d'Ammonium	7
3	PIPPS	3,7	15	MOPS	7
4	Acide citrique	4	16	Phosphate de sodium/potassium	7
5	Acétate de sodium	4,5	17	HEPES	7,5
6	Phosphate de sodium/potassium	5	18	TrisHCl	7,5
7	Citrate de sodium	5,5	19	EPPS	8
8	Phosphate de sodium/potassium	6	20	Imidazole	8
9	Bis-tris	6	21	TrisHCl	8,5
10	MES	6,2	22	CHES	9
11	ADA	6,5	23	CHES	9,5
12	Bis-tris propane	6,5	24	CAPS	10

**Tableau 13 : Les 24 conditions du criblage décrit par Jancarik et al.**

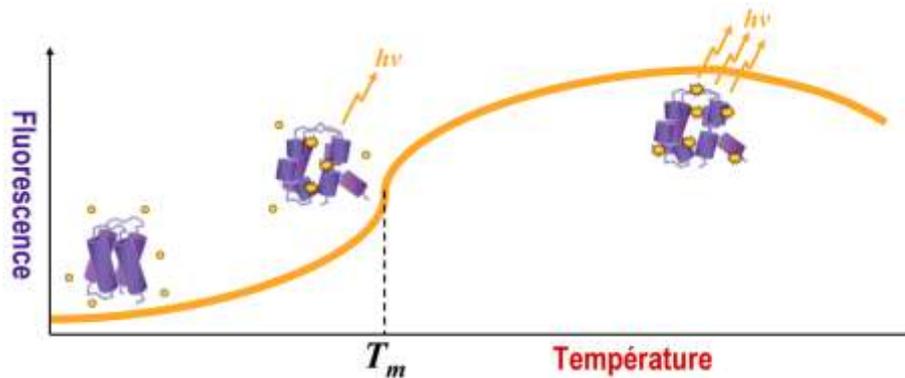
Des gouttes suspendues (voir partie cristallisation) sont réalisées en mélangeant 1 $\mu$ L de protéine (concentration entre 3 et 30 mg/mL) et 1  $\mu$ L de la solution du réservoir. Les réservoirs en vis-à-vis contiennent 500  $\mu$ L des différentes solutions tampon à la concentration de 100 mM. Les gouttes sont laissées 24h à température ambiante, permettant la mise à l'équilibre par diffusion de vapeur goutte/réservoir. Les gouttes restées limpides sont diluées dans 15  $\mu$ L du réservoir correspondant et analysée en DLS. Ceci permet de sélectionner la condition tampon à utiliser pour les investigations futures.

## II.6.4. « Thermal Shift Assay »

### II.6.4.1. Principe du « Thermal Shift Assay »

La technique du « Thermal Shift Assay », aussi appelée ThermoFluor<sup>®</sup> est une technique qui a été mise au point à la fin des années 90 par Pantoliano et ses collaborateurs (Pantoliano et al., 2001) et qui permet de déterminer la stabilité thermique d'un échantillon protéique.

Le principe du ThermoFluor<sup>®</sup> repose sur une détection de la fluorescence apportée par le SYPRO Orange (Steinberg et al. 1996), un colorant spécifique des régions hydrophobes des protéines. Lorsque le SYPRO Orange est ajouté à une solution protéique, il est exposé à un environnement aqueux et l'émission de fluorescence est faible. Lorsque la température augmente, la protéine subit une déstructuration et expose ses régions hydrophobes. Le SYPRO Orange se lie aux régions hydrophobes désormais accessibles et devient fortement fluorescent (figure 22). Le ThermoFluor<sup>®</sup> permet donc un suivi indirect de la dénaturation d'un échantillon protéique soumis à un gradient de température.



**Figure 22 : Principe d'une expérience en thermofluor**

Le point d'inflexion de la courbe de fluorescence correspond à la température de fusion de la protéine ( $T_m$ ). La valeur de  $T_m$  correspond donc au maximum de la dérivée de la courbe de fluorescence. Nous considérons que plus le  $T_m$  est grand plus l'échantillon est stable.

#### **II.6.4.2. Protocole expérimental**

Au laboratoire, les expériences de ThermoFluor® sont réalisées dans un appareil classique de PCR en temps réel, le système Bio-Rad® MiniOpticon Real-Time PCR Detection System. Le logiciel Opticon Monitor permet de contrôler l'expérience et d'interpréter les résultats. Un protocole classique est de réaliser un gradient de température de 20°C à 95°C en mesurant la fluorescence tous les 0,5°C. Il est possible de réaliser jusqu'à 48 essais simultanément. Le volume final de 30 µL est atteint en mélangeant les solutions suivantes :

- 5-8 µL de l'échantillon protéique contenant 5 à 10 µg de la protéine d'intérêt,
- 15 µL du tampon à tester ou de l'échantillon,
- 0-3 µL d'additif (ligand, cofacteur, inhibiteur),
- 7 µL de colorant SYPRO Orange dilué 200 fois dans le tampon de la protéine.

Il s'agit donc d'une technique rapide (une expérience dure entre 45 et 60 minutes), de faible coût et qui utilise de petites quantités d'échantillon.

#### **II.6.4.3. Applications du « Thermal Shift Assay »**

En ThermoFluor®, à part la température, nous pouvons évaluer l'influence de facteurs, tels que le pH, la concentration et la nature des sels, les détergents, sur la stabilité de la protéine. La stabilité d'un complexe et les interactions peptide-protéine ou protéine-protéine peuvent également être caractérisée par ThermoFluor®. Nous pouvons identifier dans quelles conditions le complexe est présent et où il est le plus stable. Dans certain cas, il est même possible de déterminer à quelle température un complexe protéique se dissocie (Ericsson et al., 2006).

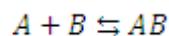
Certaines protéines ne sont pas compatibles avec les analyses en ThermoFluor® car elles exposent des résidus hydrophobes dans leur forme native et fixe le colorant indépendamment de leur dénaturation. A l'opposé, des protéines trop hydrophiles ne fixent pas le colorant même dénaturées et ne sont donc pas utilisables en ThermoFluor®. Ceci peut-être résolu par l'ajout de ligand ou cofacteur qui replie les zones hydrophobes.

## II.6.5. « Isothermal Titration Calorimetry » (ITC)

La calorimétrie par titration isotherme ou ITC (pour Isothermal Titration Calorimetry) permet la caractérisation hydrodynamique des interactions entre molécules en solution, et des réactions biochimiques en général. L'ITC mesure le dégagement ou l'absorption de chaleur de l'interaction (exothermique ou endothermique) et permet une détermination directe de la constante d'association ( $K_a$ ), la stœchiométrie ( $n$ ) et l'enthalpie ( $\Delta H$ ). L'énergie libre ( $\Delta G$ ) et l'entropie ( $\Delta S$ ) peuvent ensuite être déterminées à partir de  $K_a$ , d'après l'équation :

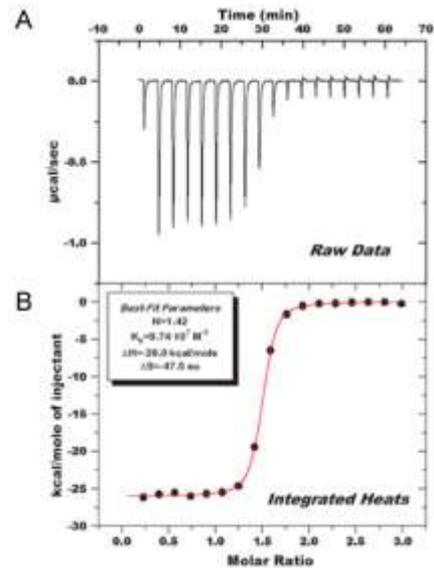
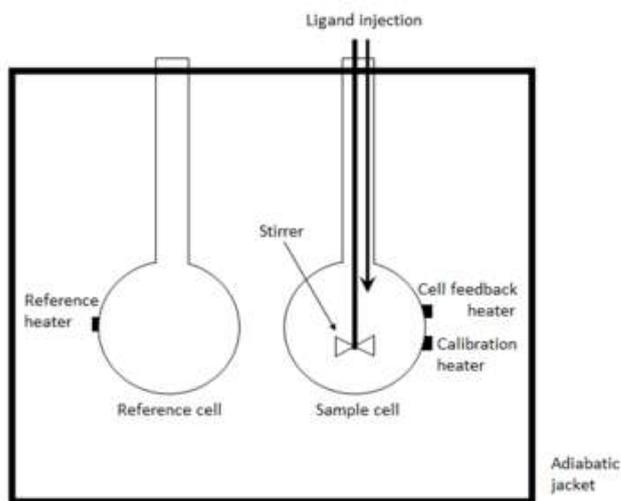
$$\Delta G = -RT \log(K_a) = \Delta H - T\Delta S$$

avec  $R$  constante des gaz parfaits,  $T$  la température en kelvin, et le  $K_a$  la constante d'association entre une molécule A et une molécule B :



L'ITC permet d'étudier les interactions dans des conditions non destructives et de déterminer des constantes d'association allant de  $10^{-3}$  à  $10^{-8}$  M.

L'appareil consiste en une enceinte adiabatique contenant deux cellules : la cellule d'échantillon contenant par exemple la macromolécule (A) et la cellule référence contenant le tampon correspondant. Le ligand (B) est ajouté dans la cellule échantillon par injection de petites volumes, 1 à 2  $\mu\text{L}$  (20 à 30 injections), à l'aide d'une seringue avec une aiguille à ailettes mobile pour mieux homogénéiser le mélange (figure 23). Chaque ajout de B correspond à un échange thermique signant l'interaction A-B, signal proportionnel à la quantité de complexe formé. La puissance nécessaire pour neutraliser cet échange thermique est mesurée par le calorimètre. La concentration de B dans la seringue doit être calculée de manière à obtenir à la fin de la titration une concentration finale du ligand dans la cellule qui est à 2-3 fois la concentration de A. En général, la concentration de B dans la seringue est 10 fois supérieure à celle de A. Le volume de la cellule est de 200 $\mu\text{L}$  et celui de la seringue de 40 $\mu\text{L}$ , mais pour une meilleure manipulation 300 $\mu\text{L}$  d'échantillon destiné à la cellule ainsi que 80 $\mu\text{L}$  de titrant sont préparés. La température de l'expérience peut être réglée entre 2 et 80°C et la vitesse de l'ailette peut varier entre 500 et 1000 rpm.



**Figure 23 : Organisation schématique d'une cuve de microcalorimètre et exemple de mesures obtenues en ITC. En A les données brutes mesurées par ITC ( $\mu\text{cal/s}$  en fonction du temps) et en B les données intégrées ( $\text{kcal/mole}$  en fonction du ratio molaire  $[B]/[A]$ ).**

La courbe expérimentale obtenue en ITC correspond à la puissance ( $\mu\text{cal/s}$ ) nécessaire pour maintenir la température constante entre les deux cellules, en fonction du temps (figure 23.A). Chaque pic correspond à une injection unique et son intégrale, après soustraction de la ligne de base correspond à la chaleur associée à la fixation ( $q_j$ ). Les pics deviennent progressivement plus petits car il y a de moins en moins de composant (A) libre après chaque nouvelle injection. Quand le composant (A) est saturé en composant (B), le pic obtenu correspond à la ligne de base. Par la suite, la courbe de  $q_j$  en fonction du ratio molaire  $[B]/[A]$  dans la cellule échantillon peut-être obtenue (figure 23.B).

Pendant une expérience d'ITC, la quantité de chaleur  $Q$  émise ou absorbée pendant une injection  $j$  est égale à :

$$Q_j = v\Delta H[AB]$$

où  $v$  est le volume de la cellule,  $[AB]_j$  la concentration du complexe formé pendant l'injection  $j$ . Le volume  $v$  étant constant, la variation de l'enthalpie par mole de B fixée  $\Delta H$ , peut être calculé facilement à partir de la courbe expérimentale. L'équation qui permet d'interpréter les mesures expérimentales correspond à l'intégrale de la surface du pic obtenu pendant l'injection  $j$  :

$$Q_j = \frac{nAv\Delta H}{2} \left[ 1 + \frac{B}{nA} + \frac{1}{nKaA} - \sqrt{\left( 1 + \frac{B}{nA} + \frac{1}{nKaA} \right)^2 - \frac{4B}{nA}} \right]$$

Cette dernière équation est utilisée pour modéliser les données expérimentales et déterminer les valeurs de la stœchiométrie  $n$ , de  $K_a$  et de  $\Delta H$  et par la suite les autres paramètres thermodynamiques ( $\Delta G$  et  $\Delta S$ ). Le paramètre critique qui détermine la forme de la courbe isotherme d'interaction est la constante  $c$  (Jelesarov et al. 1998) qui dépend de la constante d'association  $K_a$ , de la concentration de la macromolécule  $[A]_{tot}$  au début de l'expérience et de la stœchiométrie  $n$  :

$$c = nK_a[A]_{tot}$$

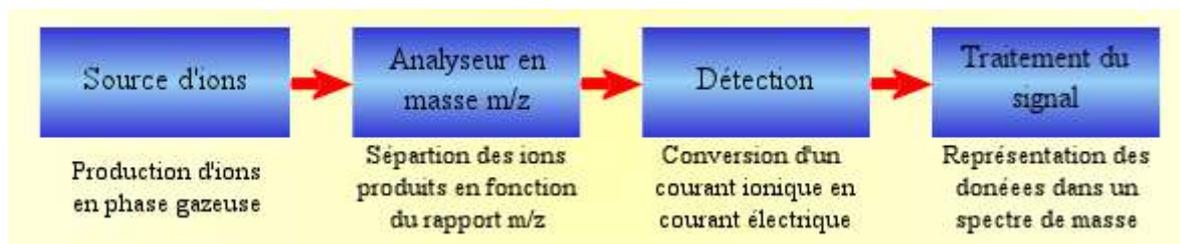
La détermination expérimentale de  $K_a$  dépend fortement de l'aspect de la courbe et donc de  $c$ . Pour des valeurs de  $c$  très élevées ( $c > 5000$ ), la courbe est « rectangulaire » et ne varie pas en fonction de  $K_a$ . Pour des valeurs de  $c$  très faibles ( $c = 0,1$ ), la courbe isotherme devient presque une ligne horizontale, indiquant une très faible interaction. La forme de la courbe isotherme varie en fonction de  $K_a$  pour  $0,1 < c < 1000$  et les valeurs de  $c$  allant de 5 à 500 sont idéales pour la mesure de  $K_a$  (Bjelic and Jelesarov, 2008).

La machine ITC200microCalorimeter (microcal) a été utilisée pour mesurer le  $K_a$  entre TCTP et CMcl-1 ou Bcl-xl. Ces protéines ont été concentrées à  $100\mu\text{M}$  dans la cuve et TCTP à  $1\text{mM}$  dans la seringue. La protéine CMcl-1 formant des bulles sous agitation, la vitesse de l'ailette a dû être abaissée à 500 rpm au lieu de 1000 rpm.

## II.6.6. Spectrométrie de masse

Les études des complexes ont été faites au laboratoire par le service de la spectrométrie de masse et en collaboration avec Johann Stojko et Sarah Cianferani du Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique de Cronenbourg. La spectrométrie de masse nous a permis, en condition dénaturante, de vérifier l'identité des protéines purifiées en comparant les masses moléculaires théorique et expérimentale, et en conditions natives, de déterminer la stœchiométrie des complexes. Des bandes de protéines en gel dénaturant ont également été analysées en spectrométrie de masse afin d'identifier des contaminants et des dégradations.

Classiquement, un spectromètre de masse (LCT, Waters, Manchester, UK) est composé de trois parties distinctes comme l'illustre la figure 24 : Une *source d'ions* formée d'une enceinte au sein de laquelle les ions sont formés à partir de l'échantillon vaporisé ; Un *analyseur* dont l'objet consiste à mesurer, pour chacune des espèces ioniques issues de la source d'ion, le rapport entre sa masse ( $m$ ) et sa charge ( $q$ ). De façon conventionnelle, ce n'est pas la valeur de la charge ( $q$ ) qui est utilisée mais plutôt la valeur absolue du nombre de charge ( $z$ ). Les ions se voient donc attribuer une valeur  $m/z$  caractéristique qui s'exprime en Thompson (Th); Un *détecteur* qui mesure en fonction des différentes valeurs  $m/z$ , l'intensité du signal qui leur correspond.



**Figure 24 : Principe de la spectrométrie de masse.**

Deux sources d'ions sont couramment utilisées : l'électrospray et de la désorption laser assistée par matrice (MALDI). Le voltage de la source étant positif, l'ionisation de l'échantillon se fait par protonation des résidus basiques.

ESI-TOF (Triversa Nanomate, Advion Biosciences, Ithaca, NY):

L'électrospray repose sur l'introduction d'une solution aqueuse du composé à analyser dans un capillaire très fin porté à haut potentiel. Cette tension crée des charges dans la solution et, au sortir du capillaire, un nébulisant (spray) de fines gouttelettes est formé, constitué de molécules protonées. Dans la source à pression atmosphérique, ces gouttelettes rencontrent un flux d'azote chaud à contre courant qui conduit à l'évaporation du solvant. L'interface située entre la source et l'analyseur, permet de transmettre, désolvater et focaliser les ions formés afin qu'ils puissent passer dans l'enceinte sous vide de l'analyseur.

L'analyseur à temps de vol (Synapt HDMS, Waters, Manchester, UK), le « TOF » (Time of flight) consiste à mesurer le temps que met un ion, accéléré préalablement par une tension, à parcourir une distance donnée. Le rapport masse sur charge est directement mesurable à partir du temps de vol d'après la relation :

$$\frac{m}{z} = 2V_0 \frac{t^2}{d^2}$$

où  $V_0$  est la différence de potentiel à la sortie de la source d'ions,  $t$  est le temps que met un ion à franchir une distance fixe  $d$ . Les ions de rapport  $m/z$  le plus petit parviendront au détecteur avant ceux de rapport élevé ce qui permet la séparation. Un traitement informatique des mesures du rapport masse/charge permet de calculer la masse de la macromolécule qui a généré ces ions.

MALDI-TOF (Reflex IV Bruker) :

La désorption-ionisation laser assistée par matrice est une technique d'ionisation douce utilisée en spectrométrie de masse, permettant l'analyse de biomolécules qui tendent à devenir fragiles et à se fragmenter lorsqu'elles sont ionisées par des méthodes plus conventionnelles. Elle est relativement similaire à l'ionisation par électrospray en douceur relative et en ions produits (bien

qu'elle crée moins d'ions multichargés). L'ionisation est provoquée par un faisceau laser (normalement un laser à l'azote). Une matrice est utilisée afin de protéger la biomolécule de la destruction par un faisceau direct et de faciliter la vaporisation et l'ionisation. Couplée à un analyseur à temps de vol, la désorption laser assistée par matrice est une méthode de choix pour l'étude des composées de hautes masses.

#### Préparation des échantillons :

##### *Liquide :*

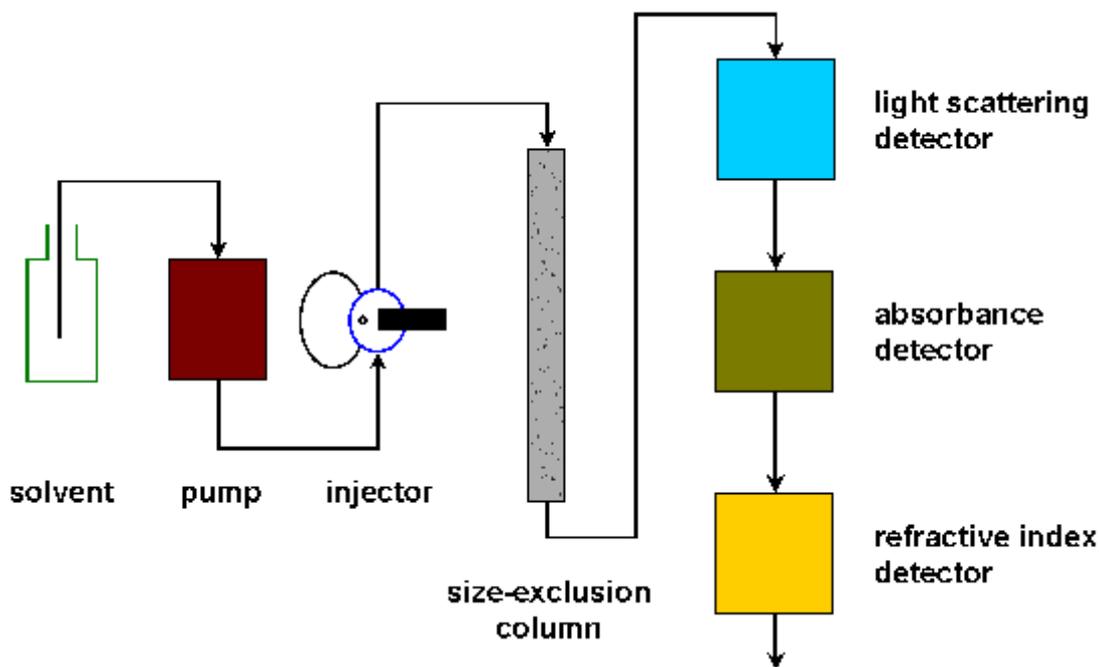
Un échantillon de 50 $\mu$ L, concentré à 100 $\mu$ M, est passé deux fois sur Colonne Zeba (0,5mL, Thermo Scientific, Rockford, IL), équilibrée avec le tampon 50mM acétate d'ammonium pH=9. Au deuxième passage sur la colonne, l'échantillon est dilué par deux. La concentration finale utilisée pour l'analyse est de 5 à 2 $\mu$ M final. En condition dénaturante, les protéines sont dépliées à l'aide du tampon : eau/acétonitrile/acide formique (50 :50 :1). Les mesures sont réalisées avec une tension de  $V_c=40V$  et une pression de  $p=1,1mbar$ . L'analyse des données et la déconvolution des spectres sont effectuées par MassLynx 3,5 (Waters, Manchester, UK).

##### *Bandes sur gel :*

Les bandes sur gel des protéines colorées en coomassie sont découpées et une protéolyse est réalisée pour obtenir un mélange de peptides plus courts qui pourront être analysés individuellement par MS/MS. Par un jeu d'endoprotéases spécifiques (trypsine, chymotrypsine), le recouvrement des séquences des peptides de digestion permet de remonter à la séquence de la protéine entière.

### **II.6.7. « Size Exclusion Chromatography » SEC-MALS**

Il s'agit d'une méthode permettant de déterminer la masse moléculaire d'une particule ainsi que son rayon hydrodynamique grâce à la combinaison de plusieurs techniques : la chromatographie d'exclusion de taille (SEC), la diffusion de lumière ainsi que la réfractométrie (RI) (Figure 25). L'homogénéité et la polydispersité des échantillons peuvent aussi être évaluées par cette technique. L'avantage réside également en l'utilisation de la chromatographie d'exclusion de taille qui permet d'éliminer d'éventuels agrégats, et la possibilité de déterminer la masse molaire.



**Figure 25 : Représentation schématique du dispositif SEC-MALLS-RI.** Ce schéma illustre le passage de l'échantillon dans la colonne d'exclusion de taille, puis par les détecteurs de diffusion de lumière, d'absorbance et de réfractométrie.

Un système HPLC avec une pompe permet d'injecter l'échantillon dans le système et assurer un flux de tampon. L'échantillon passe par une colonne d'exclusion de taille et à la sortie de la colonne, un détecteur Mini DawnTREOS (Wyatt technology) mesure la diffusion de la lumière à 18 angles et l'indice de réfraction est mesuré à l'aide d'un réfractomètre OptilabT-rex (Wyatt technology). La concentration de la protéine est calculée par le changement de l'indice de réfraction, l'intensité du signal diffusé correspond au produit de la concentration par la masse molaire. Les données sont analysées avec le logiciel Astra V (Wyatt technology). Un volume de 100 $\mu$ L d'échantillon, concentré entre 40 et 200  $\mu$ M en protéines, est injecté dans la colonne d'exclusion de taille. Le tampon ne doit pas contenir de DTT qui perturbe l'indice de réfraction, du TCEP est utilisé à la place et 0,03% d'azide afin d'éviter toutes contaminations.

## II.6.8. Ultracentrifugation Analytique (UAC)

Une autre approche de l'étude du comportement hydrodynamique d'une molécule est de mesurer sa vitesse de sédimentation. Lorsqu'une molécule est soumise à une force gravitationnelle ou centrifuge, la vitesse à laquelle elle sédimente dépend de sa résistance au mouvement, c'est-à-dire de son coefficient de friction. L'ultracentrifugation analytique permet de mesurer ce coefficient. La force gravitationnelle qui s'applique sur les molécules est négligeable devant l'agitation

thermique, elle n'est donc pas suffisante pour les faire sédimenter. Nous appliquons donc une force centrifuge  $F_c$ , de l'ordre de 100 000 fois la gravité terrestre. Le champ de force qui s'applique sur la molécule étudiée est donc :

$$F_c + F_A + F_f = m\omega^2 r - m_0\omega^2 r - fv$$

où  $m$  est la masse de la molécule,  $r$  sa distance au centre de rotation,  $f$  son coefficient de friction,  $v$  sa vitesse,  $F_A$  est la force d'Archimède,  $F_f$  la force de friction, et  $\omega$  est la vitesse de rotation.

La vitesse de sédimentation devient constante lorsque ce champ de force s'annule :

$$m\omega^2 r - m_0\omega^2 r - fv = 0$$

$$(m - m_0)\omega^2 r = m \left(1 - \frac{\rho_0}{\rho}\right) \omega^2 r = m(1 - \bar{v}\rho_0)\omega^2 r = fv$$

où  $m_0$  est la masse du solvant déplacé par la molécule,  $\rho$  est la masse volumique de la molécule,  $\rho_0$  celle de la solution,  $\bar{v}$  le volume spécifique de la molécule ( $\rho = \bar{v} \cdot \rho_0$ ). Nous définissons un paramètre, le coefficient de sédimentation  $s$ , comme le rapport entre la vitesse de sédimentation et l'accélération subit par la molécule. Ce paramètre est alors indépendant de la force centrifuge appliquée :

$$s = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho)}{N_A f}$$

où  $M$  est la masse molaire de la molécule, et  $N_A$  la constante d'Avogadro. Cette grandeur a la dimension d'un temps et s'exprime en Svedberg, qui correspond à  $10^{-13}$  secondes (Serdyuck *et al.*, 2007). Ce coefficient permet de calculer le coefficient de friction de la molécule, en présupposant sa masse. Ce coefficient de sédimentation est mesuré par le suivi de l'absorbance d'un échantillon de concentration connue. Le front d'absorbance s'éloigne du centre de rotation lorsque les molécules sédimentent, en fonction du temps de rotation. La vitesse de progression du front d'absorbance, en fonction de la vitesse de rotation appliquée, donne le coefficient de sédimentation :

$$s = \frac{1}{\omega^2} \frac{d \ln(r_f)}{dt}$$

où  $r_f$  est la distance au centre de rotation du front d'absorbance. Le coefficient de friction  $f$ , pour une sphère, relié à son rayon  $R$  par l'équation d'Einstein Stokes :

$$f = 6\pi\eta R$$

Ainsi, comme la DLS, cette méthode permet d'obtenir le rayon de la sphère qui aurait le même comportement hydrodynamique. Il est important de noter que ce calcul nécessite une hypothèse de départ sur le degré d'oligomérisation de la molécule en solution : la masse de l'espèce peut être le double de la masse de la molécule dans le cas d'un dimère par exemple. L'ultracentrifugation analytique est aussi un moyen de constater l'homogénéité ou l'hétérogénéité d'un échantillon. En

effet, l'analyse des fronts de migration donne la distribution de quantité de matière en fonction du coefficient de sédimentation. Plusieurs espèces dans un échantillon peuvent être distinguées si elles n'ont pas le même coefficient de sédimentation.

Les méthodes citées ci-dessus, DLS et AUC, donnent accès, entre autre, à une dimension caractéristique des molécules, grâce aux mesures de leurs coefficients hydrodynamiques. Cette dimension, le rayon de Stokes, n'est pas, à proprement parler, une dimension réelle, car elle représente la dimension de la sphère de comportement analogue. Elle est très utilisée, notamment pour comparer les molécules entre elles, et comme premier aperçu de la taille d'une molécule, mais ne doit pas être sur interprétée.

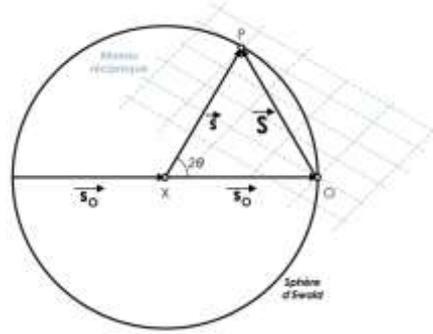
Un volume de 400 $\mu$ L d'échantillon doit être préparé avec une absorbance comprise entre 0,3 et 1. Les complexes sont formés entre 40 et 100 $\mu$ M puis ces échantillons sont dilués jusqu'à environ 6 à 20 $\mu$ M pour atteindre la bonne densité optique. Le tampon ne doit pas contenir de DTT car son absorbance varie en fonction du temps à cause de sa dégradation, du TCEP est utilisée à la place.

## II.7. Etude structurale en cristallographie et en RMN

La cristallographie aux rayons X est une technique physique qui permet de déterminer la structure tridimensionnelle à l'échelle atomique des macromolécules biologiques (protéines et acides nucléiques). Près de 85% des structures tridimensionnelles déposées à la Protein Data Bank (PDB) ont été déterminées par diffraction des rayons X. Contrairement à la Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), autre technique pour déterminer les structures 3D de molécules biologiques, la cristallographie ne présente pas de limitations en taille de la molécule étudiée mais requiert l'obtention de cristaux de la molécule cible. En biologie, la structure est étroitement liée à la fonction et ces études permettent de mieux comprendre le fonctionnement moléculaire des systèmes vivants.

### II.7.1. Principe de la cristallographie aux rayons X

La cristallographie utilise l'interaction élastique cohérente des rayons X avec les électrons des atomes pour obtenir une information structurale à l'échelle atomique. Un échantillon quelconque de volume  $V$  est caractérisé en chaque point de l'espace (repéré par le vecteur  $\vec{r}$ ) par une densité électronique  $\rho(\vec{r})$ . Lorsqu'une onde plane monochromatique, de vecteur d'onde  $\vec{s}$ , interagit avec un échantillon, il y a diffusion dans toutes les directions de l'espace. Pour une direction de diffusion caractérisée par un vecteur d'onde  $\vec{s}'$ , qui fait un angle de  $2\theta$  avec l'onde incidente, l'amplitude et la phase de l'onde diffusée peuvent être représentée par un nombre complexe, appelé facteur de structure  $F$  (figure 26).



**Figure 26 : Schéma illustrant les équations de Laue.** Lorsqu'une onde plane monochromatique, de vecteur d'onde  $\vec{s}_0$ , interagit avec un échantillon, il y a diffusion dans toutes les directions de l'espace. Pour une direction de diffusion caractérisée par un vecteur d'onde  $\vec{s}$ , qui fait un angle  $2\theta$  avec l'onde incidente. Le réseau réciproque est représenté en bleu et la sphère d'Ewald en noir dont le rayon est égal à  $\frac{1}{\lambda} = |\vec{s}_0| = |\vec{s}|$

Pour une direction de diffusion donnée, le facteur de structure s'exprime de manière simple en fonction du vecteur de diffusion  $\vec{S} = \vec{s} - \vec{s}_0$ :

$$F(\vec{S}) = \int_V \rho(\vec{r}) e^{i2\pi(\vec{r}\cdot\vec{S})} d^3r$$

Si l'échantillon considéré est un cristal, c'est-à-dire un arrangement périodique ordonné d'un motif dans l'espace tridimensionnel, nous pouvons montrer que la diffusion est alors restreinte à certaines directions privilégiées de l'espace, nous parlons alors du phénomène de diffraction. Le cristal est décrit par une maille directe définie par trois vecteurs  $(\vec{a}, \vec{b}, \vec{c})$  et une symétrie correspondant à l'un des 230 groupes d'espace. Les conditions de diffraction sont exprimées par les équations de Laue, qui sont satisfaites si le vecteur  $\vec{S}$  est un vecteur du réseau réciproque du cristal construit sur les vecteurs  $\vec{a}^*, \vec{b}^*, \vec{c}^*$ :

$$\vec{S} = h\vec{a}^* + k\vec{b}^* + l\vec{c}^*$$

Avec  $(h,k,l) \in \mathbb{Z}$ . Pour un  $hkl$  donné, le facteur de structure de l'onde diffusée dans la direction  $\vec{s} = \vec{s}_{hkl} + \vec{s}_0$ , sera alors noté  $F_{hkl}$  (nous parlerons alors de la réflexion  $hkl$ ). La connaissance de tous les facteurs de structure  $F_{hkl}$  permet de calculer la fonction de densité électronique correspondante. Cette fonction reflète une distribution continue d'électrons dans la maille cristalline dont les maxima sont interprétés en termes de position atomique. La densité électronique  $\rho(x,y,z)$  en un point de coordonnées relatives  $(x,y,z)$  de la maille cristalline est calculée en théorie par la relation :

$$\rho(x,y,z) = \left(\frac{1}{V}\right) \sum_{h=-\infty}^{+\infty} \sum_{k=-\infty}^{+\infty} \sum_{l=-\infty}^{+\infty} F_{hkl} e^{-i2\pi(hx+ky+lz)}$$

où  $F_{hkl}$  est le facteur de structure de la réflexion  $hkl$  et  $V$  le volume de la maille cristalline. Le facteur de structure, nombre complexe, s'écrit :

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\Phi_{hkl}}$$

où  $|F_{hkl}|$  est le module et  $\Phi_{hkl}$  la phase du facteur de structure pour la réflexion hkl. Le facteur de structure est relié à la nature et à la position des N atomes présents dans la maille par la relation :

$$F_{hkl} = \sum_{j=1}^N q_j f_j w_j e^{2i\pi(hx_j + ky_j + lz_j)}$$

où  $f_j$  est le facteur de diffusion de l'atome j de coordonnées relatives  $(x_j, y_j, z_j)$ ,  $q_j$  le facteur d'occupation,  $w_j$  le facteur de Debye-Waller. Le facteur  $f_j$  caractérise l'interaction du nuage électronique d'un atome j avec les rayons X incidents. Les facteurs  $q_j$  et  $w_j$  appelés facteurs de déplacements atomiques, traduisent le désordre statique et dynamique et le mouvement de chaque atome. Dans la pratique un cristal a une diffraction limitée qui est exprimée par  $S_{\max}$  dans l'espace réciproque, et la densité électronique calculée est :

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl \in \Delta} m_{hkl} |F_{hkl}^{obs}| e^{i\Phi_{hkl}^{calc}} e^{-i2\pi(hx + ky + lz)}$$

où  $\Delta$  correspond à la troncature lié à la limite de diffraction et  $m_{hkl}$  correspond à la figure de mérite. Une structure cristallographique correspond à une double moyennation dans le temps et l'espace, car elle représente la moyenne des structures présentes dans le cristal et pendant le temps de l'expérience. Seules les amplitudes des ondes diffusées sont accessibles à l'expérience, un détecteur ne mesurant pour une réflexion donnée que l'intensité de l'onde diffractée. La collecte des données de diffraction nous permet d'obtenir les module du facteur de structure  $|F_{hkl}|$ .

La détermination de la phase hkl de chaque réflexion constitue l'une des difficultés majeures de la cristallographie, car les ondes diffractées par un cristal ne peuvent pas être refocalisées et les phases sont perdues. Pour résoudre ce problème, les méthodes directes utilisées en cristallographie de petites molécules (quelques centaines d'atomes) ne permettent pas de résoudre directement les structures des macromolécules de grandes tailles. La cristallographie biologique utilise trois grandes techniques pour déterminer les phases : le remplacement isomorphe, la diffusion anormale et le remplacement moléculaire. Les phases connues il est alors possible de calculer la carte de densité électronique  $(x, y, z)$ . Cette carte permet selon la limite de diffraction des données et l'exactitude des phases, de déterminer une première structure de la molécule qui sera ensuite affinée.

## II.7.2. Cristallisation des macromolécules biologiques

Cette partie détaille brièvement les techniques utilisées pour l'obtention de cristaux de macromolécules biologiques à partir d'un échantillon biologique pur.

### II.7.2.1. Principes de la cristallisation

La cristallisation d'une molécule est le passage d'un état liquide à un état solide organisé qui peut être obtenu en faisant varier plusieurs paramètres, comme :

- La nature et la concentration des agents cristallisants. Nous pouvons les séparer en trois familles majoritaires :
  - Les polymères qui agissent par exclusion du solvant au voisinage de la protéine (le Polyéthylène glycol ou PEG est le plus utilisé).
  - Les sels non chaotropiques (non dénaturants pour les protéines) qui modifient la force ionique et augmentent les interactions hydrophobes entre les molécules de protéine en excluant le solvant (le sulfate d'ammonium, les acétates ou les chlorures...).
  - Les solvants organiques qui diminuent la constante diélectrique du milieu (2-Methyl-2,4-Pentanediol ou MPD, isopropanol, dioxane).
- La nature et le pH de la solution tampon,
- La nature et la concentration d'additifs,
- La concentration de la protéine,
- La température,
- La pureté et l'homogénéité de la protéine.

Nous nous limitons souvent à un diagramme de phase bidimensionnel où l'on étudie la variation de la solubilité d'une protéine en faisant varier la concentration en agent précipitant (ou tout autre facteur influençant la solubilité) en fonction de la concentration de protéine. Ce diagramme permet de mettre en évidence l'existence de différentes zones (figure 27) : la zone soluble et la zone de super-saturation composée de trois phases : la région métastable, la nucléation et la précipitation.

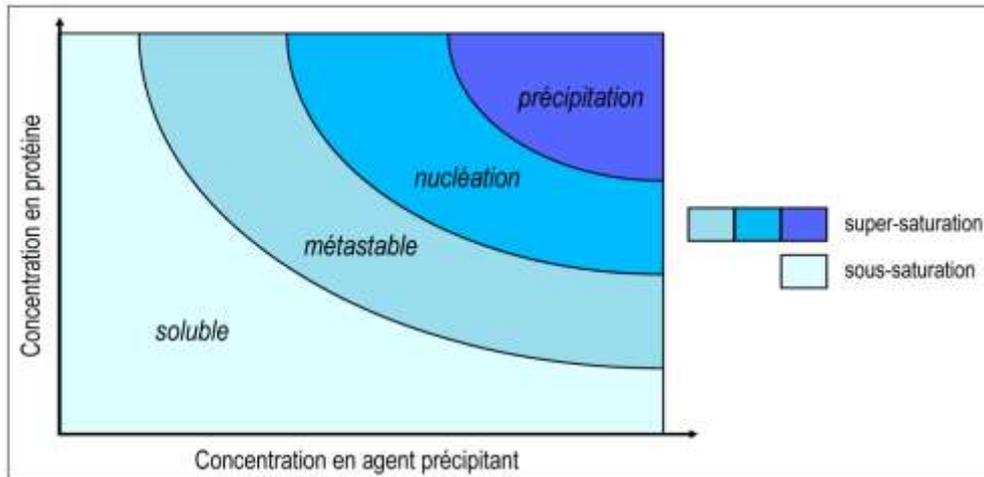


Figure 27 : Diagramme de phase bidimensionnel d'une macromolécule biologique.

La zone de solubilité de la protéine (sous-saturation), est la région où la protéine reste en solution. La zone métastable, est une région où les contraintes thermodynamiques sont favorables à l'apparition d'un précipité ou de germes cristallins (trop petits pour être visible), mais la cinétique est trop lente pour permettre la formation d'un cristal. C'est la zone la plus adaptée à la réalisation des techniques d'ensemencement. La zone de nucléation (ou zone labile), est une zone où la nucléation et la croissance cristalline ont lieu. La formation d'un cristal diminue la concentration en protéine soluble et peut entraîner un passage en zone métastable. Enfin, La zone de précipitation (qui appartient également à la zone de sursaturation), est une région où les conditions provoquent l'apparition d'un précipité amorphe ou cristallin.

La zone de solubilité et celle de sursaturation sont séparées par la courbe de saturation : condition d'équilibre où un cristal ajouté à la solution ne pourra ni croître ni se dissoudre. Le but d'une expérience de cristallisation est d'essayer de placer la protéine dans des conditions permettant l'apparition d'un minimum de germes cristallins en temps raisonnable, c'est-à-dire de quelques heures à quelques semaines.

### II.7.2.2. La diffusion de vapeur en gouttes assises et suspendues

La technique de cristallisation de diffusion de vapeur est l'une des plus utilisées {McPherson, 1995 #993}. Elle peut se faire en gouttes suspendues où en gouttes assises (figure 28). Une goutte de protéine purifiée est mélangée à une goutte de la solution du réservoir, qui contient l'agent précipitant et généralement des additifs. La goutte ainsi formée est placée en présence du réservoir dans une enceinte fermée hermétiquement ce qui va permettre la diffusion de vapeur entre la goutte et le réservoir. Dans le cas des gouttes assises, la goutte est placée sur un support dans l'enceinte contenant le réservoir. Dans les cas des gouttes suspendues, la goutte est placée

directement sur une lamelle siliconée (pour éviter que la goutte ne s'étale), qui est alors retournée sur un puits hermétiquement fermé par un ménisque de paraffine liquide. Une fois l'enceinte close, des échanges par diffusion de vapeur vont permettre le retour à l'équilibre entre la goutte et le réservoir. Le but étant d'atteindre l'état de sursaturation en fonction des effets indépendants de déshydratation et de diminution de la solubilité. La cinétique de mise à l'équilibre entre la goutte et le réservoir sera différente selon la technique utilisée, en goutte suspendue ou en goutte assise, et selon le cas l'une ou l'autre peut être plus favorable à la cristallisation d'une protéine.

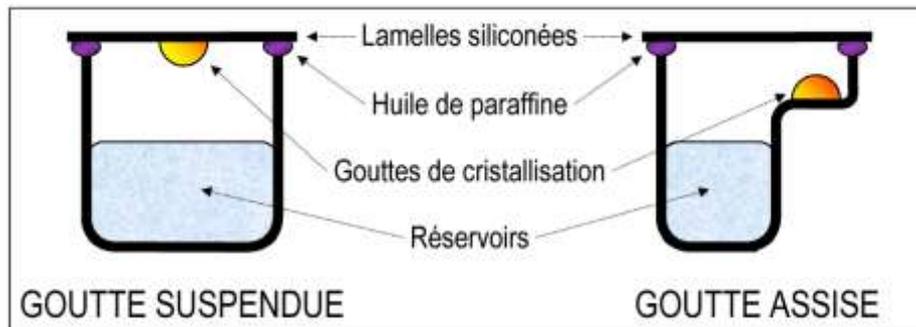


Figure 28 : Comparaisons des techniques de cristallisation en goutte suspendue et assise

### II.7.2.3. Détermination de conditions de cristallisation

Pour déterminer les conditions de cristallisation d'un échantillon biologique, nous réalisons dans un premier temps un criblage généraliste. Au laboratoire, la plate-forme de biologie structurale mais à disposition 14 cribles « non exhaustifs » commerciaux, ce qui représente environ 1400 conditions différentes. Ces cribles ont été conçus à partir de statistiques historiques de cristallisation. Nous testons généralement plusieurs températures et différentes concentrations protéiques.

Les criblages généralistes sont réalisés sur le robot de cristallisation du laboratoire Mosquito®. Ce robot nous permet de faire des gouttes assises de petit volume, de 100 à 500 nL et un réservoir de 10-70 µL. Les gouttes sont réalisées sur des boîtes de 96 conditions (Swissci®, Greiner® et Corning®). Un grand nombre de conditions peuvent donc être testées en utilisant de faibles quantités d'échantillon biologique. Les boîtes peuvent être stockées soit dans les chambres à 4, 17 et 37°C, soit dans le formulatrix à 20°C

#### Optimisation de conditions de cristallisation :

Lorsque des premières conditions de cristallisation sont obtenues par criblage généraliste en utilisant le robot de cristallisation, généralement les cristaux diffractent mal. Pour améliorer les cristaux nous réalisons manuellement des gouttes de plus grand volume (de 0,5 à 2 µL) sur des boîtes 24 conditions (VDX et Cryschem de Hampton Research®). Dans un premier temps, la reproduction des cristaux obtenus par criblage généraliste est une première réussite car les conditions

physicochimiques ne sont pas directement transposables du système robotisé aux gouttes manuelles.

Ensuite un grand nombre de facteurs doivent être pris en compte pour optimiser la cristallisation, gradients de concentration, de l'échantillon et/ou des agents présents dans le réservoir, ratios et volumes des gouttes échantillon/réservoir, volume du réservoir, température (McPherson and DeLucas, 1999).

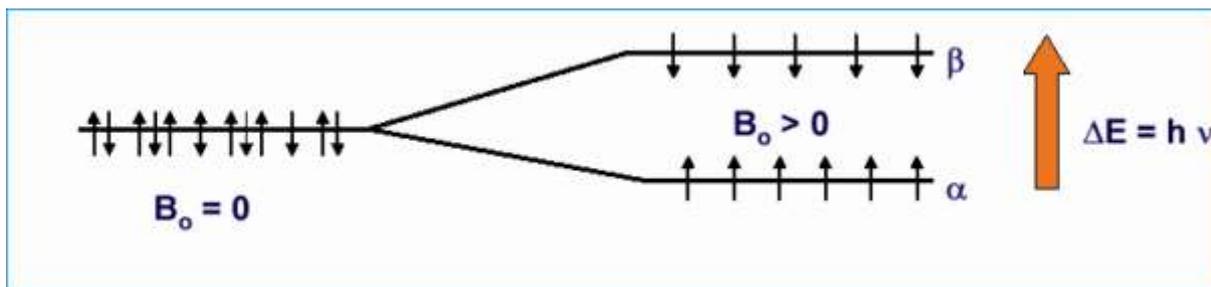
Pour diriger ou influencer la cristallisation par diffusion de vapeur, nous avons utilisé les techniques d'ensemencement. L'intérêt de l'ensemencement est de favoriser la croissance cristalline en s'affranchissant de l'étape de nucléation. Le principe consiste à introduire des germes cristallins (micro-ensemencement) ou un monocristal (macro-ensemencement) dans une goutte de cristallisation pré-équilibrée pour se trouver dans la zone métastable. Cette technique impose toutefois l'obtention préalable de cristaux, même s'ils sont de mauvaise qualité, l'ensemencement pouvant améliorer les cristaux.

### **II.7.3. Principe de la RMN**

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est un phénomène physique très largement utilisé, notamment en imagerie médicale (IRM) où la résonance des protons de l'eau est utilisée pour visualiser les tissus mous. Dans le cas de la RMN des protéines, ce sont également les atomes d'hydrogènes qui sont étudiés, ainsi que les atomes de carbone et d'azote. Tout d'abord, nous devons produire un échantillon marqué au carbone 13 et à l'azote 15, puis enregistrer des spectres di- et tridimensionnels pour finalement assigner les résonances de chaque atome de la protéine et en déduire ainsi la structure de la protéine.

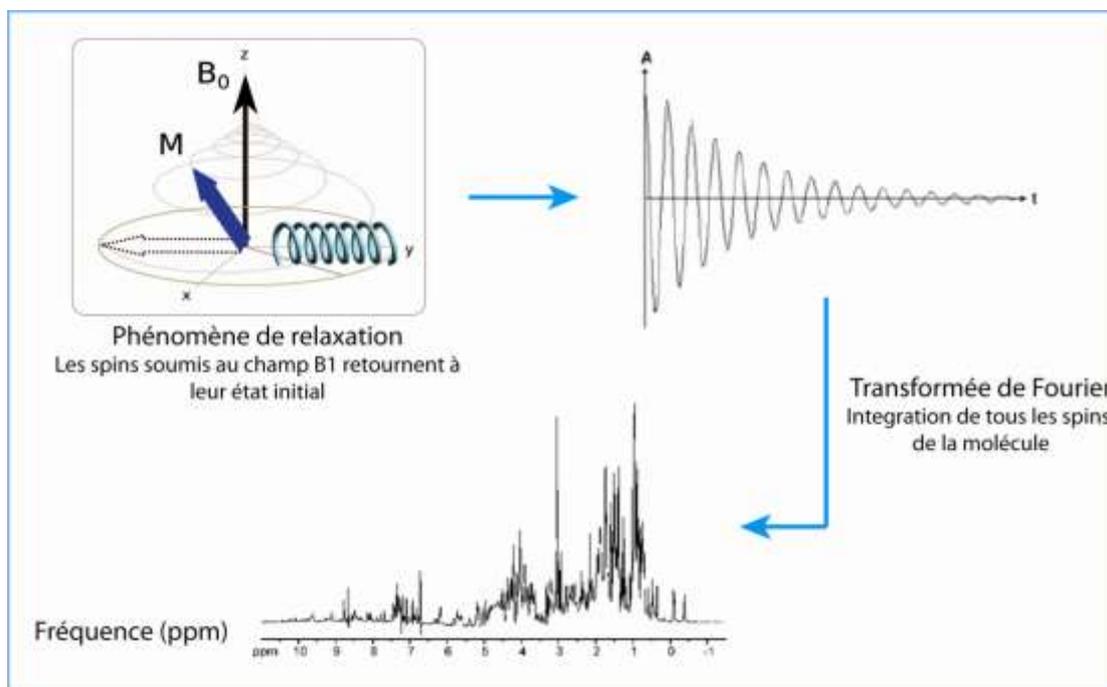
#### **II.7.3.1. Principe**

La résonance magnétique nucléaire utilise une propriété des atomes possédant un spin égal à  $\frac{1}{2}$ , ces spins étant répartis en deux états de spin  $+\frac{1}{2}$  et  $-\frac{1}{2}$  sous l'effet d'un champ électromagnétique (Figure 29). Différents atomes peuvent être considérés pour réaliser ces mesures et notamment l'hydrogène  $^1\text{H}$ , le carbone  $^{13}\text{C}$  et l'azote  $^{15}\text{N}$ . Lorsque ces atomes sont placés dans un champ magnétique  $B_0$  chaque état de spin va correspondre à un niveau d'énergie (figure 29), la fréquence ou moment cinétique de chacun de ces spins est alors fonction du champ  $B_0$ .



**Figure 29 : Etat des spins nucléaires en absence et en présence d'un champ magnétique.** Un atome de spin  $\frac{1}{2}$  (cas de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  et  $^{15}\text{N}$ ) possède deux états de spin :  $+\frac{1}{2}$  et  $-\frac{1}{2}$  (cas  $B_0=0$ ) en l'absence de champ magnétique. Lorsque cet atome est placé dans un champ magnétique (cas  $B_0>0$ ), chaque état de spin va adopter un niveau d'énergie, l'état de plus faible énergie présentant un léger excès de population. L'impulsion nécessaire au passage des spins des niveaux de basse énergie vers les niveaux de haute énergie est égale à  $\Delta E=h\nu$  et est fonction de l'atome considéré.

Au cours d'une expérience de RMN, l'échantillon soumis au champ initial  $B_0$  va être soumis par impulsion à un second champ magnétique  $B_1$  perpendiculaire au champ  $B_0$ . L'énergie  $\Delta E$  de cette impulsion est égale à la différence entre les deux niveaux d'énergie. Cette seconde impulsion va rompre l'équilibre qui existe entre les spins peuplant les deux niveaux d'énergie, induisant une augmentation de la population du niveau d'énergie le plus élevé. Le phénomène de relaxation décrit le retour des spins de basse énergie à leur état initial (figure 30).



**Figure 30 : Mesure et exploitation du phénomène de relaxation.** Le retour du spin à son niveau initial va induire des fluctuations de la magnétisation dans le temps qui vont être enregistrés. La transformée de Fourier va permettre de transformer le signal afin qu'il soit exploitable (exprimé en en partie par million ou ppm).

C'est la fréquence de résonance des spins au cours du phénomène de relaxation qui est mesurée au cours de l'expérience de RMN (mesurée en Hertz). Le déplacement chimique  $\delta$  (en partie par million, ppm) va être déduit de la fréquence de résonance du noyau considéré. L'environnement chimique de l'atome considéré, va fortement influencer ce déplacement. Le signal enregistré va donc contenir les informations de tous les noyaux excités présents dans la molécule. La Transformée de Fourier va être utilisée pour extraire le signal de chaque proton du signal sigmoïdal obtenu (figure 30).

### **II.7.3.2. Préparation de l'échantillon et enregistrement des spectres**

La protéine TCTP marquée avec du  $^{13}\text{C}$  et du  $^{15}\text{N}$  est produite puis purifiée selon les protocoles décrits précédemment. Le tampon de lyse utilisé contient 50mM NaCl et 10mM d'un tampon tris à pH8. La mesure de spectre RMN va nécessiter 300 $\mu\text{L}$  d'échantillon à environ 100 $\mu\text{M}$  auquel 10% d'eau deutérée (D2O) est ajouté. Après centrifugation, l'échantillon est placé dans un tube fin en verre de type Shigemi, l'échantillon devant avoir une hauteur de 5cm dans ce tube. Le tube est alors placé dans un spectromètre Bruker 700MHz. Les spectres sont enregistrés à 303K à la température d'incubation de 30°C.

Les spectres sont enregistrés à deux dimensions  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  et  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  qui vont permettre d'observer la corrélation entre les atomes d'azote et d'hydrogène et de carbone et d'hydrogène respectivement. Dans le spectre  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ , un pic de corrélation est observé pour chaque groupement amide de la liaison peptidique (un pic par résidu) ainsi que pour les chaînes latérales des résidus possédant des groupements amides (asparagine, glutamine, tryptophane). Ce spectre constitue la signature d'une protéine.



## III. Isolation du complexe TCTP/Bcl-xl

---

Notre objectif consiste à isoler le complexe TCTP/Bcl-xl sans impuretés et en quantité suffisante afin de réaliser des études biophysiques et structurales. Ces données apporteraient un nouvel éclairage sur le mode d'action de TCTP avec son partenaire anti-apoptotique Bcl-xl, et plus généralement une meilleure compréhension du rôle de TCTP dans la cellule.

Ce complexe a été détecté *in vitro* et *in vivo* par co-immunoprécipitation. Des GST pull down ont permis de déterminer les zones d'interactions entre TCTP et Bcl-xl mettant en jeu la partie N-terminale de TCTP et le domaine BH3 de Bcl-xl (Yang et al., 2005). Cependant, ce complexe n'a toujours pas été isolé *in vitro*, ni caractérisé au niveau atomique. Deux méthodes de purification sont couramment utilisées au laboratoire dans le but de mettre en évidence des complexes : la co-expression et la co-purification.

### III.1. Etude en co-expression du complexe TCTP/Bcl-xL

La co-expression consiste à exprimer les deux protéines d'intérêts dans les mêmes bactéries (*E.Coli* pRare2) ce qui favorise leur solubilité et ainsi la formation du complexe (Romier et al., 2006).

Une des deux protéines porte une étiquette afin d'être récupérée par des billes d'affinité au cours de la purification. Si son partenaire est également récupéré, cela signifie alors que les deux protéines interagissent ensemble (voir partie II.3.2.2).

#### III.1.1. Minitests de co-expression

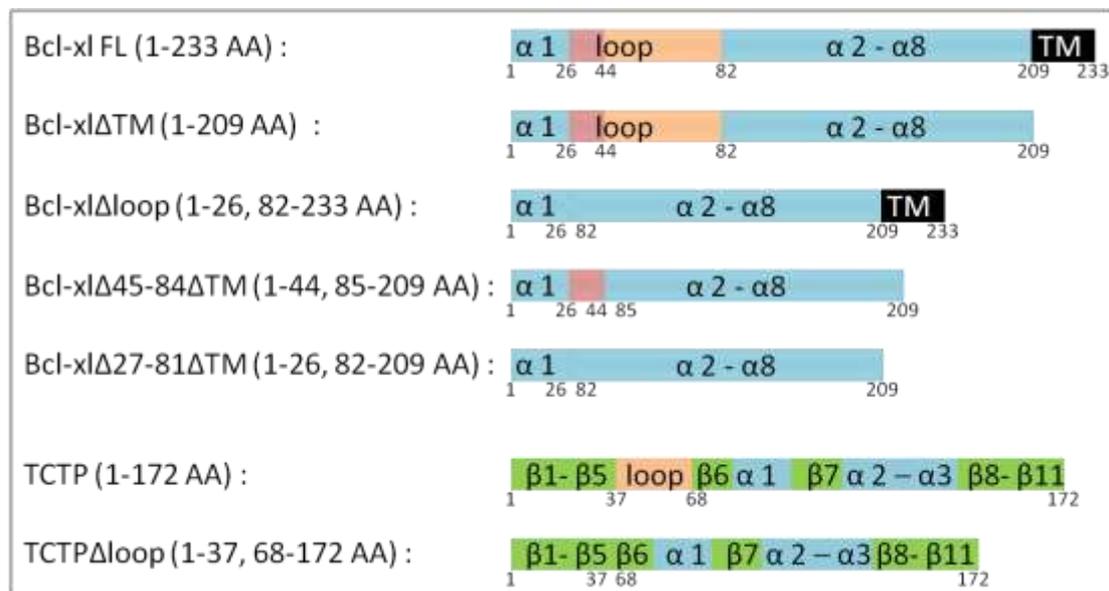
Dans le but d'identifier les domaines d'interactions entre les partenaires, des tests de co-expression à petite échelle, appelés « des minitests », sont effectués. Ce procédé est utilisé en routine au laboratoire et permet un criblage à haut débit de différentes constructions sur une courte période de temps. Un protocole a été mis en place (voir la partie II.3.1 du chapitre Matériel et Méthodes) où les conditions de culture, d'induction, d'incubation avec les billes d'affinité sont fixées et certaines étapes sont même robotisées. Pour toutes les constructions, deux tampons ont été testés : 50 mM NaCl et 400mM NaCl avec 10mM Tris pH=8, afin d'évaluer l'effet de la salinité sur la solubilité des complexes.

##### III.1.1.1. Constructions de Bcl-xl et de TCTP utilisées

Les constructions de Bcl-xl ont été élaborées en fonction des régions ordonnées prédites par Globprot et des domaines déjà cristallisés et disponibles dans la PDB (Protein Data Bank). Bcl-xl possède une boucle flexible entre les hélices  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$  ainsi qu'une hélice transmembranaire  $\alpha 9$

nommée « TM ». Les vecteurs mis au point codent pour la protéine entière ainsi que pour la protéine dépourvue de ses parties déstructurées et transmembranaire : Bcl-xl FL, Bcl-xl $\Delta$ TM, Bcl-xl $\Delta$ 27-81, Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM (voir figure 31). Par exemple, Bcl-xl $\Delta$ TM correspond à la construction de Bcl-xl sans sa partie transmembranaire.

Pour TCTP qui est une protéine dotée d'une grande boucle désordonnée et d'une région compacte formée de 11 brins  $\beta$  et de 3 hélices  $\alpha$ , nous avons généré des vecteurs codant pour TCTP entière et TCTP privée de sa boucle : TCTP FL et TCTP $\Delta$ loop (voir figure 31). L'ensemble des constructions élaborées de Bcl-xl et de TCTP est résumé dans la figure 31.



**Figure 31 : Constructions de Bcl-xl et de TCTP mises au point pour les minitests.** Dans cette figure, les hélices  $\alpha$  sont représentées en bleu clair, les brins  $\beta$  en vert, la partie transmembranaire en noir et les régions déstructurées en rose.

Suivant les vecteurs utilisés, ces constructions peuvent être fusionnées en N terminale ou en C terminale à différents tags : His, GST et His-MBP. Il faut noter que ces étiquettes peuvent avoir une influence dans la purification et la solubilisation des complexes (voir Matériel et Méthodes).

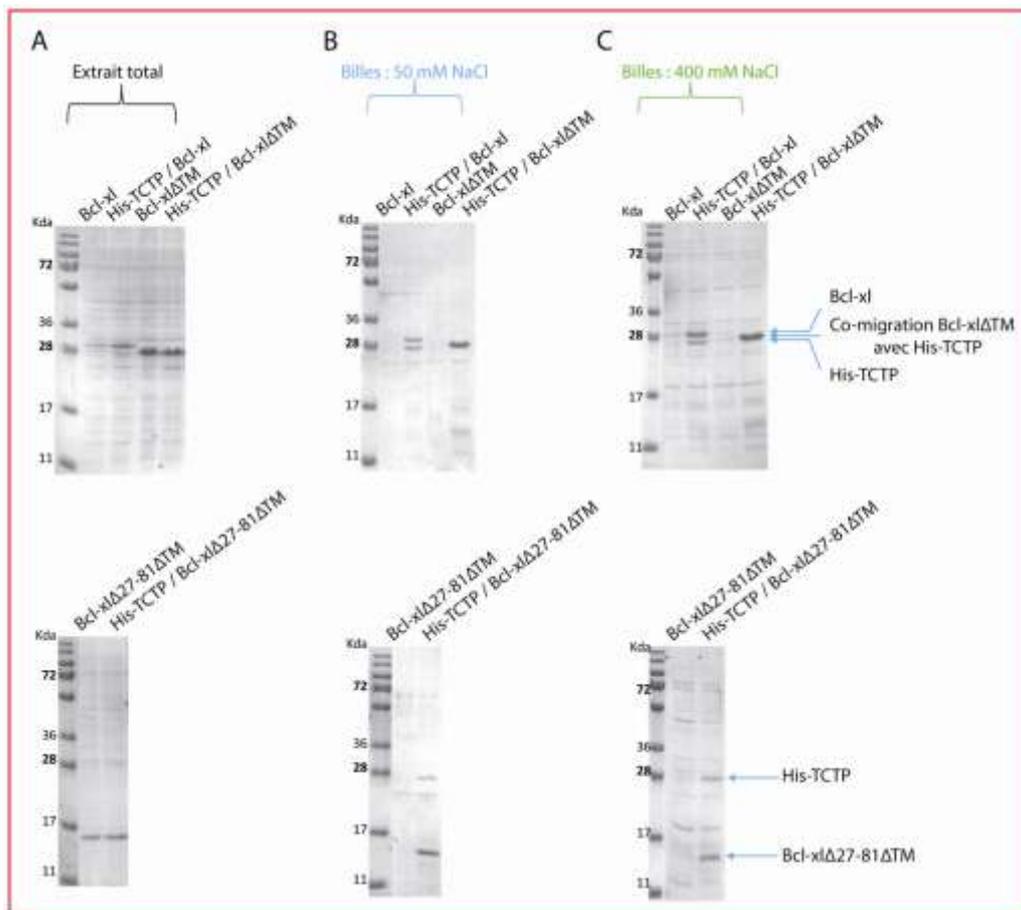
### III.1.1.2. Co-expression dans les bactéries

Nous avons effectué, grâce au criblage à haut débit, un large panel de tests avec un grand nombre de constructions afin de mettre en évidence celles qui favorisent la formation de complexes. Par soucis de clarté, tous les minitests ne sont pas présentés, seulement ceux révélant un résultat positif ou intéressant.

Nous analysons sur gel dénaturant l'extrait total des minitests de co-expression ainsi que les protéines qui sont retenues sur les billes d'affinité. D'un côté l'extrait total, qui correspond aux parties soluble et insoluble des bactéries, est déposé sur gel dénaturant de façon à s'assurer que les

protéines sont bien exprimées dans les bactéries. En effet, il est crucial de vérifier que le partenaire sans étiquette soit bien exprimé sinon il s'avère difficile de conclure sur l'interaction. D'un autre côté, les billes d'affinité, qui ont servi à extraire la protéine portant l'étiquette, sont lavées et recouvertes de bleu de laemmli qui est ensuite déposé sur gel dénaturant afin de visualiser le complexe.

Minitests avec His-TCTP et les constructions respectives : Bcl-xl, Bcl-xl $\Delta$ TM et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM :



**Figure 32 : Minitests de co-expression dans les bactéries 1.** SDS-PAGE présentant les minitests de co-expression entre His-TCTP et les constructions respectives : Bcl-xl, Bcl-xl $\Delta$ TM et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM ainsi que les minitests d'expression des protéines seules : Bcl-xl, Bcl-xl $\Delta$ TM et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. L'extrait total des minitests est visualisé dans la figure 32.A, les protéines retenues sur la résine TALON à 50mM NaCl dans la figure 32.B et les protéines retenues sur la résine TALON à 400mM NaCl dans la figure 32.C.

La figure 32 présente les résultats obtenus pour les minitests de co-expression entre His-TCTP et les trois formes de Bcl-xl : Bcl-xl FL, Bcl-xl $\Delta$ TM et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. De plus, les protéines natives (sans étiquette) ont été exprimées afin de vérifier qu'elles n'interagissent pas de manière non spécifique avec les billes TALON.

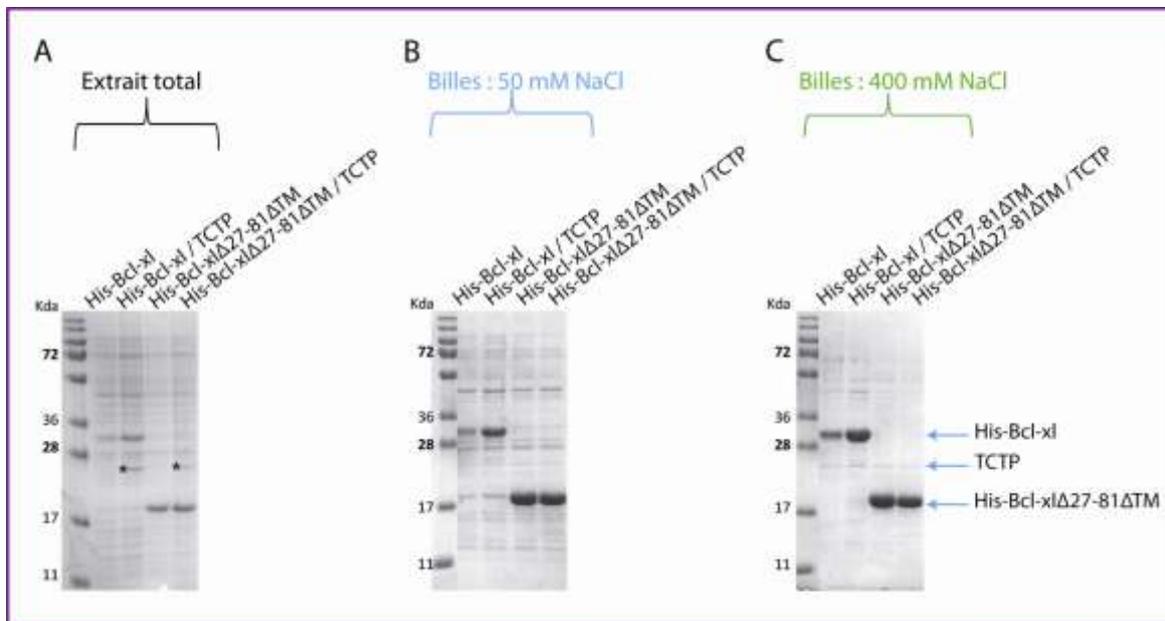
Les extraits totaux montrent que les constructions de Bcl-xl et de His-TCTP sont bien exprimées, bien que His-TCTP révèle une bande de faible intensité (voir figure 32.A). Lorsque Bcl-xl

FL, Bcl-xl $\Delta$ TM et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM sont exprimées seules, elles ne sont pas retenues sur les billes TALON (voir figures 32.B et 32.C), par conséquent ces protéines ne se lient pas à la résine de manière aspécifique.

Lorsque His-TCTP est co-exprimée avec Bcl-xl ou Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, deux bandes sont visualisées sur les gels SDS-PAGE des figures 32.B et 32.C : une bande correspondant à His-TCTP en-dessous de 28 Kda, une bande au-dessus de 28 Kda pour Bcl-xl FL et une autre en-dessous de 17 Kda pour Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. D'après les contrôles, Bcl-xl FL et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM ne sont pas retenues sur les billes, nous pouvons donc conclure que His-TCTP interagit avec Bcl-xl et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM dans les bactéries. Pour la co-expression entre His-TCTP et Bcl-xl $\Delta$ TM, une seule bande est visible et migre légèrement au-dessus de His-TCTP, voir figures 32.B et 32.C. Il pourrait s'agir d'une co-migration avec Bcl-xl $\Delta$ TM.

La salinité du tampon ne semble pas jouer un rôle dans la co-expression des complexes. Des résultats similaires sont obtenus avec des minitests de co-expression exprimant TCTP fusionnée à une étiquette His en C terminale (voir annexe 10.B).

Minitests avec TCTP et les constructions respectives : His-Bcl-xl, His-Bcl-xl $\Delta$ TM et His-Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM :

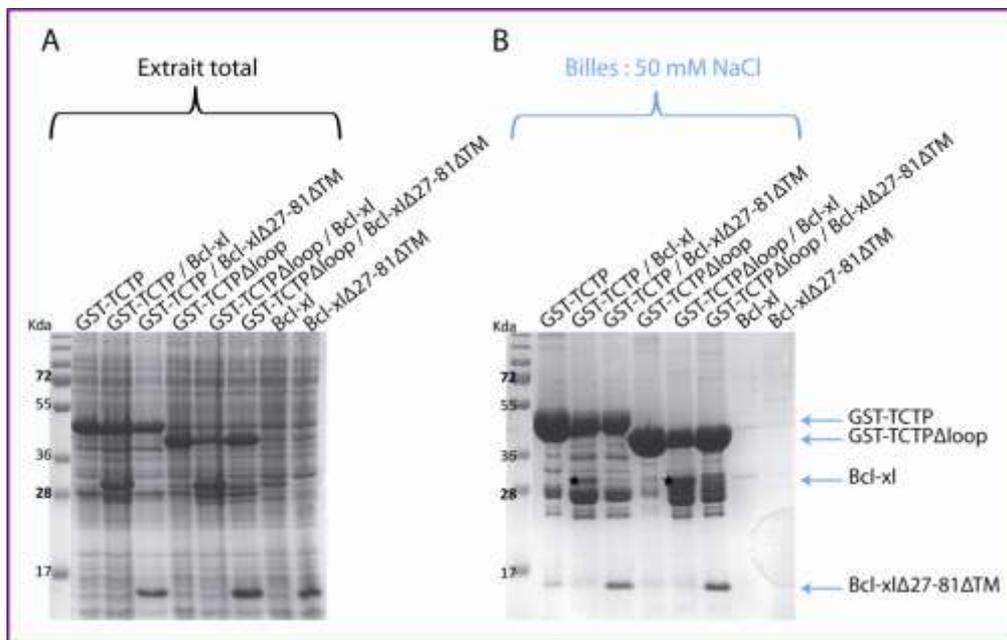


**Figure 33 : Minitests de co-expression dans les bactéries 2.** SDS-PAGE présentant les minitests de co-expression entre TCTP et respectivement His-Bcl-xl et His-Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, ainsi que les minitests d'expression des protéines seules : His-Bcl-xl et His-Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. L'extrait total des minitests est visualisé dans la figure 33.A, les protéines retenues sur les billes TALON à 50mM NaCl dans la figure 33.B et les protéines retenues sur les billes TALON à 400mM NaCl dans la figure 33.C.

La figure 33 montre des minitests de co-expressions où nous avons changé les étiquettes de partenaires, TCTP est co-exprimée respectivement avec deux formes de Bcl-xl portant un tag His : His-Bcl-xl et His-Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. D'après les extraits totaux de la figure 33.A, toutes les protéines sont bien exprimées. Dans les figures 33.B et 33.C, où His-Bcl-xl et His-Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM sont co-exprimées avec TCTP, une seule bande est visualisée correspondant aux protéines fusionnées à l'étiquette His, d'après les expressions des protéines seules. Dans ces conditions, TCTP n'interagit ni avec His-Bcl-xl, ni avec His-Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM dans les bactéries. D'après les expériences précédentes (figure 32), His-TCTP interagit avec Bcl-xl et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, ainsi l'ajout du tag His sur Bcl-xl et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM ou le retrait de l'étiquette His de TCTP a une influence sur la formation de ces complexes. Ces co-expressions n'ont pas été étudiées par la suite.

Une augmentation de la salinité n'a pas d'influence sur la solubilité de ces complexes, donc une seule condition de sels sera montrée par la suite, celle à 50mM NaCl. Aucun changement n'est observé lorsque Bcl-xl $\Delta$ TM et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM sont co-exprimées fusionnées à un tag His en C terminale (voir annexe 10.A). Des minitests d'expression entre TCTP et les différentes formes de Bcl-xl sont également réalisés avec l'étiquette GST (voir annexe 10.C et ci-dessous).

Minitests avec GST-TCTP et GST-TCTP $\Delta$ loop avec les constructions : Bcl-xl et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM :



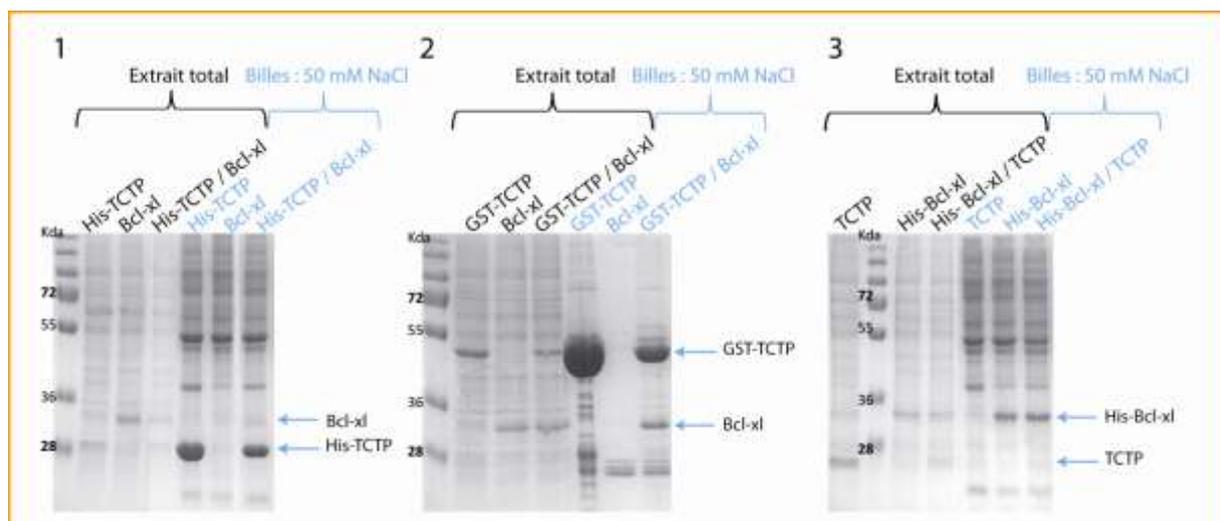
**Figure 34 : Minitests de co-expression dans les bactéries 3.** SDS-PAGE présentant les minitests de co-expression GST-TCTP/Bcl-xl, GST-TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, GST-TCTP $\Delta$ loop/Bcl-xl et GST-TCTP $\Delta$ loop/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, et les minitests d'expression des protéines seules : GST-TCTP et GST-TCTP $\Delta$ loop. L'extrait total des minitests est visualisé dans la figure 34.A et les protéines retenues sur les billes glutathion-sépharose à 50mM NaCl dans la figure 34.B.

Dans la figure 34.B, lorsque nous comparons les co-expressions de GST-TCTP/Bcl-xl et de GST-TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM avec l'expression de GST-TCTP seule, nous voyons deux nouvelles bandes apparaître correspondants à Bcl-xl et à Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. Ainsi, lorsque l'étiquette His de TCTP est remplacée par GST, les interactions entre TCTP et ses deux partenaires Bcl-xl et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM sont conservées. La nature de l'étiquette n'a pas d'effet sur l'interaction, tant que celle-ci demeure sur TCTP. Nous avons voulu voir si la boucle de TCTP est impliquée dans l'interaction avec Bcl-xl et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. Dans la figure 34.B, en comparant l'expression de GST-TCTP $\Delta$ loop seule avec les co-expressions GST-TCTP $\Delta$ loop/Bcl-xl et GST-TCTP $\Delta$ loop/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, deux nouvelles bandes apparaissent correspondantes à Bcl-xl et à Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, bien que la bande de Bcl-xl soit difficilement visible (voir astérisque dans la figure 34.B). Par conséquent, GST-TCTP $\Delta$ loop interagit avec Bcl-xl et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM dans les bactéries et la boucle de TCTP ne semble pas intervenir dans ces interactions.

### III.1.1.3. Co-expression dans les cellules d'insectes

Bcl-xl et TCTP sont des protéines hautement régulées par des modifications post-traductionnelles (Beverly, 2012; Cucchi et al., 2010). Ces changements peuvent être impliqués dans la formation des complexes, d'où l'importance de réaliser des minitests de co-expression dans les cellules d'insectes. Des bacmides contenant les constructions His-TCTP, GST-TCTP, His-Bcl-xl, Bcl-xl et TCTP ont été utilisés pour infecter les cellules d'insectes.

Minitests avec His-TCTP et Bcl-xl, GST-TCTP et Bcl-xl, ainsi qu'entre His-Bcl-xl et TCTP



**Figure 35 : Minitests de co-expression dans les cellules d'insectes 1.** L'extrait total et les protéines retenues sur les billes à 50mM NaCl, des minitests entre His-TCTP et Bcl-xl sont visualisés sur gel dénaturant de la figure 35.1. C'est la même chose pour les minitests entre GST-TCTP et Bcl-xl dans la figure 35.2, et pour les minitests entre His-Bcl-xl et TCTP dans la figure 35.3.

Les extraits totaux montrent que l'ensemble des protéines est bien exprimé dans les cellules d'insectes. Nous remarquons dans la figure 35.2 que GST-TCTP retient clairement Bcl-xl sur les billes glutathion-sépharose tandis que, dans la figure 35.1, His-TCTP récupère très légèrement Bcl-xl sur les billes TALON-Co<sup>2+</sup>. De même dans la figure 35.3, His-Bcl-xl retient très faiblement TCTP sur la résine. En conclusion, uniquement GST-TCTP interagit clairement avec Bcl-xl dans les cellules d'insectes.

La prochaine étape consiste à reproduire à grande échelle les minitests qui se sont révélés positifs ou intéressants. Comme aucune grande différence ne se démarque entre les minitests dans les bactéries et dans les cellules d'insectes, l'expression à grande échelle a été réalisée dans le système d'expression le moins coûteux : les bactéries.

### **III.1.2. Expression à grande échelle**

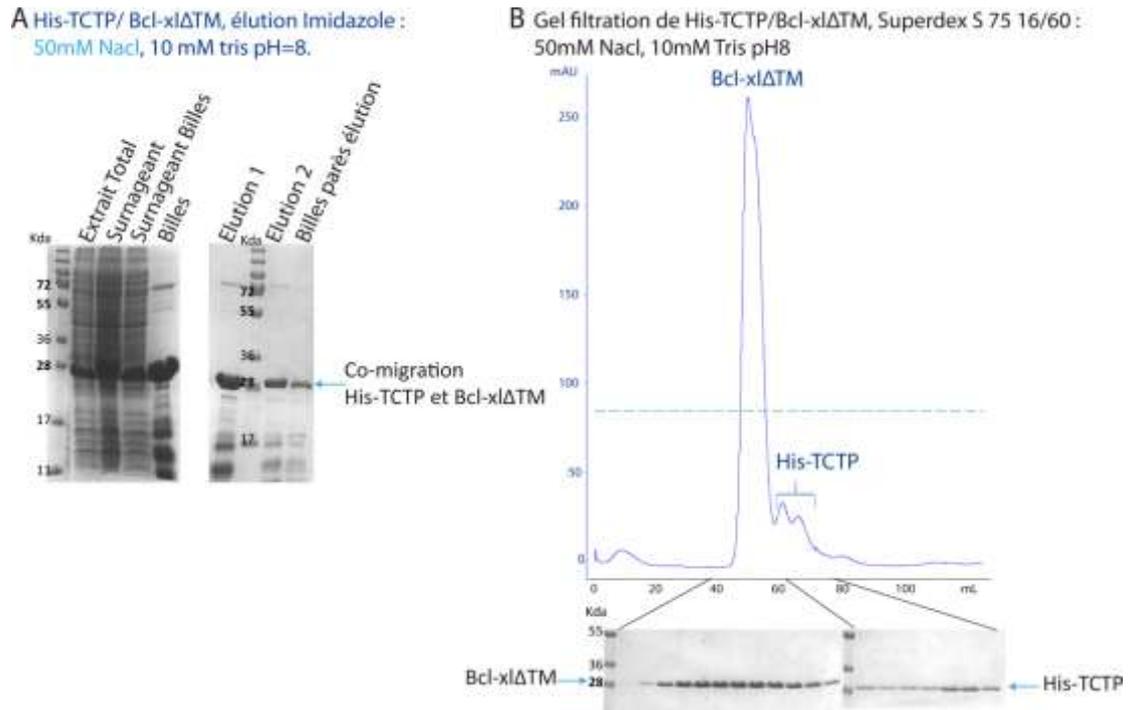
Les minitests étant positifs pour His-TCTP/Bcl-xl $\Delta$ TM, His-TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et His-TCTP/Bcl-xl, nous avons poursuivi à plus grande échelle et optimisé les conditions de cultures de ces co-expressions.

#### **III.1.2.1. Etude du complexe His-TCTP/Bcl-xl $\Delta$ TM**

En vue d'isoler le complexe entre His-TCTP et Bcl-xl $\Delta$ TM, nous avons co-exprimé ces protéines dans 1L de bactéries. La purification du complexe s'est déroulée en deux étapes : dans un premier temps le complexe a été extrait par des billes Ni-NTA puis les espèces ont été éluées à l'imidazole et chargées sur une colonne d'exclusion de taille.

Similairement aux minitests de co-expression, une seule bande est visualisée tout le long de la purification sur le gel dénaturant de la figure 36.A.

Le profil du chromatogramme d'exclusion de taille est assez particulier car plusieurs pics de fortes intensités sont présents aux hauts poids moléculaires, et deux petits pics aux plus faibles poids moléculaires. Ne pouvant pas différencier les deux espèces sur gel dénaturant (voir figure 36.B), nous avons eu recours à la spectrométrie de masse (ESI-TOF) pour analyser les fractions d'élution de la colonne d'exclusion.



**Figure 36 : Purification de His-TCTP/Bcl-x1ΔTM.** Le Gel dénaturant de la figure 36.A montre les étapes de purification du complexe His-TCTP/Bcl-x1ΔTM : l'extrait total, l'extrait soluble (Surnageant), les protéines non retenues sur les billes Ni-NTA (Surnageant Billes), les protéines retenues sur les billes, les éluions à l'imidazole et les billes après élution. Les fractions du chromatogramme d'exclusion de taille sont déposées sur gel dénaturant dans la figure 36.B.

Contrairement à ce qui est attendu, l'espèce la plus présente est Bcl-x1ΔTM dans les pics principaux tandis que His-TCTP n'est détectée que dans les petits pics.

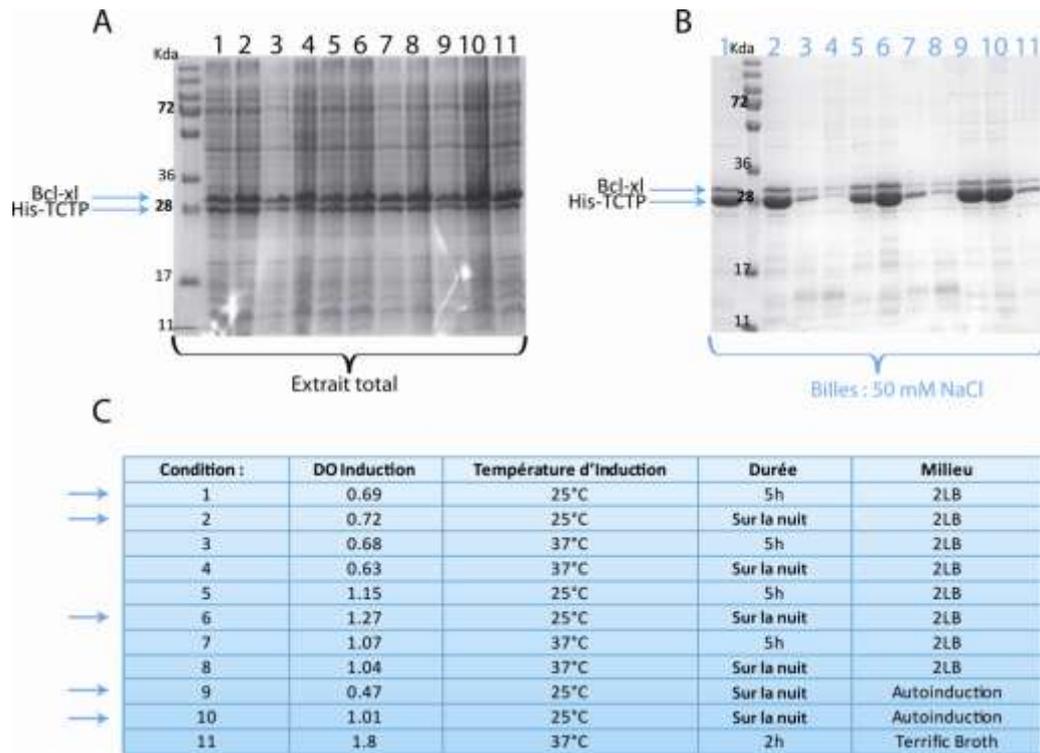
En conclusion, His-TCTP se lie bien à son partenaire Bcl-x1ΔTM en co-expression, mais ces protéines ne forment pas un complexe stable et facilement isolable sur colonne d'exclusion de taille. Nous n'avons donc pas poursuivi dans cette voie et nous nous sommes focalisés sur les complexes His-TCTP/Bcl-xl et His-TCTP/Bcl-x1Δ27-81ΔTM.

### III.1.2.2. Etudes des complexes His-TCTP/Bcl-xl et His-TCTP/Bcl-x1Δ27-81ΔTM

Les complexes His-TCTP/Bcl-xl et His-TCTP/Bcl-x1Δ27-81ΔTM ont été identifiés sur colonne d'exclusion de taille. Nous avons ensuite cherché à optimiser les conditions de culture et de purification de ces complexes afin d'en produire le plus possible.

#### III.1.2.2.1. Optimisation des conditions de cultures

Les deux complexes se comportant de manière similaire, les résultats concernant uniquement le complexe His-TCTP/Bcl-xl sont exposés. Pour obtenir le complexe His-TCTP/Bcl-xl en grande quantité, différentes conditions de cultures ont été testées.



**Figure 37 : Gels dénaturants et tableau montrant les différents tests de cultures réalisés sur His-TCTP/Bcl-xl.**

Dans la figure 37.A, le gel dénaturant des extraits totaux montre que les protéines sont exprimées dans les mêmes proportions pour l'ensemble des différentes conditions de culture. Néanmoins dans la figure 37.B, la quantité de complexe retenu sur les billes TALON à 50mM NaCl varie en fonction des conditions de culture, indiquant qu'elles ne favorisent pas toutes la solubilisation des protéines.

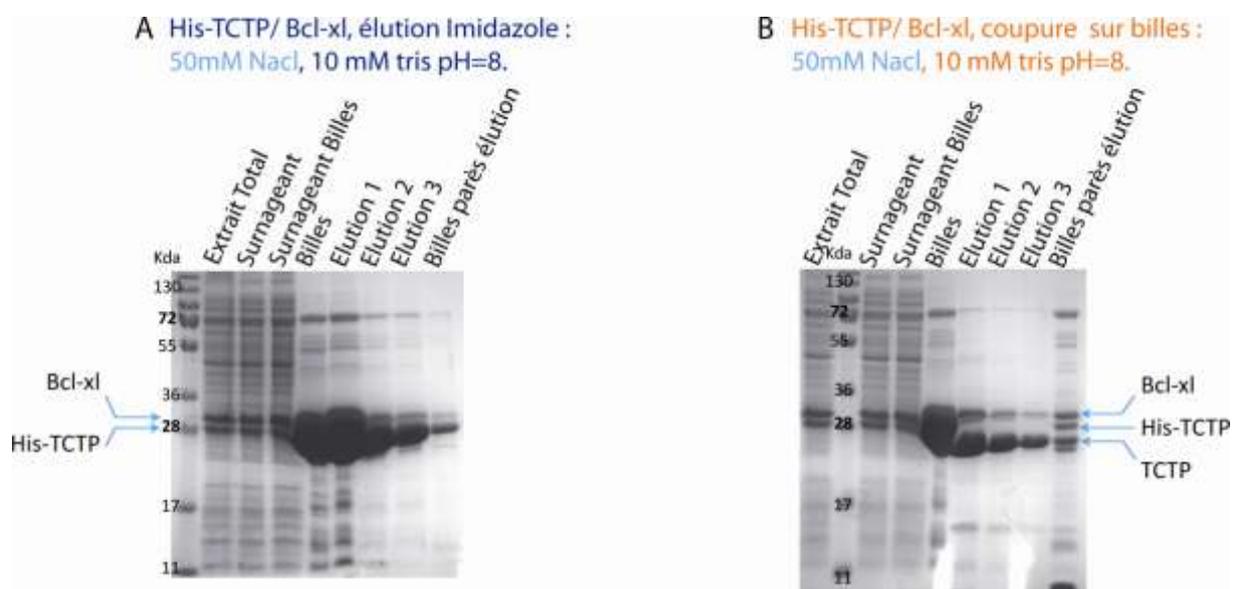
Ces expériences montrent que l'expression du complexe dans les bactéries est sensible à la température d'induction, puisqu'à 37°C (dans les conditions 3 et 4), peu de protéines sont retenues sur la résine contrairement à 25°C (dans les conditions 1 et 2), voir figure 37.B. La DO d'induction n'est pas un facteur déterminant, car à 0,47 ou à 1,01 (dans les conditions 9 et 10), il y a autant de complexe sur la résine. En revanche, une longue durée d'incubation favorise une plus grande production de complexes, si nous comparons les conditions 5 et 6.

### III.1.2.2.2. Purification des complexes His-TCTP/Bcl-xl et His-TCTP/ Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM

Une fois les conditions de cultures mises au point, nous avons réalisé des cultures de bactéries (1L) de His-TCTP/Bcl-xl et de His-TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM.

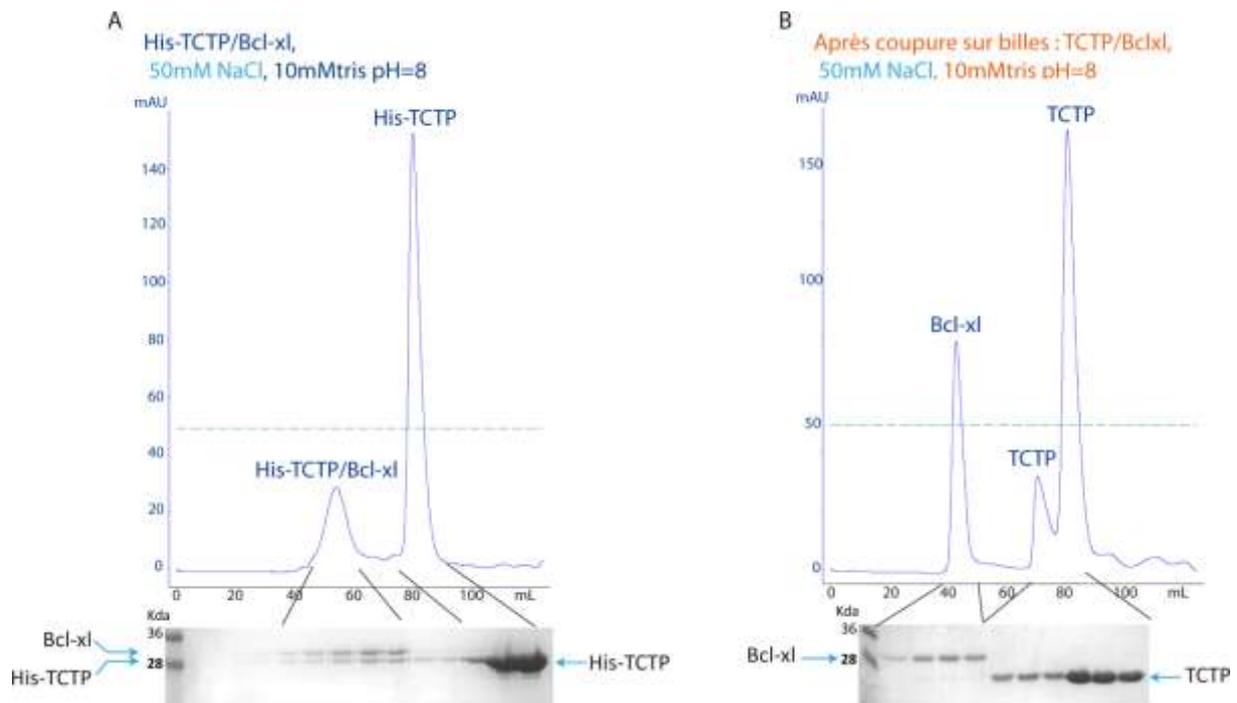
#### **Purification du complexe His-TCTP/Bcl-xl :**

Une fois le complexe His-TCTP/Bcl-xl retenu sur les billes d'affinité TALON, nous avons élué le complexe d'un côté avec de l'imidazole et de l'autre en coupant l'étiquette His sur la résine avec la thrombine. Les éluations ont été récupérées puis injectées sur une colonne d'exclusion de type S200, 16/60, (voir figure 39). Les étapes de purification de ces deux expériences sont indiquées sur les gels dénaturants de la figure 38.



**Figure 38 : Etapes de purification de His-TCTP/Bcl-xl élué à l'imidazole (38.A) ou à la thrombine (38.B).**

La figure 38 montre les étapes de purification du complexe His-TCTP/Bcl-xl élué à l'imidazole (gel dénaturant de la figure 38.A) et à la thrombine par clivage de l'étiquette His (gel dénaturant de la figure 38.B). Dans l'extrait total de ces deux gels, les protéines His-TCTP et Bcl-xl sont exprimées de manière équimolaire, tandis que sur les billes TALON la bande de His-TCTP est plus intense que celle de Bcl-xl. Dans la figure 38.B, nous pouvons constater que la coupure de l'étiquette His est bien réalisée car la bande de TCTP dans les éluations migre en-dessous de celle de His-TCTP sur les billes. Les éluations de chaque expérience sont injectées dans une colonne d'exclusion de taille de type Superdex 200, 16/60.

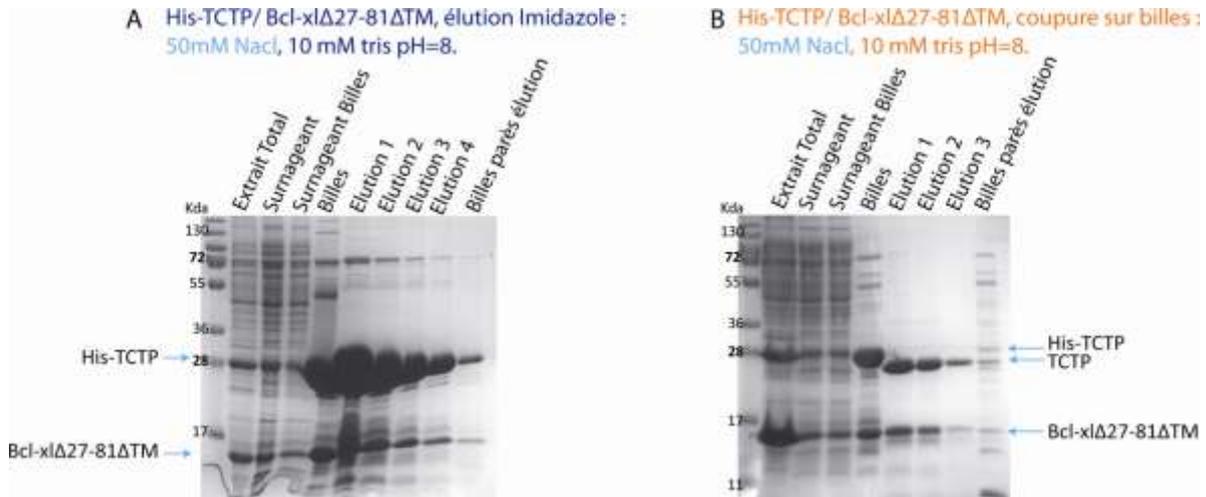


**Figure 39 : Profils d'élution de colonne d'exclusion des purifications de His-TCTP/Bcl-xl élué à l'imidazole (39.A) ou à la thrombine (39.B).**

La figure 39 montre le profil d'élution du complexe élué à l'imidazole (figure 39.A) et du complexe après coupure du tag sur la résine (figure 39.B). Dans la figure 39.A, nous observons deux pics qui correspondent respectivement au complexe His-TCTP/Bcl-xl et à la protéine His-TCTP en excès. D'après la calibration de la colonne, le complexe sortant à un faible volume de rétention possède un poids moléculaire d'environ 500 Kda. Il pourrait s'agir d'un agrégat soluble ou d'un complexe de haut poids moléculaire. Il a été décrit que TCTP peut s'oligomériser dans les cellules (Sirois et al., 2011) et que Bcl-xl peut se trouver sous forme d'agrégats structurés *in vitro* (Chenal et al., 2012). Par conséquent le complexe observé pourrait avoir un sens biologique. D'après la figure 39.B, lorsque l'étiquette de His-TCTP est coupée sur la résine par la thrombine, les espèces se dissocient sur colonne d'exclusion : Bcl-xl migre sous forme d'agrégats dans le volume mort tandis que le pic de TCTP sort majoritairement au volume de rétention de sa forme monomérique. D'après ces résultats, le tag semble être impliqué dans le maintien du complexe et son retrait pourrait engendrer une déstabilisation de celui-ci.

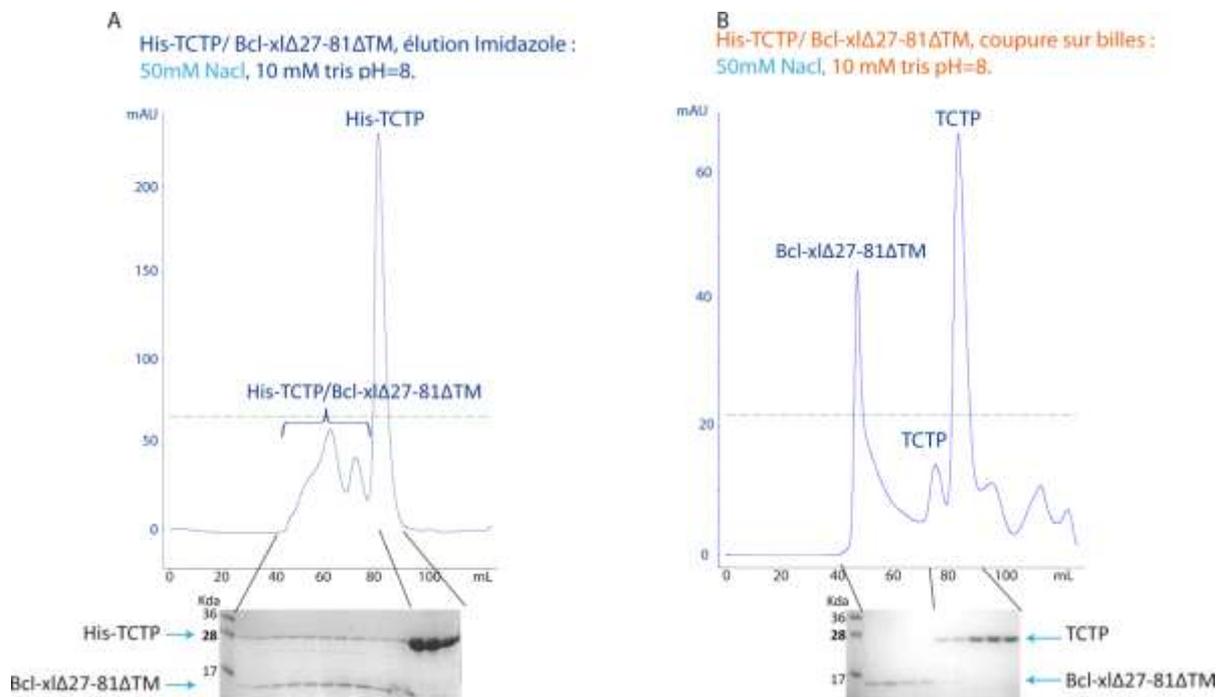
### Purification du complexe His-TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM :

Les mêmes expériences ont été effectuées avec le complexe His-TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM.



**Figure 40 :** Gels dénaturants des étapes de purification de His-TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM élué à l'imidazole (40.A) ou à la thrombine (40.B).

La figure 40 montre les étapes de purification du complexe His-TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM élué à l'imidazole (gel dénaturant de la figure 40.A) et à la thrombine par coupure de l'étiquette sur la résine (gel dénaturant de la figure 40.B). Contrairement à Bcl-xl qui apparaît au-dessus de 28 Kda, Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM migre en-dessous de 17 Kda. La figure 40.B montre que le tag de His-TCTP est bien clivé, puisque dans les éluions la bande de TCTP migre en-dessous de celle de His-TCTP.



**Figure 41 :** Profils d'élution de colonne d'exclusion des purifications de His-TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM élué à l'imidazole (41.A) ou à la thrombine (41.B).

La figure 41 montre le profil d'élution du complexe élué à l'imidazole (figure 41.A), et à la thrombine par clivage de l'étiquette sur la résine (figure 41.B). Le chromatogramme de His-TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM élué à l'imidazole présente plusieurs pics de complexes ainsi qu'un pic intense correspondant à l'excès de His-TCTP. Ces complexes migrent à plus faible poids moléculaire que le complexe His-TCTP/Bcl-xl (voir figure 40) car la construction de Bcl-xl utilisée est dépourvue de la boucle entre les hélices  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 ainsi que de la partie transmembranaire. D'après la figure 41.B, lorsque l'étiquette de His-TCTP est coupée par la thrombine sur la résine, les espèces se dissocient sur gel filtration : Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM migre sous forme d'agrégats dans le volume mort tandis que TCTP sort majoritairement au volume de sa forme monomérique. Nous obtenons des résultats similaires qu'avec le complexe His-TCTP/Bcl-xl.

### ***Influence de l'étiquette et du procédé de coupure sur la stabilité du complexe :***

D'après les expériences précédentes, la coupure de l'étiquette de His-TCTP/Bcl-xl (ou His-TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM) sur la résine semble provoquer la dissociation du complexe. L'hypothèse émise est que l'étiquette soit impliquée dans la formation du complexe. Dans le but d'évaluer l'influence des acides aminés présents en amont de TCTP, la protéine GST avec le site de coupure de la P3C ont été fusionnés à la protéine TCTP en N terminale. Ainsi, le complexe GST-TCTP/Bcl-xl a été purifié puis la GST a été clivée par la P3C sur la résine glutathion-sépharose et les éluions ont été chargées sur une colonne d'exclusion. Le même profil d'élution que pour His-TCTP/Bcl-xl est obtenu : Bcl-xl agrégée sort dans le volume mort tandis que la GST et TCTP sont éluées sous leur forme monomérique. Nous en concluons que le complexe GST-TCTP/Bcl-xl, dont l'étiquette est clivée sur la résine glutathion-sepharose, est également dissocié sur colonne d'exclusion de taille. Par conséquent, aussi bien GST que His semblent être impliquées dans le maintien du complexe.

D'après ces expériences, la présence d'acides aminés en amont de TCTP semble stabiliser le complexe. Nous avons donc généré une construction de TCTP avec une zone flexible de 10 glycines en amont de la protéine et en aval du site de clivage : His-10glyTCTP/Bcl-xl. Une fois le complexe His-10glyTCTP/Bcl-xl purifié et l'étiquette His clivée sur la résine TALON, les éluions ont été chargées sur colonne d'exclusion et le même résultat est observé que pour les autres constructions. Par conséquent, les 10 glycines restantes après coupure de l'étiquette ne suffisent pas à stabiliser le complexe. Les chromatogrammes des colonnes d'exclusion de taille ainsi que les gels dénaturants de ces expériences se trouvent en annexe 12.

Ensuite, pour vérifier si le procédé de coupure de l'étiquette sur la résine est à l'origine de la dissociation du complexe, nous avons d'abord élué le complexe His-TCTP/Bcl-xl à l'imidazole puis

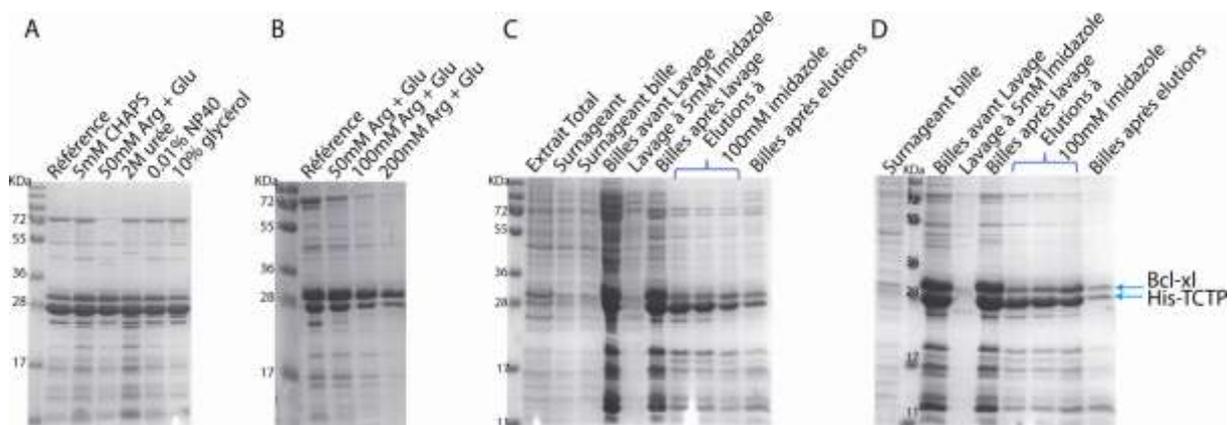
coupé son tag His en solution avant d'analyser l'échantillon sur colonne d'exclusion. Ainsi, au moment de la coupure, le complexe n'est pas fixé sur la résine. D'après les chromatogrammes (annexe 11), les protéines du complexe ne se sont pas dissociées sur colonne d'exclusion de taille mais un mélange de protéines avec et sans étiquette au niveau du pic du complexe est observé. Ces expériences prouvent que le procédé de coupure a un impact sur la dissociation du complexe.

### III.1.2.3. Optimisation de la purification de His-TCTP/Bcl-xl

Bien que le complexe His-TCTP/Bcl-xl a été mis en évidence par co-expression, un bruit de fond de bandes secondaires est visible dans les gels dénaturants. Or, pour la cristallisation, les protéines doivent être obtenues le plus pure possible.

#### **Optimisation des agents chimiques :**

Ainsi, dans un souci d'abaisser les impuretés liées à la purification de His-TCTP/Bcl-xl, nous avons testé différents composés chimiques susceptibles de mieux laver les billes afin de récupérer un complexe sans impuretés.



**Figure 42 : Optimisation des lavages du complexe His-TCTP/Bcl-xl.** SDS-PAGE présentant les protéines retenues sur les billes TALON incubées avec différents agents chimiques (42.A) et (42.B) et gels dénaturants indiquant les différentes étapes de purification sans (42.C) et avec (42.D) incubation préalable des billes TALON avec 5mM Imidazole.

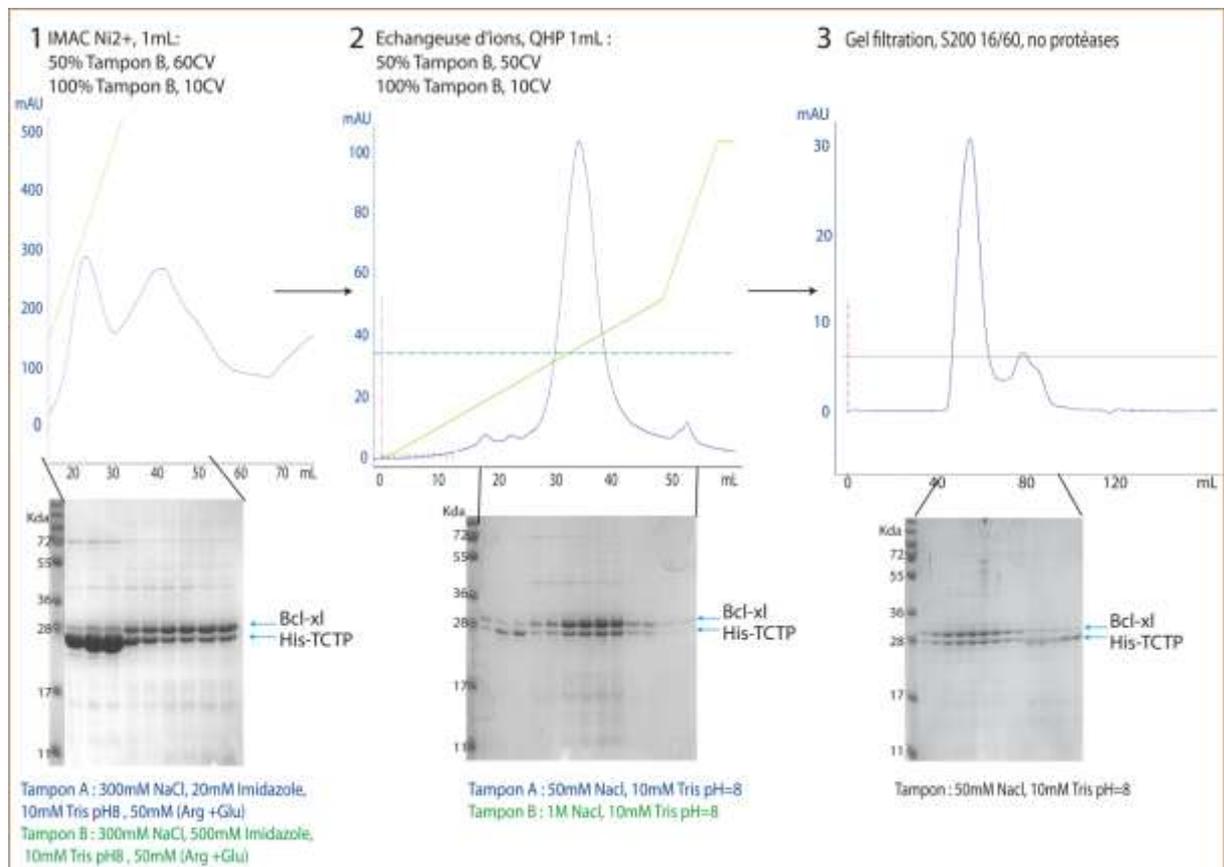
Au moment d'incuber l'extrait soluble, où le complexe est surexprimé, avec les billes d'affinité TALON-Co<sup>2+</sup>, différents composés chimiques ont été rajoutés tels que l'imidazole, du CHAPS, de l'arginine, de l'acide glutamique, du NP40 et du glycérol (voir figure 42.A et 42.B). Pour la plupart de ces conditions, les impuretés restent fixées sur les billes, mais dans les cas où 50mM d'arginine et d'acide glutamique sont rajoutés, moins de bruit de fond est observé (voir figure 42.A). Différentes concentrations ont été évaluées et 50mM semble être le meilleur compromis pour laver la résine sans détacher le complexe (figure 42.B).

Par ailleurs, lorsque les billes TALON-Co<sup>2+</sup> sont pré-incubées avec de l'imidazole, figure 42.D, le bruit de fond décroît considérablement par rapport à la figure 42.C où les billes ne sont pas pré-incubées avec de l'imidazole.

En conclusion : Nous avons opté pour un tampon de lyse comprenant 50mM (d'arginine et d'acide glutamique) et 5mM d'imidazole pour les billes TALON ou 20mM d'imidazole pour les billes Ni-NTA.

### **Mise en place du protocole de purification :**

A la suite de l'optimisation du tampon de lyse, différentes colonnes ont été étudiées et nous avons mis au point un protocole de purification faisant intervenir une colonne d'affinité, une échangeuse d'ions et une colonne d'exclusion de taille.



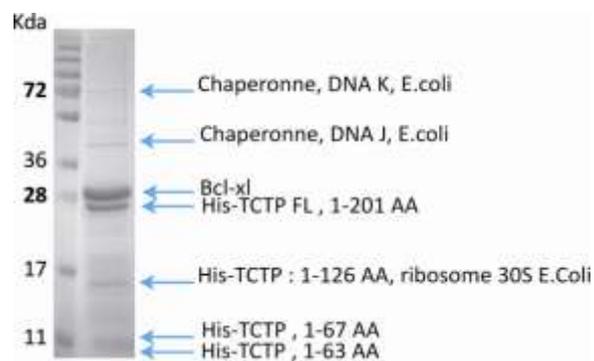
**Figure 43 : Etapes de purification de His-TCTP/Bcl-xl : 1) IMAC Ni<sup>2+</sup>, 2) QHP et 3) Superdex S200, 16/60.**

Après sonication et centrifugation du lysat cellulaire, l'extrait soluble est chargé sur une colonne d'affinité Ni-NTA. La colonne est ensuite lavée avec le tampon de lyse et un gradient d'imidazole permet de séparer le complexe de l'excès de His-TCTP (figure 43.1). Ensuite, le pic du complexe est injecté sur une échangeuse d'anions (figure 43.2) suivie d'une colonne d'exclusion (figure 43.3). Cependant, l'ensemble de ces étapes de purification ne suffit pas à abaisser le bruit de

fond, qui est faiblement visible dans le gel dénaturant du chromatogramme d'exclusion (figure 43.3) mais qui est présent lorsque le complexe est concentré.

Cette mise au point a également été réalisée avec le complexe TCTP-His/Bcl-xl où le tag His se situe en C terminale de TCTP. Nous avons voulu tester si le changement de position du tag sur TCTP avait une influence sur les impuretés retenues. Les mêmes résultats sont observés, le complexe parvient à être isolé mais toujours avec des bandes en arrière fond. Pour connaître l'origine de ces bandes, elles ont été analysées en spectrométrie de masse.

Les résultats des analyses en spectrométrie de masse (MALDI) montrent que les bandes au-dessus de His-TCTP et de Bcl-xl, voir figure 44, sont des chaperonnes de E.coli alors que celles du bas proviennent de la dégradation de His-TCTP.



**Figure 44 : Impuretés liées à la purification de His-TCTP/Bcl-xl.** Gel SDS-PAGE de His-TCTP/Bcl-xl en fin de purification. Analyses du bruit de fond en spectrométrie de masse.

Pour conclure, nous ne sommes pas parvenus à isoler le complexe de manière pure et l'étiquette semble influencer sur la formation du complexe. Nous avons entrepris des tests de cristallographie (voir chapitre V.1.3.2, études structurales en RMN et cristallographie) afin de vérifier s'il s'agit d'un artefact ou d'une espèce existant réellement dans les cellules. En effet, ce complexe de grosse taille pourrait être composé d'oligomères de TCTP et de Bcl-xl qui ont déjà été mis en évidence (Chenal et al., 2012; Sirois et al., 2011).

### III.2. Etude en co-purification du complexe TCTP/Bcl-xl

Suite aux expériences infructueuses de la co-expression, nous avons purifié les protéines seules avant de les mélanger en vue de former un complexe, il s'agit de la « co-purification ». Les conditions de purifications ainsi que d'obtention des complexes ont dû être optimisées.

## III.2.1. Mise en évidence de l'interaction entre TCTP et les différentes constructions de Bcl-xl

### III.2.1.1. Purification des constructions de Bcl-xl et de TCTP

La protéine Bcl-xl entière est difficile à produire et précipite facilement. Il est possible d'obtenir environ 0.5 mg de protéines à la fin de la purification de 1L de bactéries surexprimant His-Bcl-xl, alors que GST-Bcl-xl s'agrège. Pour les autres constructions, His-Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM (ou GST-Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM) est produite sans impuretés mais dans de faibles proportions, environ 1 mg par litre de culture, tandis que His-Bcl-xl $\Delta$ TM (ou GST-Bcl-xl $\Delta$ TM) et His-Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM (ou GST-Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM) sont obtenues en grande quantité, aux alentours d'une vingtaine de milligrammes par litre de culture de bactéries. La protéine TCTP a déjà été purifiée et cristallisée au laboratoire et l'empilement cristallin révèle que les résidus restant après coupure de l'étiquette peuvent être impliqués dans l'oligomérisation de TCTP. Par ailleurs, d'autres expériences montrent que TCTP se fait dégrader par la thrombine. Or, pour l'étude d'interactions entre TCTP et ses partenaires nous ne souhaitons pas que l'oligomérisation rentre en compétition avec la formation des complexes et que la protéine soit dégradée. Pour ce faire, nous avons généré un vecteur de TCTP de façon à laisser le moins d'acide aminé après le site de coupure et en utilisant une enzyme de clivage plus spécifique que la thrombine. Le vecteur GST-TCTP a été élaboré avec un site de coupure à la Tev ne laissant qu'un résidu après clivage de l'étiquette GST.

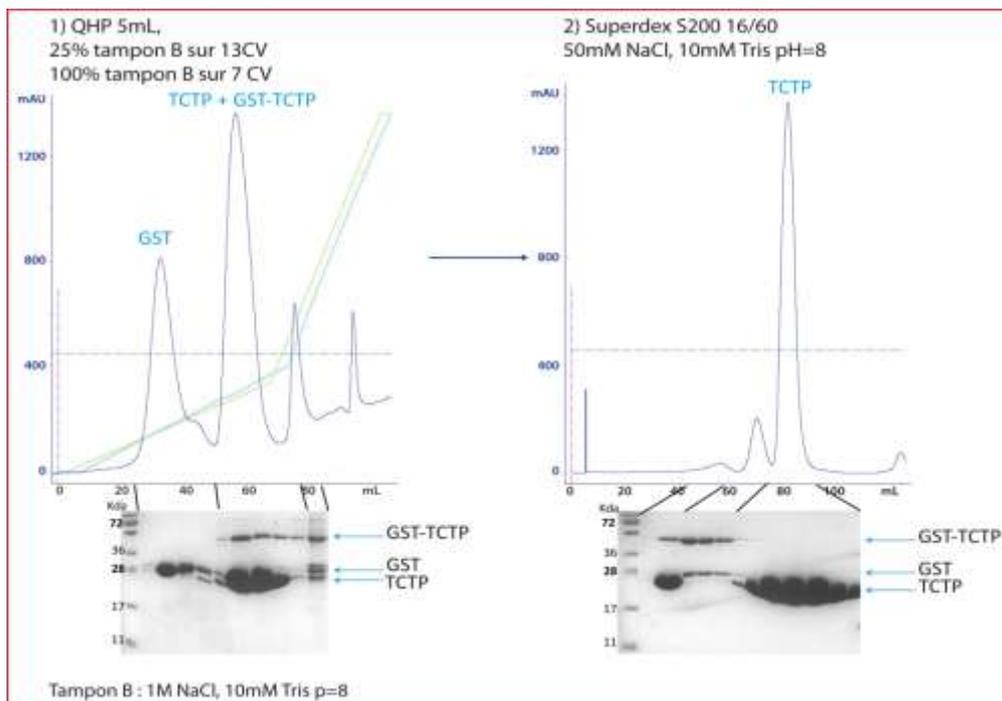


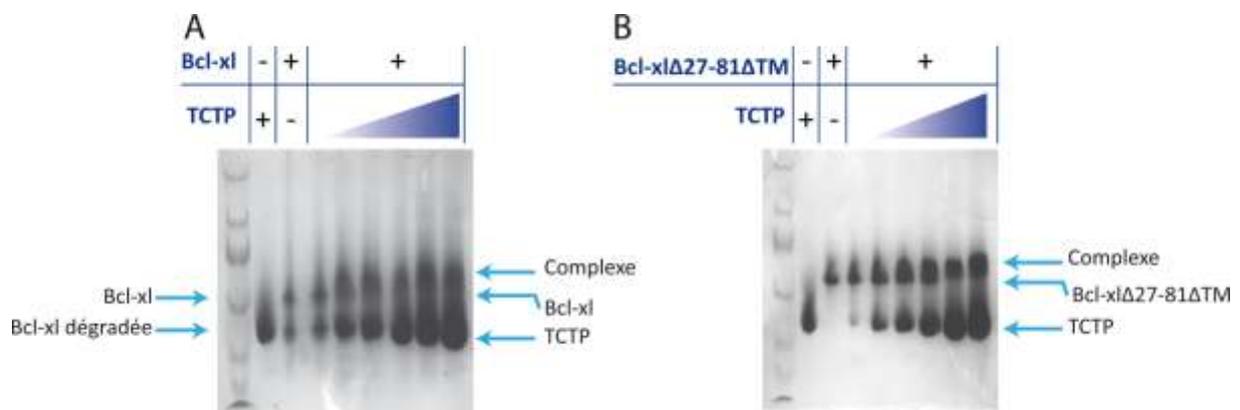
Figure 45 : Etapes de purification de GST-TCTP : 1) QHP 5mL, 2) Superdex S200 16/60.

Une fois que les billes d'affinité ont récupéré GST-TCTP de l'extrait soluble, la protéine est éluée à l'imidazole. Les éluions sont incubées avec de la Tev puis sont chargées sur une colonne échangeuse d'anion. La figure 45.1 montre le profil d'éluion de l'échangeuse d'anion où TCTP et le reste de GST-TCTP non coupé sortent au même volume de rétention. Ensuite, les fractions de TCTP et de GST-TCTP sont injectées dans une colonne d'exclusion de taille afin de les séparer et d'obtenir de la protéine TCTP sans impuretés, voir le profil d'éluion de la figure 45.2. Pour connaître le protocole de purification en détail, se référer à l'annexe 8.

Les protéines purifiées, nous cherchons ensuite à mettre en évidence et à isoler le complexe.

### III.2.1.2. Mise en évidence des interactions par Gels natifs et « GST pull down »

Notre but consiste à mettre en évidence une interaction entre TCTP et les différentes formes de Bcl-xl. Tout d'abord, nous avons testé les gels natifs, cette technique nécessitant très peu de matériel (quelques µg). Les protéines sont mélangées suivant plusieurs ratios et incubées toute la nuit à 4°C. Ces expériences sont effectuées en incubant TCTP avec respectivement Bcl-xl, Bcl-xlΔTM et Bcl-xlΔ27-81ΔTM, mais seuls les gels natifs avec Bcl-xl (figure 46.A) et Bcl-xlΔ27-81ΔTM (figure 46.B) ont fourni des résultats exploitables.



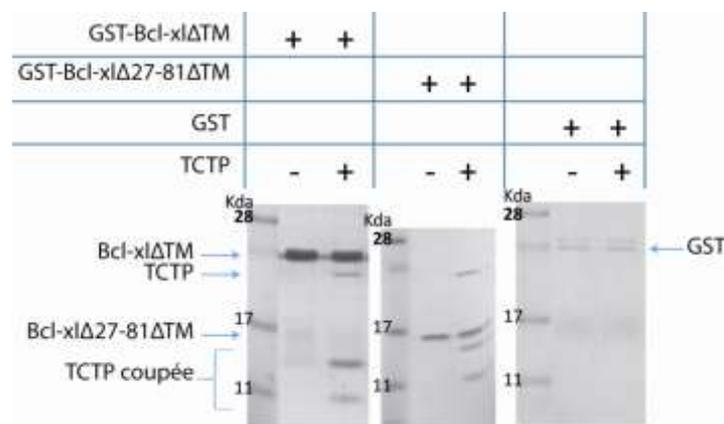
**Figure 46 : Gels natifs entre TCTP et Bcl-xl (46.A) et entre TCTP et Bcl-xlΔ27-81ΔTM (46.B).**

Dans ces deux expériences, la quantité en Bcl-xl (ou en Bcl-xlΔ27-81ΔTM) est fixée tandis que celle de TCTP s'accroît. Dans les gels natifs les protéines migrent suivant leur charge et leur taille. Les deux premières colonnes indiquent la migration des protéines seules, respectivement de TCTP et de Bcl-xl (ou de Bcl-xlΔ27-81ΔTM).

Dans la figure 46.A, deux bandes sont observées pour Bcl-xl, cette protéine étant en partie dégradée. Au fur et à mesure que la quantité de TCTP augmente, une nouvelle bande s'intensifie juste au-dessus de celle de Bcl-xl, indiquant la formation d'un complexe. Comme contrôle, nous avons déposé sur gel natif TCTP seule à différentes concentrations, afin de s'assurer que la nouvelle

espèce ne corresponde pas à un oligomère de TCTP (voir figure 64, partie IV.2.2). Ce contrôle confirme bien qu'il s'agit d'un complexe. La figure 46.B révèle également la présence d'un complexe entre TCTP et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, au-dessus de la bande correspondant à Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM.

Dans un deuxième temps, nous avons réalisé des GST pull down en vue de confirmer nos résultats en gels natifs. Nous avons mélangé GST-Bcl-xl $\Delta$ TM, GST-Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, et GST avec TCTP pendant 2 heures à température ambiante, puis des billes au glutathion ont été rajoutées afin de récupérer les complexes formés. Enfin, ces billes sont lavées puis incubées avec de la thrombine pour éluer les complexes et non les protéines retenues de manière aspécifique sur les billes. Ces éluions sont analysées sur gel dénaturant (figure 47). Ces GST pull down ont également été effectuées sans TCTP comme contrôles.



**Figure 47 : SDS-PAGE des éluions à la thrombine des GST pull down de GST-Bcl-xl $\Delta$ TM, GST-Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et GST incubés sans et avec TCTP.**

Les gels dénaturants de la figure 47 montrent les éluions à la thrombine des GST pull down de GST-Bcl-xl $\Delta$ TM, GST-Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et GST, pré-incubés avec TCTP ainsi que les même GST pull down sans pré-incubation avec TCTP, comme contrôles. Dans les colonnes où les protéines GST-Bcl-xl $\Delta$ TM, GST-Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et GST sont éluées à la thrombine, sans être pré-incubées avec TCTP, les protéines sans étiquette sont observées : Bcl-xl $\Delta$ TM, Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et un peu de GST qui s'est détachée des billes. Dans les colonnes où les protéines GST-Bcl-xl $\Delta$ TM et GST-Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM sont pré-incubées avec TCTP, nous observons dans les éluions, en plus des protéines sans étiquette, TCTP sous forme entière mais aussi coupée en deux parties à cause de la thrombine. En revanche, avec la protéine GST, TCTP n'est pas éluee, indiquant que GST ne retient pas TCTP. Ces expériences mettent en avant une interaction entre TCTP et respectivement Bcl-xl $\Delta$ TM et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM.

Des expériences d'ITC ont également été réalisées, où nous avons titré Bcl-xl (100 $\mu$ M) avec TCTP (1mM), mais aucun résultat concluant n'a été obtenu.

### III.2.2. Extraction des complexes sur colonne d'exclusion

Les expériences précédentes montrent que TCTP interagit avec les trois formes de Bcl-xl : Bcl-xl FL, Bcl-xl $\Delta$ TM et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. En vue de réaliser des études biophysique et structurales, nous souhaitons isoler ces complexes en grande quantité et sans impuretés.

L'interaction entre TCTP et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM a été détectée à la fois sur gel natif et par GST pull down. Ce complexe étant particulièrement favorable, nous avons donc choisi de l'étudier en premier.

#### III.2.2.1. Complexe entre TCTP et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM

A la suite de nombreuses expériences d'optimisation, nous avons mis en évidence les conditions de formation du complexe TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM : 50mM NaCl, 10mM CHES pH=9 et incubation à 30°C sur la nuit.

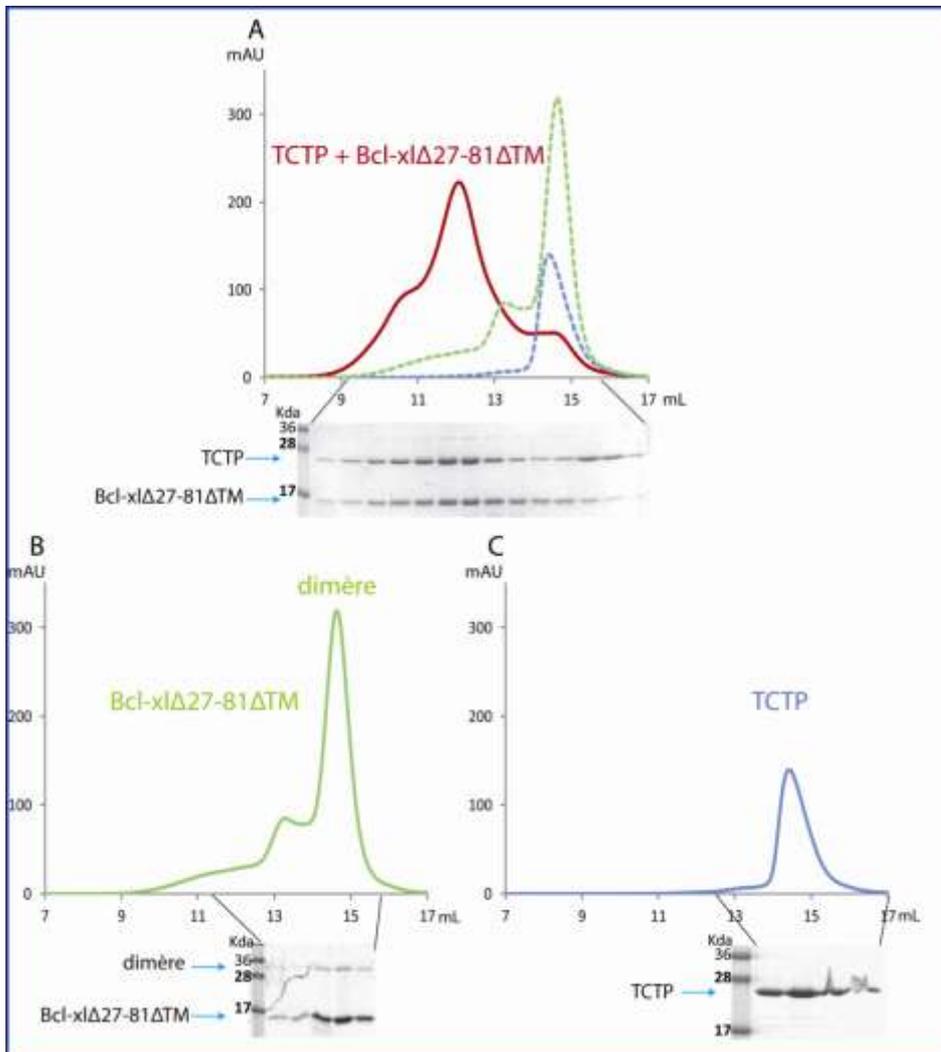


Figure 48 : Profils de colonne d'exclusion de taille du mélange Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM + TCTP (48.A), de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM seule (48.B) et de TCTP seule (48.C).

La figure 48 présente la superposition de profil d'éluion de colonne d'exclusion du mélange TCTP+Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM avec les protéines seules (figure 48.A) ainsi que le profil d'éluion de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM seule (figure 48.B) et de celui de TCTP seule (figure 48.C). Les fractions d'éluion des profils sont déposées sur gel dénaturant. Dans la figure 48.A, la courbe du mélange est en trait plein rouge tandis que celles des protéines seules sont en pointillé. Nous pouvons remarquer la présence d'une espèce éluée à un poids moléculaire (12 mL) supérieure aux espèces seules (14,8 mL) et comprenant, d'après le gel dénaturant, TCTP et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. Par conséquent, cette courbe rouge indique la formation d'un complexe entre ces deux espèces. Nous pouvons également conclure que la boucle de Bcl-xl située entre les hélices  $\alpha$ 1 et  $\alpha$ 2 n'est pas nécessaire à l'interaction avec TCTP.

### III.2.2.2. Complexe entre TCTP et Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM (et Bcl-xl $\Delta$ TM)

A la suite des résultats précédents, nous avons voulu isoler sur colonne d'exclusion de taille les complexes de TCTP avec les deux autres constructions de Bcl-xl : Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM et Bcl-xl $\Delta$ TM. Contrairement à Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, qui est purifiée sous forme de dimère, Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM et Bcl-xl $\Delta$ TM sont purifiées majoritairement sous forme de monomère, comme l'indiquent les profils de gel filtration ci-dessous.

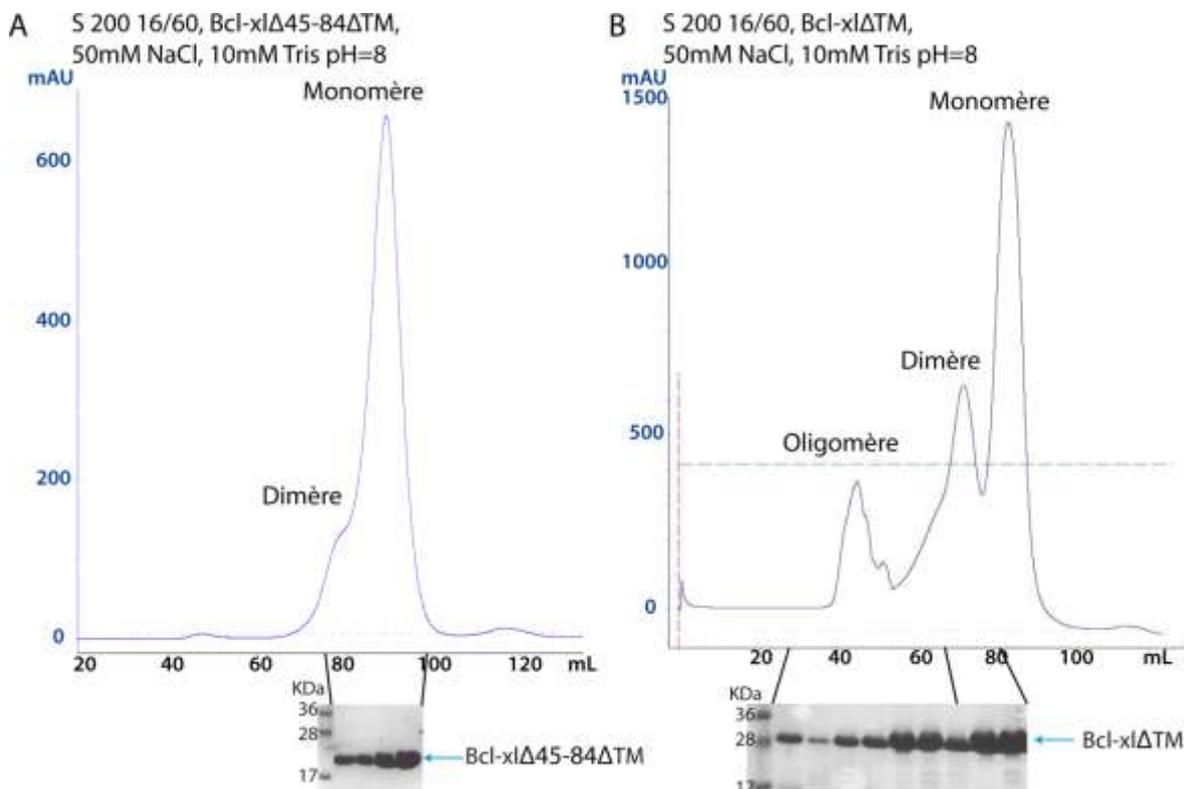


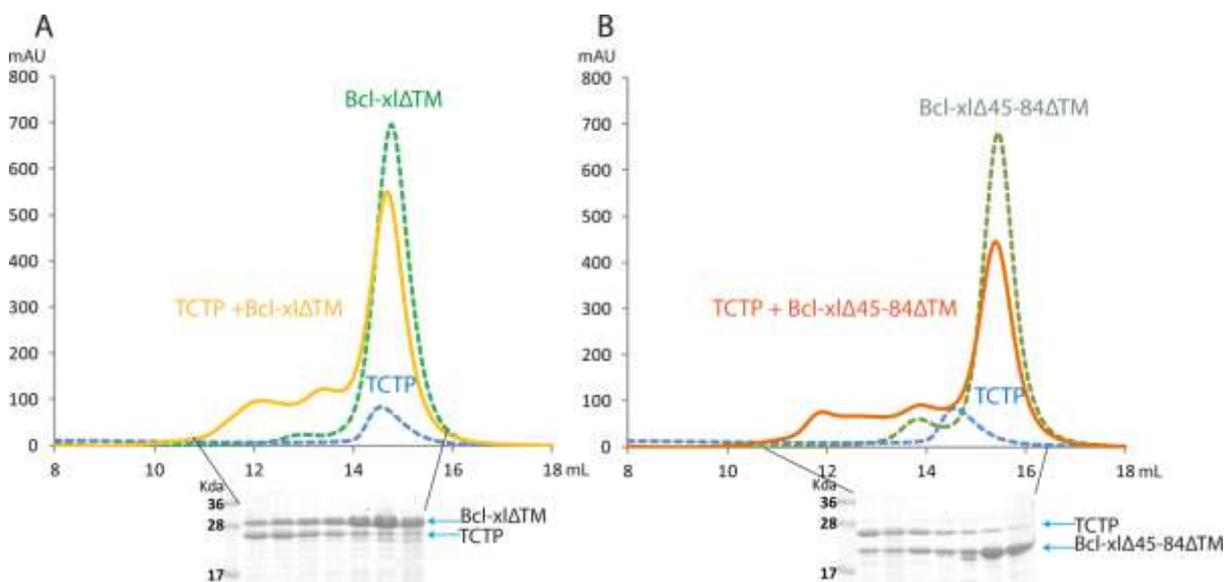
Figure 49 : Profils d'éluion de gel filtration des purifications de Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM (49.A) et de Bcl-xl $\Delta$ TM (49.B).

La figure 49 montre les profils d'élution et les gels dénaturants des fractions d'élution des purifications de Bcl-x1Δ45-84ΔTM et de Bcl-x1ΔTM. Pour Bcl-x1Δ45-84ΔTM, dans la figure 49.A, nous observons principalement du monomère, tandis que pour Bcl-x1ΔTM, dans la figure 49.B, nous visualisons des oligomères, du dimère et du monomère.

Comme Bcl-x1Δ27-81ΔTM interagit en tant que dimère avec TCTP, nous avons voulu savoir s'il en était de même avec Bcl-x1Δ45-84ΔTM et Bcl-x1ΔTM. Nous avons donc étudié l'interaction de TCTP avec les formes monomérique et dimérique de ces constructions.

### **Etude de TCTP avec les monomères de Bcl-x1ΔTM et de Bcl-x1Δ45-84ΔTM :**

Nous avons évalué l'interaction de TCTP avec les monomères respectifs de Bcl-x1Δ45-84ΔTM et de Bcl-x1ΔTM. En vue de déplacer l'équilibre vers la formation des complexes, nous nous sommes placés en excès de monomère: 400μM de Bcl-x1ΔTM (ou de Bcl-x1Δ45-84ΔTM) ont été incubés avec 150μM de TCTP dans les mêmes conditions expérimentales que pour le complexe TCTP/Bcl-x1Δ27-81ΔTM.



**Figure 50 : Superposition de profils d'élution de gel filtration : du mélange TCTP + Bcl-x1ΔTM, de TCTP et de Bcl-x1ΔTM (50.A), ainsi que du mélange TCTP + Bcl-x1Δ45-84ΔTM, de TCTP et de Bcl-x1Δ45-84ΔTM (50.B). Les gels dénaturants des mélanges sont présentés sous les chromatogrammes.**

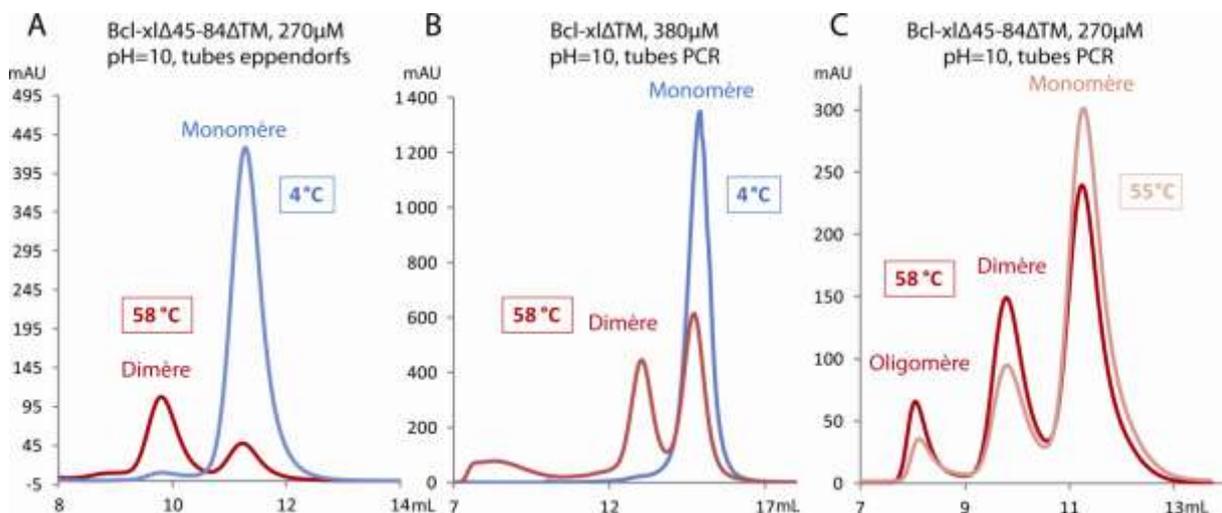
Dans les graphiques de la figure 50, les protéines seules sont représentées en pointillé, en bleu pour TCTP et en vert pour les monomères, tandis que les mélanges sont en trait plein orange. Dans les figures 50.A et 50.B, les courbes des mélanges en orange indiquent la présence de nouvelles espèces éluées à plus hauts poids moléculaires que les espèces seules. D'après les gels dénaturants des mélanges, ces complexes sont formés de TCTP et de Bcl-x1ΔTM (ou de Bcl-x1Δ45-84ΔTM) où une majorité de TCTP est déplacée vers les complexes. Ainsi, les complexes entre TCTP et les monomères

de Bcl-x $\Delta$ TM ou de Bcl-x $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM sont obtenus dans les mêmes conditions que le complexe TCTP/Bcl-x $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM.

### **Etude de TCTP avec les dimères de Bcl-x $\Delta$ TM et de Bcl-x $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM :**

Il a été rapporté dans l'article de Denisov (Denisov et al., 2007) que le dimère de Bcl-x $\Delta$ TM peut être formé à partir du monomère en chauffant à 58°C et à pH=10. Nous avons voulu reproduire cette expérience avec Bcl-x $\Delta$ TM et Bcl-x $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM mais des optimisations ont été nécessaires.

### **Dimère obtenu à partir du chauffage du monomère :**

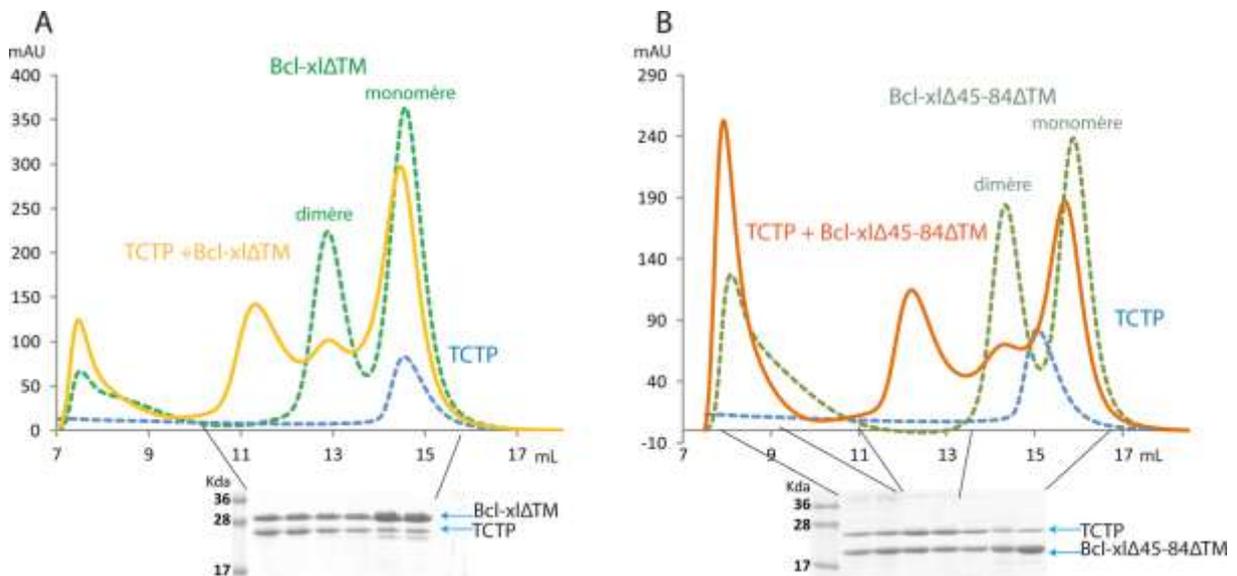


**Figure 51 : Profils d'éluion de gel filtration des protéines Bcl-x $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM et Bcl-x $\Delta$ TM testées à différentes températures et dans différents types de tubes.**

Dans la figure 51.A, nous observons deux profils d'éluion représentant Bcl-x $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM incubée à 58°C en rouge et à 4°C en bleu dans un tampon à pH=10. La courbe en rouge montre la présence du dimère de Bcl-x $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM contrairement à la courbe en bleu, donc le chauffage à pH=10 conduit bien à la formation de dimère. Cependant, une partie de la protéine précipite au cours du chauffage. Nous supposons que les tubes eppendorfs utilisés pour cette expérience ne sont pas assez hermétiques, conduisant à l'évaporation du tampon et par conséquent à la précipitation des protéines. Nous avons utilisé la machine à PCR car les tubes PCR sont maintenus fermés sous le couvercle et peuvent être chauffés à 98°C, évitant ainsi toute évaporation du tampon. Comme le montre la figure 51.B, lorsque la machine à PCR est utilisée, le dimère de Bcl-x $\Delta$ TM est obtenu sans perdre de protéines. Enfin, d'après la figure 51.C, le chauffage à 58°C favorise davantage la formation de dimères par rapport à 55°C, mais également celle des oligomères. Ces expériences montrent que les protéines Bcl-x $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM et Bcl-x $\Delta$ TM se comportent de manière similaire.

Nous sommes parvenus ainsi à former du dimère de Bcl-x1Δ45-84ΔTM et de Bcl-x1ΔTM mais sous forme de mélange avec du monomère.

**Etude de TCTP avec les dimères de Bcl-x1ΔTM et de Bcl-x1Δ45-84ΔTM obtenus par chauffage:**



**Figure 52 : Profils de gel filtration du mélange TCTP+Bcl-x1ΔTM, de TCTP et de Bcl-x1ΔTM (52.A) ainsi que du mélange de TCTP+Bcl-x1Δ45-84ΔTM, de TCTP et de Bcl-x1Δ45-84ΔTM (52.B). Les gels dénaturants des mélanges sont présentés sous les chromatogrammes.**

Les mélanges de monomères et de dimères de Bcl-x1ΔTM et de Bcl-x1Δ45-84ΔTM formés préalablement à 58°C et à pH=10 sont testés avec TCTP à 30°C, à pH=9 et à 50mM NaCl. L'incubation est réalisée avec 400μM de Bcl-x1ΔTM (ou de Bcl-x1Δ45-84ΔTM) et 150μM de TCTP. Nous mettons Bcl-x1ΔTM (ou Bcl-x1Δ45-84ΔTM) en excès pour favoriser la formation des complexes. Les protéines seules sont représentées en pointillé, en bleu pour TCTP ainsi qu'en vert pour Bcl-x1ΔTM et Bcl-x1Δ45-84ΔTM, tandis que les mélanges sont en trait plein orange. Dans les figures 52.A et 52.B, les courbes des mélanges en orange indiquent la présence de nouvelles espèces éluées à plus hauts poids moléculaires que les espèces seules. D'après les gels dénaturants des mélanges, ces complexes sont formés de TCTP et de Bcl-x1ΔTM (ou de Bcl-x1Δ45-84ΔTM) où une majorité de TCTP est déplacée vers les complexes.

Dans ces figures, nous remarquons que les complexes sont formés essentiellement de dimère de Bcl-x1ΔTM (ou de Bcl-x1Δ45-84ΔTM), puisque le pic du dimère de la courbe orange décroît fortement par rapport à celui du monomère. De plus, ces courbes montrent que TCTP interagit également avec les oligomères de Bcl-x1ΔTM et de Bcl-x1Δ45-84ΔTM.

## IV. Isolation du complexe TCTP/Mcl-1

---

L'interaction entre TCTP et Mcl-1 a été mise en évidence par double hybride chez la levure en prenant comme appât Mcl-1. Cette interaction a été confirmée par co-immunoprécipitation *in vitro* et *in vivo* (Liu et al., 2005; Zhang et al., 2002). De plus, il a été montré que TCTP et Mcl-1 se stabilisent mutuellement dans les cellules, renforçant ainsi leur action dans la survie cellulaire. Cependant, aucune étude n'a été menée en vue d'isoler ce complexe *in vitro* et de le caractériser de manière biochimique, biophysique et structurale. De plus, l'étude de l'interaction de TCTP avec un deuxième partenaire anti-apoptotique de la famille des Bcl-2 apporterait un éclairage plus global sur son mode d'action au cours de l'apoptose.

Afin d'extraire le complexe TCTP/Mcl-1 en quantité suffisante et sans impuretés, nous avons suivi deux techniques couramment utilisées au laboratoire : la co-expression et la co-purification.

### IV.1. Etude en co-expression du complexe TCTP/Mcl-1

Dans le chapitre précédent, nous avons déjà expliqué le principe de la co-expression. Il s'agit d'exprimer les deux partenaires ensemble dans les bactéries E.Coli (pRare2) afin de mettre en évidence et d'isoler les complexes.

#### IV.1.1. Minitests de co-expression

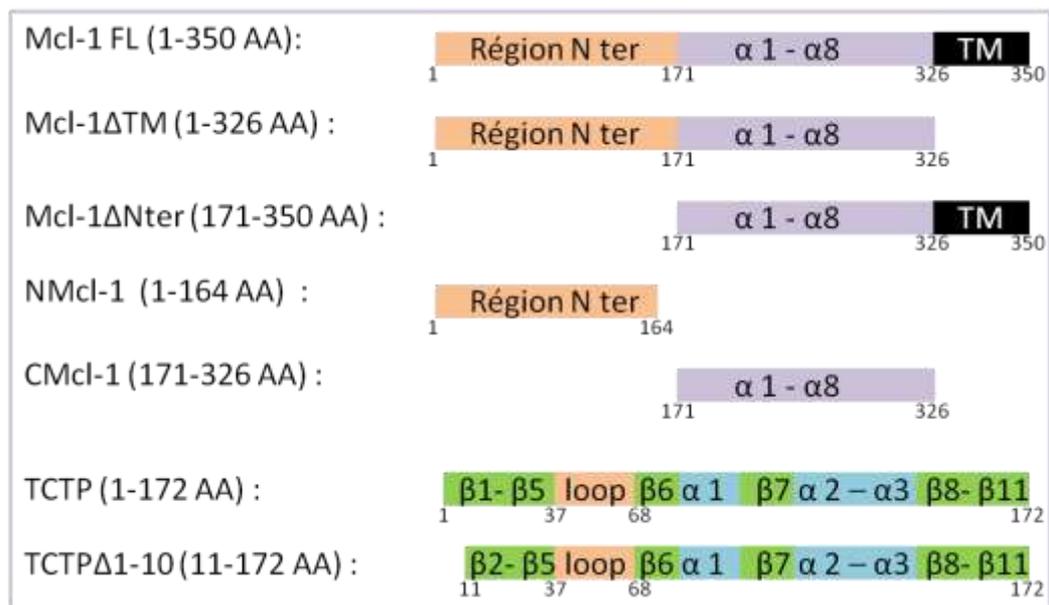
Comme pour Bcl-xl, des minitests de co-expressions sont effectués avec différentes constructions dans le but d'identifier les zones d'interactions entre TCTP et Mcl-1. Le procédé des minitests est utilisé en routine au laboratoire et permet un criblage à haut débit de différentes constructions sur une courte période de temps. Un protocole a été mis en place, voir le chapitre Matériel et Méthodes, où les conditions de culture, d'induction, d'incubation avec les billes d'affinité sont fixées et certaines étapes sont même robotisées. Pour toutes les constructions, deux tampons ont été testés : 50 mM NaCl et 400mM NaCl avec 10mM Tris pH=8 afin d'évaluer l'effet de la salinité sur la solubilité des complexes.

##### IV.1.1.1. Constructions de Mcl-1 et TCTP utilisées

Les constructions de Mcl-1 ont été réalisées suivant les domaines qui ont été cristallisés et dont les structures sont répertoriées dans la PDB. Cette protéine a été étudiée principalement chez la souris car la forme humaine s'exprime difficilement. Une forme hybride entre l'homme et la souris a même été élaborée pour contourner ce problème d'expression (Peter E. Czabotar et al, 2007). Des constructions de Mcl-1 ont été élaborées dépourvus de la région transmembranaire et/ou de la

partie N terminale désordonnée : Mcl-1 $\Delta$ TM, Mcl-1 $\Delta$ Nter et CMcl-1 (voir figure 53). Des vecteurs codant pour la protéine entière et uniquement la région N terminale ont aussi été générés : Mcl1 FL et NMcl-1.

Nous avons utilisé deux constructions de TCTP pour l'étude du complexe TCTP/Mcl-1, l'une avec la protéine entière et l'autre avec TCTP dépourvue de ses dix premiers acides aminés (voir figure 53). L'article de Liu (Liu et al., 2005) relate l'importance de la suppression de ses dix premiers acides aminés dans l'interaction avec Mcl-1. L'ensemble des constructions mises au point pour Mcl-1 et TCTP est indiqué dans la figure 53.



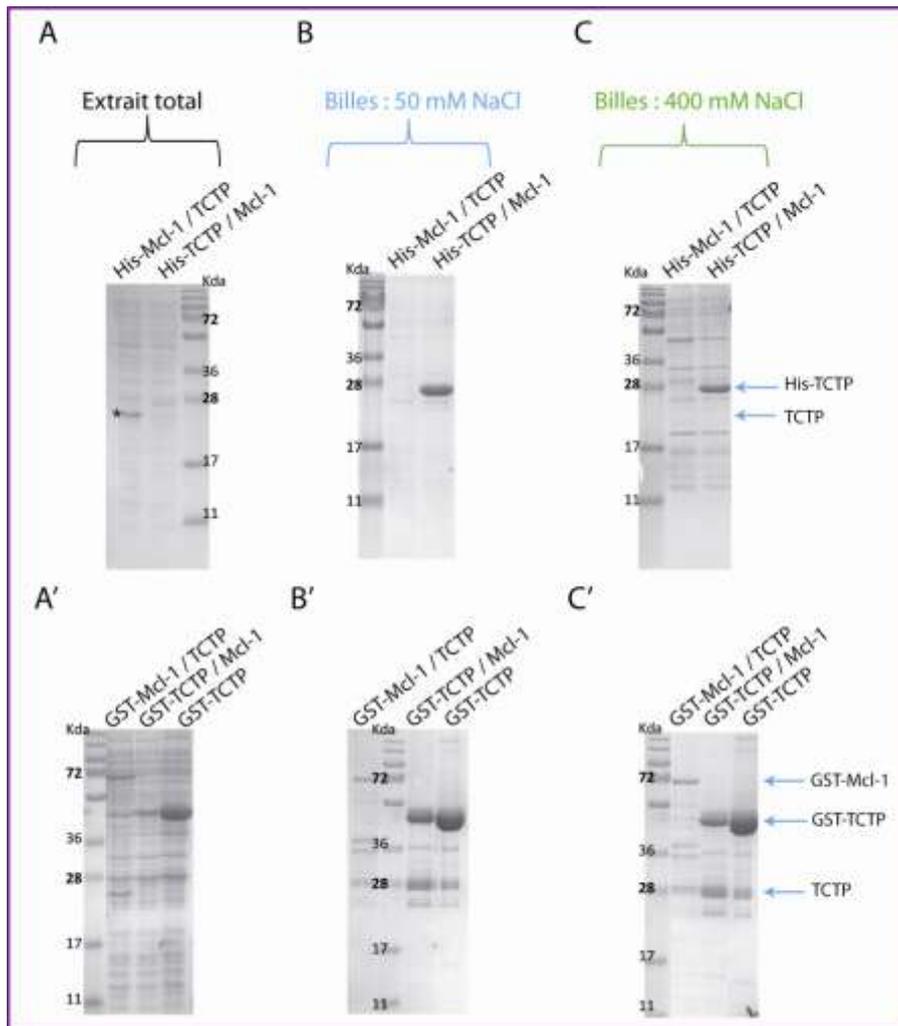
**Figure 53 : Constructions de Mcl-1 et de TCTP.** Dans cette figure, les hélices  $\alpha$  sont représentées en bleu clair pour TCTP et en violet pour Mcl-1. Les brins  $\beta$  sont en vert, la partie transmembranaire en noir et les régions déstructurées en rose.

Suivant les vecteurs utilisés, ces constructions peuvent être fusionnées en N terminale ou en C terminale à différents tags : His, GST et His-MBP. Ces étiquettes peuvent avoir une influence dans la purification et la solubilisation des complexes.

#### IV.1.1.2. Minitests de co-expression dans *E. Coli*

De même que pour TCTP/Bcl-xl, tous les minitests ne sont pas exposés, seuls ceux qui présentent un résultat positif ou intéressant ont été sélectionnés. L'extrait total ainsi que les protéines fixées sur les billes sont analysés sur gel dénaturant. L'extrait total permet de vérifier que les protéines sont bien exprimées, et le bleu des billes de mettre en évidence les complexes formés.

Minitests avec les protéines entières:

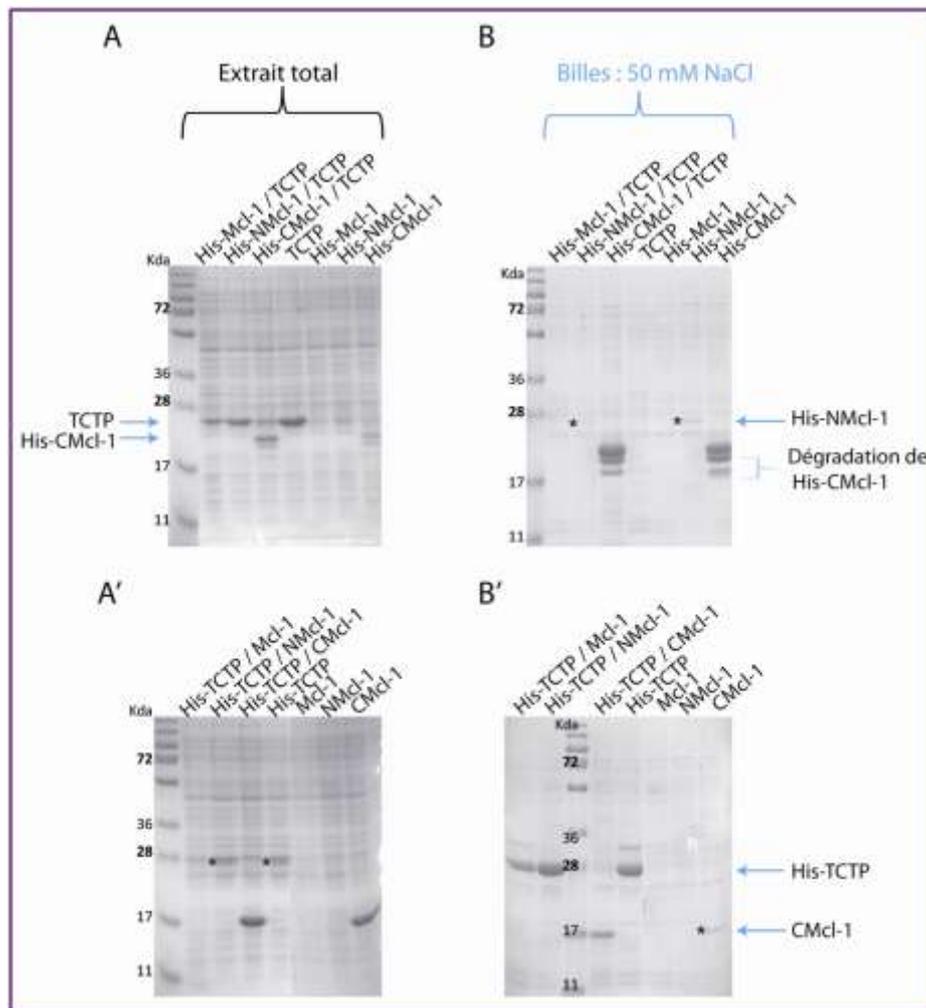


**Figure 54 : Minitests de co-expression 4.** SDS-PAGE présentant les minitests de co-expression entre les protéines entières His-TCTP et Mcl-1, His-Mcl-1 et TCTP, GST-TCTP et Mcl-1 ainsi qu'entre TCTP et GST-Mcl-1. La protéine GST-TCTP seule est également exprimée. L'extrait total des minitests est visualisé dans les figures 54.A et 54.A', les protéines retenues sur la résine à 50mM NaCl dans les figures 54.B et 54.B', et les protéines retenues sur la résine à 400mM NaCl dans les figures 54.C et 54.C'.

Dans un premier temps, les protéines entières sont co-exprimées avec l'étiquette His : His-TCTP/Mcl-1 et His-Mcl-1/TCTP (figures 54.A, 54.B et 54.C), et l'étiquette GST : GST-TCTP/Mcl-1 et GST-Mcl-1/TCTP (figures 54.A', 54.B' et 54.C'). Les étiquettes sont placées soit sur TCTP, soit sur Mcl-1 afin d'évaluer l'influence du tag sur ces interactions. D'après l'extrait total et le bleu des billes, les protéines Mcl-1 et His-Mcl-1 ne sont pas détectées, et bien que l'étiquette GST améliore l'expression de Mcl-1 (figures 54.B' et 54.C'), TCTP n'est pas retenue. Par ailleurs, l'expression de GST-TCTP seule présente le même profil de bandes que la co-expression de GST-TCTP avec Mcl-1 (figures 54.B' et 54.C'), indiquant que Mcl-1 n'est pas retenue.

Ces résultats montrent que la salinité n'a pas d'influence sur la solubilité des protéines et qu'il est préférable d'utiliser des constructions plus courtes et plus solubles de Mcl-1.

Minitests avec TCTP et les constructions respectives Mcl-1, NMcl-1 et CMcl-1:



**Figure 55 : Minitests de co-expression 5.** SDS-PAGE présentant les minitests de co-expression : His-Mcl-1/TCTP, His- NMcl-1/TCTP, His-TCTP/NMcl-1, His-TCTP/CMcl-1, et les minitests d'expression des protéines seules : His-CMcl-1, His-NMcl-1, His-TCTP, TCTP, NMcl-1 et CMcl-1. L'extrait total des minitests est visualisé dans les figures 55.A et 55.A', les protéines retenues sur la résine à 50mM NaCl dans les figures 55.B et 55.B', et les protéines retenues sur la résine à 400mM NaCl dans les figures 55.C et 55.C'.

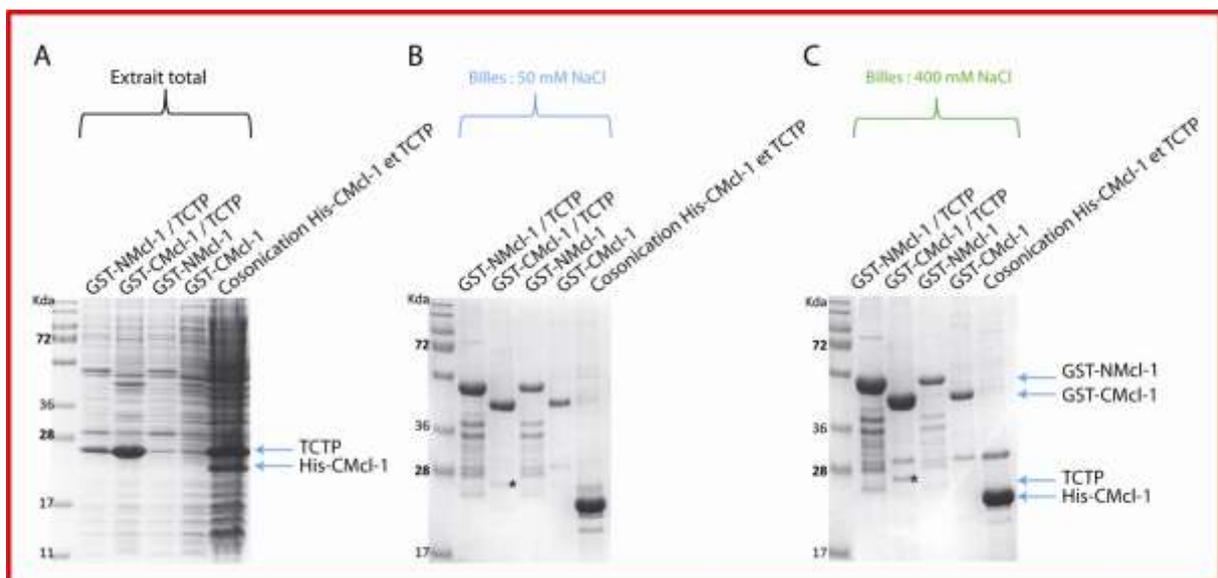
L'étape suivante a consisté à étudier les co-expressions entre TCTP et les autres constructions de Mcl-1 : NMcl-1, la partie N terminale de Mcl-1, et CMcl-1, la partie centrale de Mcl-1 sans l'hélice transmembranaire. Les étiquettes sont placées soit sur TCTP, soit sur NMcl-1 ou CMcl-1. D'après les figures 55.A et 55.B, His-NMcl-1 est faiblement exprimée tandis que His-CMcl-1 l'est fortement malgré une dégradation partielle. Dans aucune des co-expressions His-NMcl-1/TCTP et His-CMcl-

1/TCTP, la protéine TCTP n'est retenue. Le résultat reste inchangé lorsque le tag de CMcl-1 se trouve en C terminale (voir annexe 10.A).

La co-expression entre His-TCTP et NMcl-1, voir figures 55.A' et 55.B', montre que His-TCTP ne retient pas NMcl-1. De plus, un profil inattendu est observé pour la co-expression entre His-TCTP et CMcl-1, où nous visualisons la bande correspondant à CMcl-1 sur les billes tandis que celle de His-TCTP est faiblement visible. C'est comme si CMcl-1 atténuait l'expression de His-TCTP. Les incubations des protéines seules avec les billes montrent que CMcl-1 se lie de manière aspécifique aux billes. En tenant compte de tous ces éléments, il est difficile de conclure quant' à l'interaction entre TCTP et CMcl-1.

Nous avons mené d'autres tests de co-expression entre TCTP et les constructions : GST-NMcl-1 et GST-CMcl-1.

Minitests avec TCTP, GST-NMcl-1 et GST-CMcl-1 :



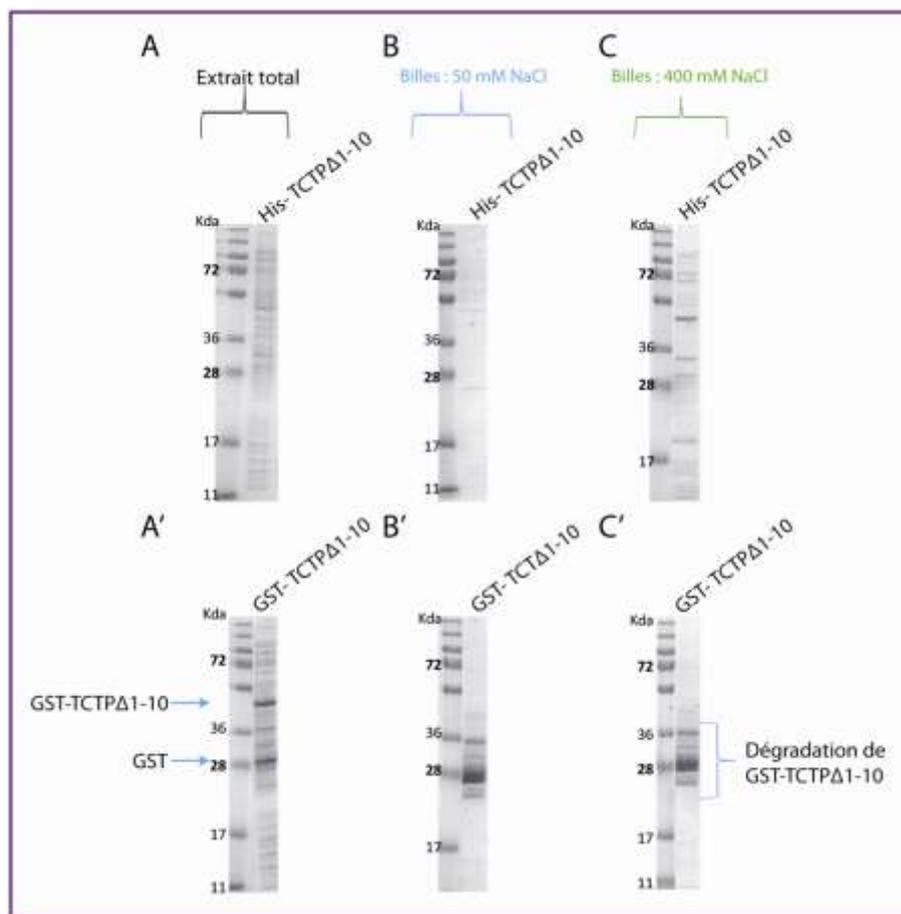
**Figure 56 : Minitests de co-expression 6.** Gels dénaturants présentant des minitests de co-expression : GST-NMcl-1/TCTP et GST-CMcl-1/TCTP, des minitests d'expressions des protéines seules : GST-NMcl-1 et GST-CMcl-1, et la co-sonication entre His-CMcl-1 et TCTP. L'extrait total des minitests est visualisé dans la figure 56.A, les protéines retenues sur les billes à 50mM NaCl dans la figure 56.B et les protéines retenues sur les billes à 400mM NaCl dans la figure 56.C.

La figure 56 montre des gels SDS-PAGE des minitests de co-expression de GST-NMcl-1/TCTP et de GST-CMcl-1/TCTP, ainsi que l'expression des protéines seules GST-NMcl-1 et GST-CMcl-1 comme contrôles. Tout d'abord, dans les figures 56.B et 56.C, nous constatons que l'étiquette GST améliore l'expression de NMcl-1 et de CMcl-1, par rapport au tag His (voir figure 55), et cela est plus visible à 400mM NaCl qu'à 50mM NaCl. Lorsque GST-NMcl-1 et TCTP sont co-exprimées, uniquement

GST-NMcl-1 est visualisée sur les billes, d'après l'expression de GST-NMcl-1 seule. En revanche, en comparant la co-expression entre GST-CMcl-1 et TCTP, avec l'expression de GST-CMcl-1 seule, nous voyons apparaître une nouvelle bande correspondant au poids moléculaire de TCTP. GST-CMcl-1 interagit donc avec TCTP dans les bactéries.

L'expérience de co-sonication, où les extraits totaux de His-CMcl-1 et de TCTP sont soniqués ensemble n'a rien donné puisqu'aucune bande de TCTP n'est observée (voir la dernière colonne des figures 56.B et 56.C).

Minitests d'expressions de His-TCTP $\Delta$ 1-10 et GST- TCTP $\Delta$ 1-10:



**Figure 57: SDS-PAGE des tests d'expression de His-TCTP $\Delta$ 1-10 et de GST-TCTP $\Delta$ 1-10.** L'extrait total des minitests est visualisé dans la figure 57.A et 57.A', les protéines retenues sur les billes à 50mM NaCl dans les figures 57.B et 57.B', et les protéines retenues sur les billes à 400mM NaCl dans la figure 57.C et 57.C'.

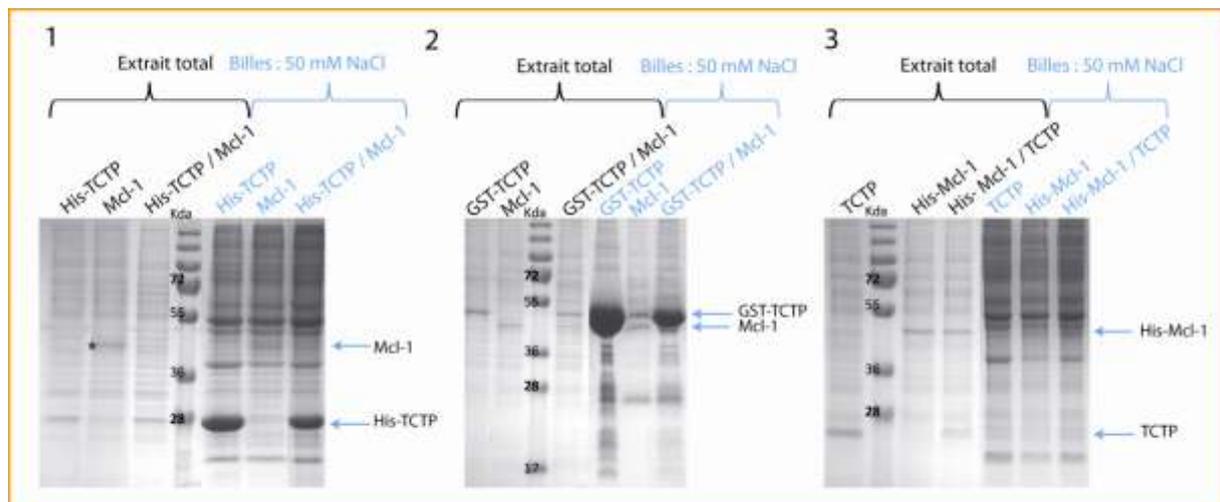
Nous avons mis au point les vecteurs d'expression GST-TCTP $\Delta$ 1-10 et His-TCTP $\Delta$ 1-10 puisque TCTP privée de ses dix premiers acides aminés semble interagir plus fortement avec CMcl-1, d'après l'article de Liu (Liu et al., 2005). D'après l'extrait total et le bleu des billes des figures 57.A, 57.B et 57.C, la protéine His-TCTP $\Delta$ 1-10 n'est pas visible dans l'extrait total et n'est pas retenue sur les billes. En revanche, la protéine GST-TCTP $\Delta$ 1-10 est visible dans l'extrait total de la figure 57.A', mais se

retrouve sous forme dégradée sur les billes d'après les figures 57.B' et 57.C'. La structure de TCTP étant globulaire, la délétion de ses dix premiers acides aminés pourrait engendrer une déstructuration de la protéine. Ces minitests nous ont dissuadés de poursuivre ces expériences.

#### IV.1.1.3. Minitests de co-expression dans les cellules d'insectes

Pour les mêmes raisons évoquées pour Bcl-xl au chapitre précédent, nous avons co-exprimé ces protéines dans les cellules d'insectes. Cela permet de prendre en compte les modifications post-traductionnelles de TCTP et de Mcl-1.

Minitests avec His-TCTP, GST-TCTP et Mcl-1 :

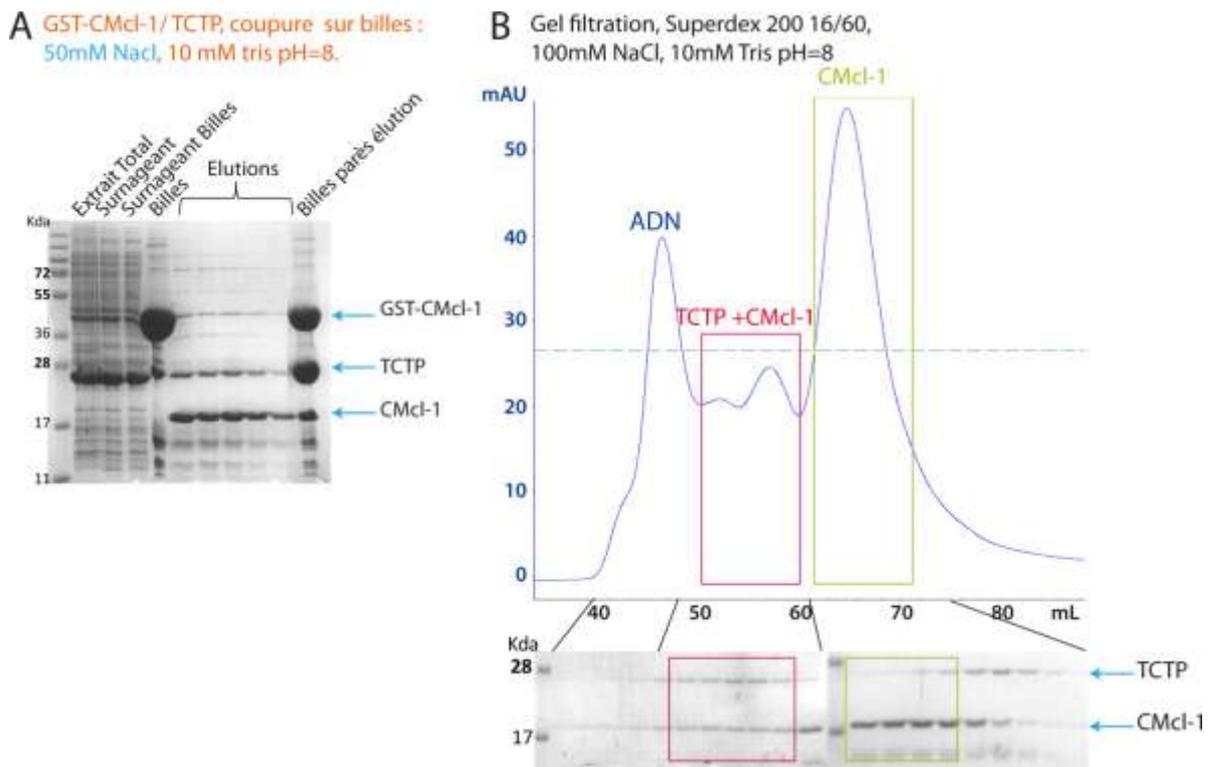


**Figure 58 : Minitests de co-expression dans les cellules d'insectes 2.** L'extrait total et les protéines retenues sur les billes à 50mM NaCl, des minitests entre His-TCTP et Mcl-1 sont visualisés sur gel dénaturant de la figure 58.1. C'est la même chose pour les minitests entre GST-TCTP et Mcl-1 dans la figure 58.2, et pour les minitests entre His-Mcl-1 et TCTP dans la figure 58.3.

Dans la figure 58, nous observons trois gels SDS-PAGE présentant l'extrait total et les protéines retenues sur les billes, des co-expressions His-TCTP/Mcl-1 (figure 58.1), GST-TCTP/Mcl-1 (figure 58.2) et His-Mcl-1/TCTP (figure 58.3). D'après les figures 58.1 et 58.3, les bandes correspondant à Mcl-1 et à His-Mcl-1 sont visibles dans l'extrait total, contrairement aux minitests réalisés dans les bactéries. Bien que His-Mcl-1 soit visible dans l'extrait total, cette protéine est faiblement retenue sur les billes (figure 58.3), cela doit être sûrement lié à son insolubilité. Les figures 58.1 et 58.2 montrent que His-TCTP et GST-TCTP sont exprimées et retenues sur les billes, mais ne forment pas de complexe avec Mcl-1.

## IV.1.2. Expression à grande échelle

A la suite des minitests réalisés précédemment, nous avons décidé de produire à plus grande échelle (1L de 2LB) dans les bactéries, la seule co-expression prometteuse (GST-CMcl-1/TCTP) en vue d'extraire le complexe en quantité suffisante et sans impuretés dans la perspective d'études cristallographiques.



**Figure 59 : Gel dénaturant indiquant les étapes de purification de GST-CMcl-1/TCTP et profil d'élution de gel filtration du complexe TCTP/CMcl-1.** Le gel dénaturant montre : l'extrait total, l'extrait soluble (surnageant), le flow through des billes après incubation avec l'extrait soluble (surnageant billes), les protéines récupérées sur les billes, les éluions des protéines après coupure à la thrombine et les protéines restantes sur les billes après coupure. Le profil d'élution du complexe TCTP/CMcl-1 est accompagné d'un gel dénaturant indiquant les protéines présentes dans chaque fraction d'élution.

Sur le gel dénaturant de la figure 59.A, qui indique les étapes de purification de la co-expression entre GST-CMcl-1 et TCTP, nous visualisons bien les deux protéines récupérées par les billes au glutathion-sepharose bien que la bande de TCTP soit moins intense que celle de GST-CMcl-1. Il faut prendre en compte le fait que l'étiquette GST absorbe une forte quantité de bleu de coomassie comparée aux autres protéines, ce qui surestime la quantité de GST-CMcl-1 visualisée sur gel. Ensuite, après clivage de l'étiquette GST par la thrombine sur les billes, nous récupérons bien TCTP et

CMcl-1 dans les éluions, ce qui montre que TCTP ne se lie pas de manière aspécifique aux billes sinon elle ne serait pas retrouvée dans les éluions mais resterait accrochée aux billes.

L'ensemble des éluions est injecté dans une colonne d'exclusion de taille de type S200 16/60 de façon à séparer les espèces présentes dans 100mM NaCl, 10 mM Tris pH=8. D'après le gel dénaturant de la figure 59.B, le premier pic ne contient pas de protéines, il pourrait donc s'agir d'ADN. La protéine CMcl-1 seule est éluée au niveau du grand pic avec un volume de rétention proche de 65 mL tandis que TCTP seule est éluée sous le pic de CMcl-1, d'après le gel dénaturant. TCTP et CMcl-1 sont également éluées ensemble à un volume de rétention entre 50 et 60 mL, ce qui correspondrait à une espèce complexée, voir la zone rouge dans la figure 59.B. Dans ce chromatogramme, il s'avère difficile de distinguer toutes les espèces présentes à cause des chevauchements des pics.

Les fractions associées au complexe et aux protéines seules, les zones rouges et vertes sur la figure 59.B, sont analysées en spectrométrie de masse (ESI-TOF) en condition native. Les résultats montrent qu'il y a bien TCTP et CMcl-1 dans les deux parties collectées mais qu'aucun complexe n'est détecté. Une des explications possible est que le complexe soit de faible affinité ou se dissocie au cours de la mesure.

## **IV.2. Etude en co-purification du complexe TCTP/Mcl-1**

La co-expression à grande échelle n'ayant pas permis d'isoler clairement un complexe entre TCTP et CMcl-1, nous avons essayé la co-purification comme pour TCTP/Bcl-xl. Cette méthode consiste à purifier séparément les partenaires pour ensuite les mélanger pour former un complexe (comme ce que nous avons fait avec Bcl-xl). Là encore, l'objectif est d'obtenir les protéines en quantité suffisante et sans impuretés afin de réaliser des études biophysiques et structurales.

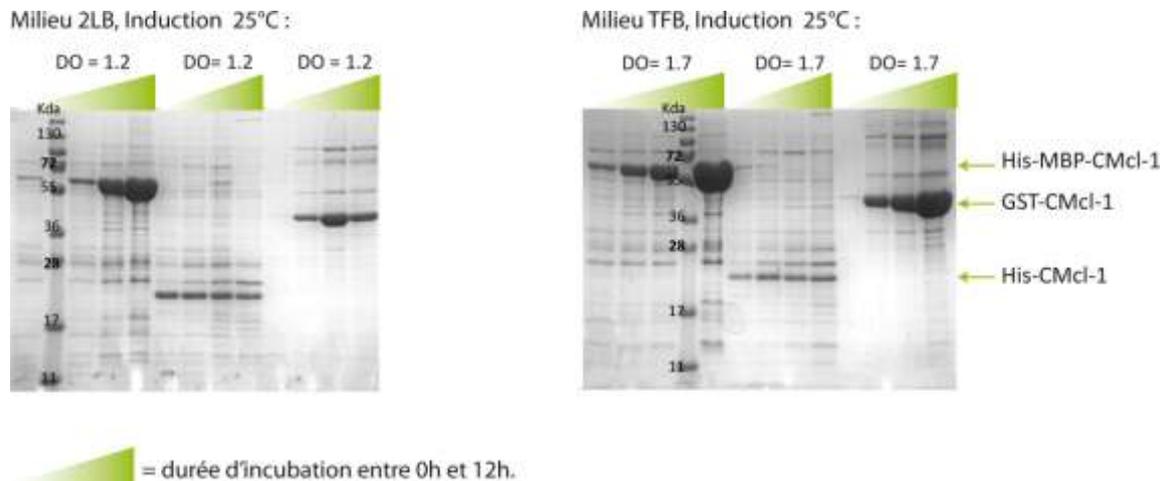
D'après les résultats des minitests, la protéine CMcl-1 semble interagir avec TCTP, nous avons donc décidé d'étudier en co-purification CMcl-1 et TCTP dans les bactéries.

### **IV.2.1. Production à grande échelle de CMcl-1**

#### **IV.2.1.1. Optimisation des cultures de His-CMcl-1, GST-CMcl-1 et de His-MBP-CMcl-1**

Dans le but de produire une grande quantité de CMcl-1, nous avons étudié plusieurs constructions : His-CMcl-1, GST-CMcl-1 et His-MBP-CMcl-1, dans différentes conditions de cultures. Ces protéines ont été exprimées dans deux milieux riches en nutriments pour les bactéries : 2LB et TFB (Terrific Broth) afin d'obtenir une grande quantité de bactéries et donc de protéines. Nous avons testé une DO d'induction élevée entre 1,2 et 1,7. La production de ces protéines a été suivie au cours

du temps en effectuant quatre prélèvements du milieu bactérien à t=0h (avant induction), t=2h, t=5h et t=12h. Pour évaluer la quantité de protéines solubles produites dans les bactéries, nous avons réalisé des mini-purifications sur chaque prélèvement bactérien et analysé sur gel dénaturant les protéines retenues sur les billes d'affinité.



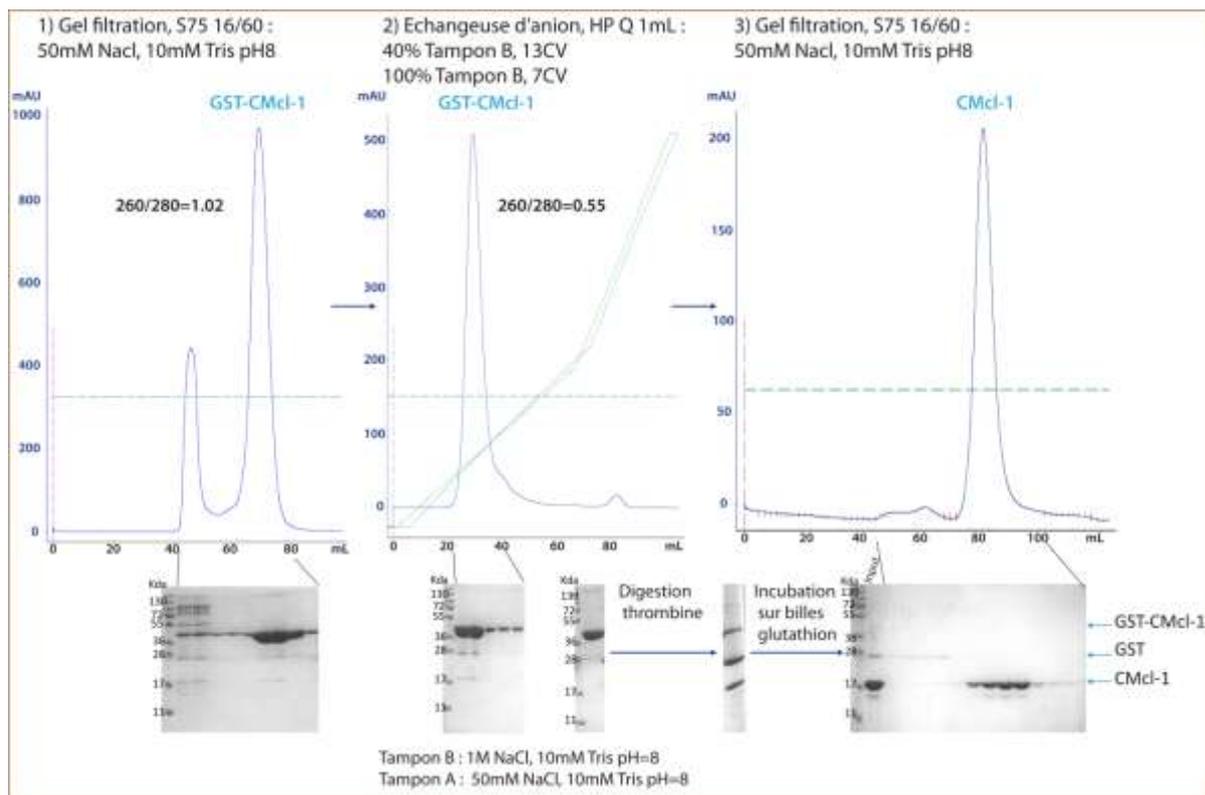
**Figure 60 : Gels dénaturants des trois constructions retenues sur billes suivant le temps d'incubation des bactéries à 25°C et le type de milieu.** Les trois constructions utilisées sont *His-MBP-CMcl-1*, *GST-CMcl-1* et *His-CMcl-1* avec une DO d'induction de 1,2 ou 1,7 et dans du 2LB ou du TFB.

Les gels dénaturants qui se trouvent dans la figure 60 montrent la quantité de protéines retenues sur les billes d'affinité (ou la quantité produite de protéines solubles) pour différents temps d'incubation des cultures bactériennes. De manière générale, la quantité produite de protéines solubles augmente avec la durée d'incubation des bactéries, excepté pour *His-CMcl-1* qui est produite avant induction et dont le taux reste inchangé au cours de l'incubation. Ces expériences montrent que *GST-CMcl-1* et *His-MBP-CMcl-1* sont les protéines les plus fortement produites avec une DO d'induction de 1,7 et une incubation des cultures sur la nuit à 25°C.

#### **IV.2.1.2. Optimisation des purifications de *GST-CMcl-1* et de *His-MBP-CMcl-1***

##### Optimisation de la purification de *GST-CMcl-1* :

Nous avons commencé par optimiser la purification de *GST-CMcl-1*, ainsi différentes colonnes ont été testées pour mettre au point le protocole.



**Figure 61 : Les différentes étapes de la purification de GST-CMcl-1.** Nous observons le profil d'élué ainsi que le gel dénaturant des fractions d'élué, des trois colonnes utilisées lors de cette purification : une colonne d'exclusion de type S75 16/60, une échangeuse d'anions et à nouveau une colonne d'exclusion de type S75 16/60. Le gel SDS-PAGE montrant les différents fragments de GST-CMcl-1 après digestion à la thrombine est également présent.

La protéine GST-CMcl-1, une fois éluée de la résine glutathion-sepharose avec du glutathion réduit, est injectée sur une colonne d'exclusion de taille afin d'éliminer des agrégats, voir étape 1 de la figure 61. Des analyses au nanodrop montrent que les fractions du pic principal de GST-CMcl-1 contiennent de l'ADN car le ratio 260/280 est égal à 1,2. Afin de détacher l'ADN collé à la protéine, une échangeuse d'anion est effectuée et le ratio 260/280 de la protéine passe ainsi de 1,2 à 0,55, se référer à l'étape 2 de la figure 61. Ensuite, l'étiquette GST est clivée par la thrombine et l'échantillon est incubé avec la résine glutathion-sepharose pour récupérer l'étiquette GST et la protéine GST-CMcl-1 non coupée, laissant ainsi uniquement CMcl-1 en solution. Enfin, cette solution est injectée dans une colonne d'exclusion de taille, voir étape 3 de la figure 61, pour mettre la protéine dans son tampon final et éliminer les espèces résiduelles, telles que GST et GST-CMcl-1. Dans le gel dénaturant de l'étape 3, une légère bande de dégradation est observée en-dessous de la bande de CMcl-1.

Lorsque CMcl-1 est conservée à 4°C, cette protéine est dégradée au cours du temps (voir figure 62) sûrement à cause de restes de thrombine issus de la purification. D'après des analyses en spectrométrie de masse (MALDI), CMcl-1 perd son hélice  $\alpha$ 1.

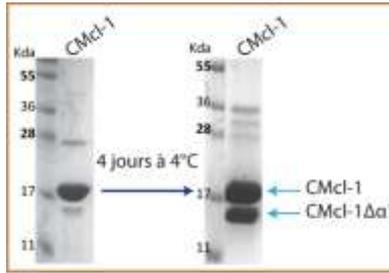


Figure 62 : Gels SDS-PAGE de CMcl-1 avant et après 4 jours à 4°C.

Par conséquent, afin d'obtenir un échantillon homogène en CMcl-1 non dégradée, nous avons choisi de purifier His-MBP-CMcl-1 car l'enzyme de coupure est la *Tev*, une protéase plus spécifique que la thrombine.

#### Optimisation de la purification de His-MBP-CMcl-1 :

Plusieurs colonnes ont été testées dans le but de mettre au point un protocole de purification pour His-MBP-CMcl-1.

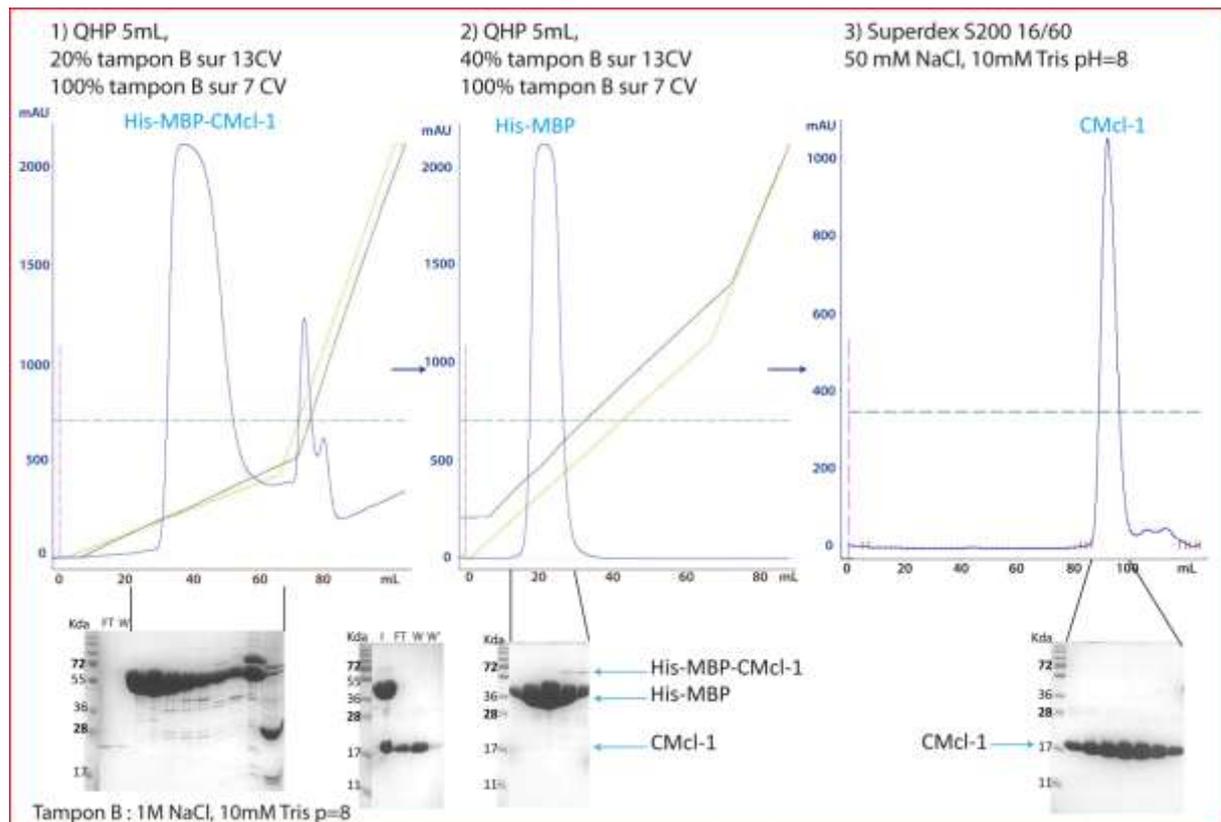


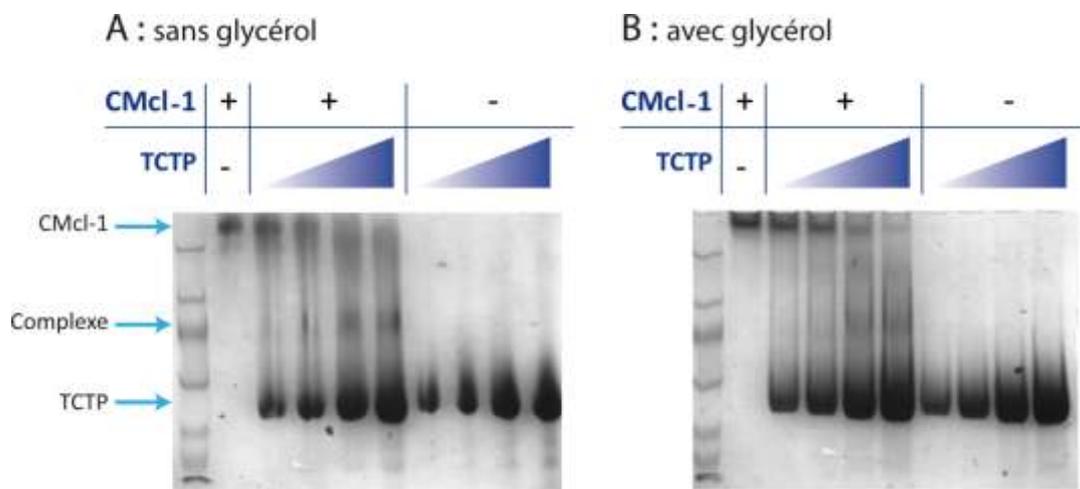
Figure 63 : Les différentes étapes de la purification de His-MBP-CMcl-1. Nous observons le profil d'éluion ainsi que le gel dénaturant des fractions d'éluion des trois colonnes utilisées lors de cette purification : deux échangeuses d'anions et une une colonne d'exclusion de type S200 16/60. Le gel SDS-PAGE montrant l'Input, le Flow through et le Wash de l'étape 2 est également présent.

La protéine His-MBP-CMcl-1, une fois éluée des billes d'affinité Ni-NTA avec de l'imidazole, est chargée sur une échangeuse d'anions afin d'éliminer l'ADN et des contaminants, voir étape 1 de la figure 63. Ensuite, le tag His-MBP est clivé par la Tev et pour séparer le tag His-MBP de CMcl-1 une autre colonne échangeuse d'anions est réalisée. Au cours de cette échangeuse d'anions l'étiquette His-MBP interagit avec la colonne tandis que CMcl-1, positivement chargée, n'est pas retenue sur la colonne, se référer à l'étape 2 de la figure 63. Enfin, pour se placer dans le tampon final et se débarrasser des contaminants résiduels, une colonne d'exclusion de taille est réalisée. Un seul pic est élué constitué uniquement de CMcl-1 non dégradée, voir étape 3 de la figure 63. Pour connaître le protocole de purification en détail, se référer à l'annexe 7.

Une fois que CMcl-1 est produite sans impuretés et en grande quantité, il est enfin possible d'étudier le complexe.

#### IV.2.2. Mise en évidence du complexe TCTP/CMcl-1

Pour mettre en évidence l'interaction entre TCTP et CMcl-1, nous avons eu recours aux gels natifs, car très peu de matériel (quelques µg) est nécessaire. Les protéines sont mélangées suivant plusieurs ratios et incubées toute la nuit à 4°C sachant que la quantité de CMcl-1 reste fixe. Ces expériences ont été effectuées avec et sans glycérol, pour tester l'effet du glycérol sur le complexe.



Dans les gels natifs les protéines migrent suivant leur charge et leur taille. Dans les figures 64.A et 64.B, la première colonne correspond à la migration de CMcl-1 seule. Le point isoélectrique de CMcl-1 étant proche du pH du tampon, cette protéine est faiblement chargée et migre donc très peu dans le gel. Les quatre colonnes suivantes correspondent aux différents mélanges de TCTP et de CMcl-1. Au fur et à mesure que la quantité de TCTP augmente, une nouvelle bande apparaît entre les deux bandes des protéines seules. Afin de s'assurer qu'il ne s'agisse pas d'autres formes de TCTP, nous

avons déposé sur les quatre dernières colonnes du gel le même gradient de TCTP mais en absence de CMcl-1. Ce contrôle montre clairement que la nouvelle bande observée est bien un complexe entre les deux protéines.

Des expériences d'ITC ont également été réalisées où nous avons titré CMcl-1 (100 $\mu$ M) avec TCTP (1mM), mais aucun résultat concluant n'a été obtenu.

D'après la figure 64.B, le glycérol permet d'obtenir des bandes plus claires mais ne favorise pas la formation du complexe.

Maintenant que l'interaction entre les deux espèces a été mise en évidence, la prochaine étape consiste à extraire le complexe pour réaliser des études biochimiques, biophysiques et structurales.

### **IV.2.3. Extraction du complexe TCTP/CMcl-1 sur colonne d'exclusion**

#### **IV.2.3.1. Obtention du complexe TCTP+CMcl-1**

Une fois les protéines produites en quantité suffisante, de nombreux tests ont été effectués afin de mettre en évidence les conditions de formation du complexe. Celles-ci se sont avérées être les mêmes que pour les complexes TCTP/Bcl-xls (où Bcl-xls représentent les différentes constructions de Bcl-xl).

La figure 65 qui suit, montre trois profils d'élution de colonne d'exclusion de taille avec en bleu TCTP, en vert CMcl-1 et en rouge le mélange TCTP+CMcl-1. Ces protéines sont incubées à 50mM NaCl, 10mM tris pH=8, sur la nuit à 30°C. Nous voyons clairement l'apparition d'un complexe à un volume de rétention plus élevé (V=13mL) que celui des protéines seules TCTP (V=15 ml) et CMcl-1 (V=17mL). D'après le gel dénaturant du mélange en rouge, les deux protéines TCTP et CMcl-1 sont présents dans le complexe.

Ce complexe est sensible à de nombreux facteurs que nous allons présenter par la suite (voir partie V.1).

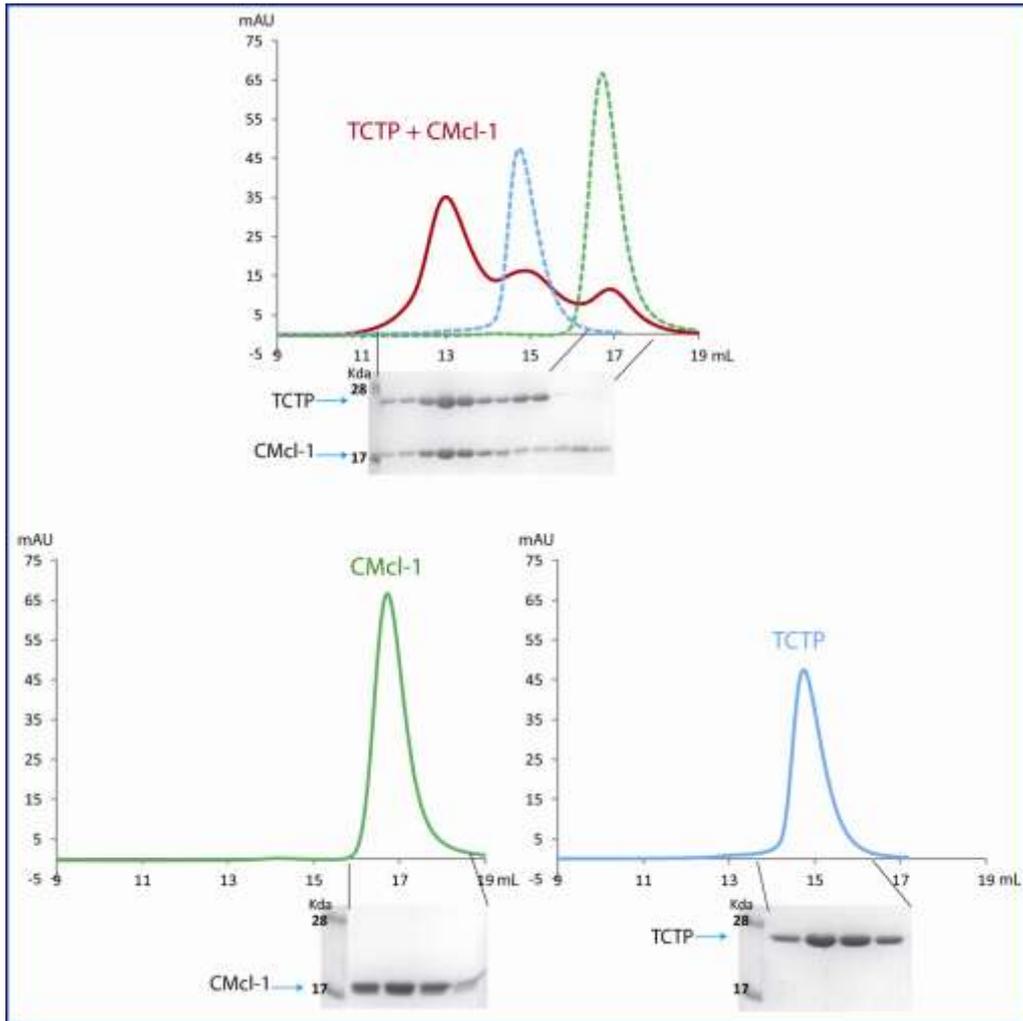
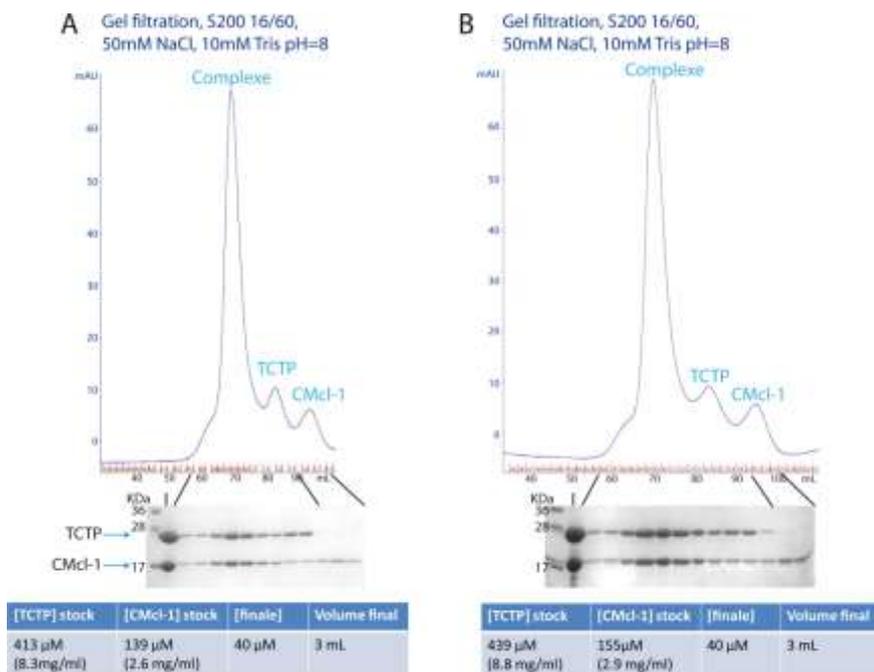


Figure 65 : Profils de gel filtration du mélange de TCTP + CMcl-1 (65.A), de CMcl-1 (65.B) et de TCTP (65.C).

#### IV.2.3.2. Influence de la concentration stock en protéines, du volume de la réaction et de la décongélation

Nous avons remarqué que le profil du complexe sur gel filtration ne dépend pas que de la concentration finale en protéines. D'autres paramètres comme le volume de la réaction, les concentrations stocks en protéines et la décongélation des protéines ont un impact sur le profil d'éluion du complexe. L'ensemble de ces paramètres n'a pas été étudié de manière exhaustive, mais nous avons constaté que CMcl-1 fraîchement purifiée interagit mieux que lorsqu'elle est décongelée. Le paramètre le plus sensible semble être la concentration stock en CMcl-1. L'étude de nombreuses conditions a permis de mettre en évidence celles qui favorisent le plus le complexe par rapport aux protéines seules.



**Figure 66 : Profils d'élution de gel filtration (66.A) et (66.B) des mélanges TCTP+CMcl-1. Les conditions spécifiques sont résumées dans les tableaux associés. Ces conditions sont reproductibles.**

Comme l'indiquent ces deux figures (66.A et 66.B), lorsque TCTP est concentrée à environ 420 $\mu$ M, CMcl-1 aux alentours de 140 $\mu$ M, et que ces protéines sont mélangées à 40 $\mu$ M dans un volume final de 3mL, les profils d'élutions sont reproductibles. Ces conditions favorisent la formation d'une majorité de complexe par rapport aux espèces seules. Les complexes extraits de ces colonnes d'exclusion de taille ont été utilisés pour la cristallisation, (voir partie V.1.3.2).

## V. Caractérisation des complexes

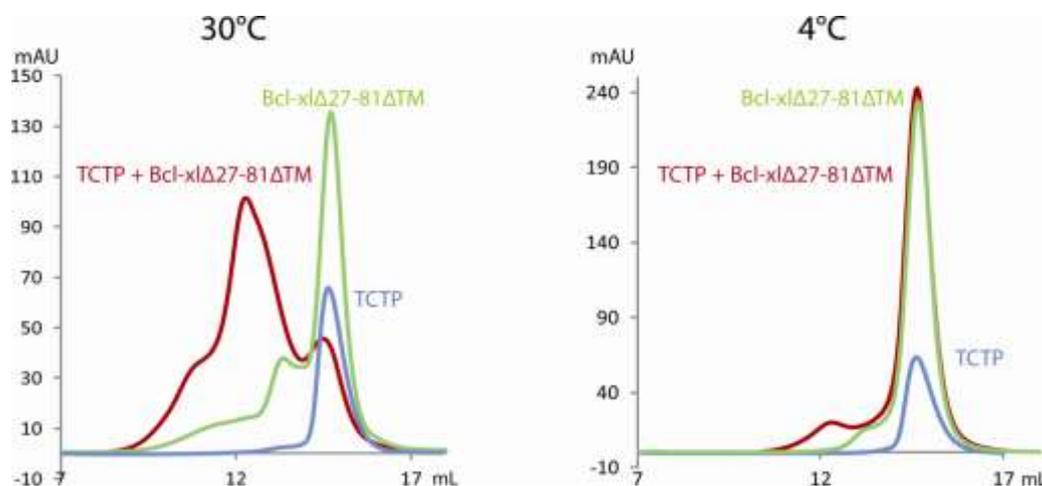
Nous sommes parvenus à isoler les complexes TCTP/CMcl-1 et TCTP avec les différentes formes de Bcl-xl. Nous avons ensuite cherché à caractériser ces complexes biochimiquement afin de déterminer les meilleures conditions pour des études structurales (en RMN et en cristallographie) et pour des études biophysiques (en SEC-MALS, ultracentrifugation analytique et spectrométrie de masse). Enfin, des expériences sur des mutants ont été réalisées dans le but d'identifier les zones d'interactions.

### V.1. Caractérisation biochimique

#### V.1.1. Influence de la température

L'optimisation des conditions de formation des complexes TCTP/CMcl-1 et TCTP avec les différentes formes de Bcl-xl a été une étape déterminante pour parvenir à leur isolation. Pour tester l'influence de la température sur la formation de ces complexes, nous avons incubé ces protéines à 50mM NaCl, 10mM Ches pH=9, à 30°C et à 4°C sur la nuit.

Complexe entre TCTP et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM :

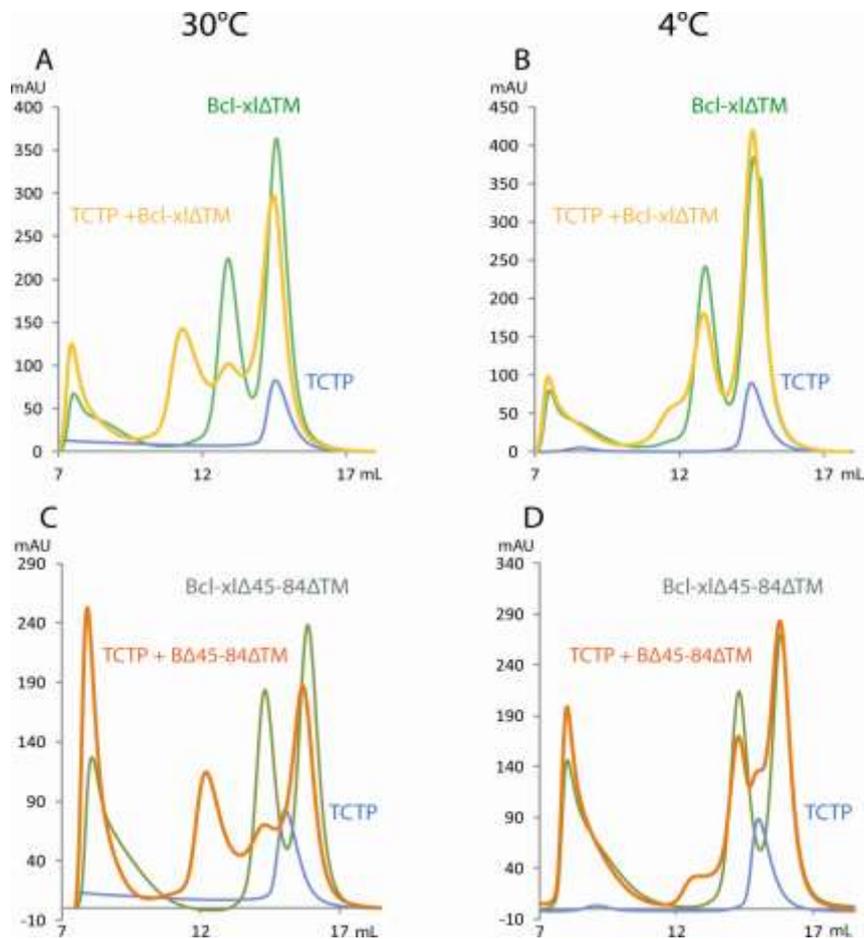


**Figure 67 : Superposition des profils de gel filtration de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, de TCTP et du mélange des deux protéines à 30°C et à 4°C. Pour ces deux graphes, la courbe en vert représente Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM seule, la courbe en bleu TCTP seule et la courbe en rouge le mélange des deux protéines.**

La figure 67 montre la superposition des profils d'éluion de colonne d'exclusion de taille : du mélange TCTP avec Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM en rouge, de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM seule en vert, et de TCTP seule en bleu, à 30°C et à 4°C. La courbe en rouge montre qu'à 30°C une nouvelle espèce apparaît aux plus hauts poids moléculaire tandis qu'à basse température la courbe du mélange se confond avec celles

des protéines seules. Par conséquent, la température d'incubation a une influence sur la formation du complexe TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM.

Complexes entre TCTP et respectivement Bcl-xl $\Delta$ TM et Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM :

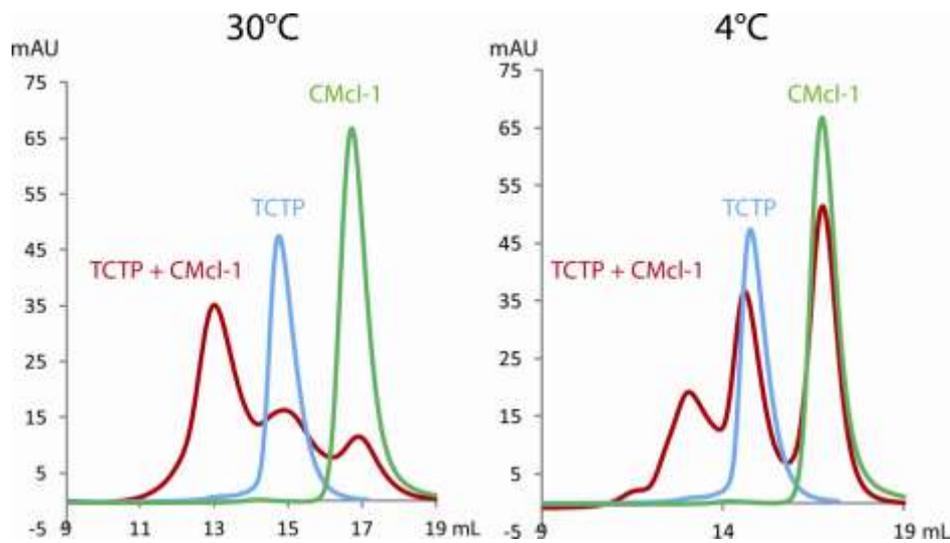


**Figure 68 :** Superposition des profils de gel filtration du mélange TCTP+Bcl-xl $\Delta$ TM, de TCTP et de Bcl-xl $\Delta$ TM (68.A) à 30°C et (68.B) à 4°C, ainsi que du mélange de TCTP+Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM, de TCTP et de Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM (68.C) à 30°C et (68.D) à 4°C. Pour les graphes (68.A) et (68.B), la courbe en vert représente Bcl-xl $\Delta$ TM seule, la courbe en bleu TCTP seule et la courbe en rouge le mélange des deux protéines. Pour les graphes (68.C) et (68.D), la courbe en vert représente Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM seule, la courbe en bleu TCTP seule et la courbe en rouge le mélange des deux protéines.

Dans les figures 68.A et 68.B, nous observons une superposition des profils d'élutions de colonne d'exclusion de taille : du mélange TCTP+Bcl-xl $\Delta$ TM en jaune, du mélange monomère-dimère de Bcl-xl $\Delta$ TM en vert et de TCTP seule en bleu. De même, dans les figures 68.C et 68.D, nous observons une superposition des profils d'élutions de gel filtration : du mélange TCTP+Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM en orange, du mélange monomère-dimère de Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM en vert foncé et de TCTP seule en bleu. Lorsque nous comparons les courbes jaunes du mélange TCTP+Bcl-xl $\Delta$ TM à 30°C et à 4°C, voir les figures 68.A et 68.B, nous remarquons que le pic du complexe régresse et que celui du

dimère de Bcl-x1ΔTM augmente à basse température. Le même changement de profil est observé pour le mélange TCTP+Bcl-x1Δ45-84ΔTM lorsque la température d'incubation passe de 30°C à 4°C, voir figures 68.C et 68.D. Comme pour le complexe TCTP/Bcl-x1Δ27-81ΔTM, la température favorise la formation des complexes et les formes dimériques de Bcl-x1ΔTM et de Bcl-x1Δ45-84ΔTM semblent interagir préférentiellement avec TCTP par rapport aux monomères.

Complexe entre TCTP et CMcl-1 :



**Figure 69 : Superposition de profils de gel filtration de CMcl-1, de TCTP et du mélange des deux protéines à 30°C et à 4°C.** Pour ces deux graphes, la courbe en vert représente CMcl-1 seule, la courbe en bleu TCTP seule et la courbe en rouge le mélange des deux protéines.

Nous observons dans ces deux graphes une superposition des profils d'élution de colonne d'exclusion de taille : du mélange TCTP avec CMcl-1 en rouge, de CMcl-1 seule en vert et de TCTP seule en bleu, incubées à 30°C et à 4°C. Dans ces deux conditions de température, le pic du complexe de la courbe rouge est présent, mais son intensité est plus faible à 4°C qu'à 30°C, mettant en avant l'effet de la température sur la formation du complexe TCTP/CMcl-1.

**Conclusion :**

Ces expériences montrent que la température d'incubation de ces protéines est un paramètre crucial pour la formation de ces complexes. Lorsque TCTP est mélangé à 4°C sur la nuit avec chacun de ses partenaires : Bcl-x1Δ27-81ΔTM, Bcl-x1Δ45-84ΔTM, Bcl-x1ΔTM et CMcl-1, peu de complexes voire aucun complexe n'est obtenu (voir figures 67, 68 et 69). Alors que lorsque nous reproduisons ces expériences à 30°C, dans tous les cas les complexes sont formés (voir figures 67, 68 et 69).

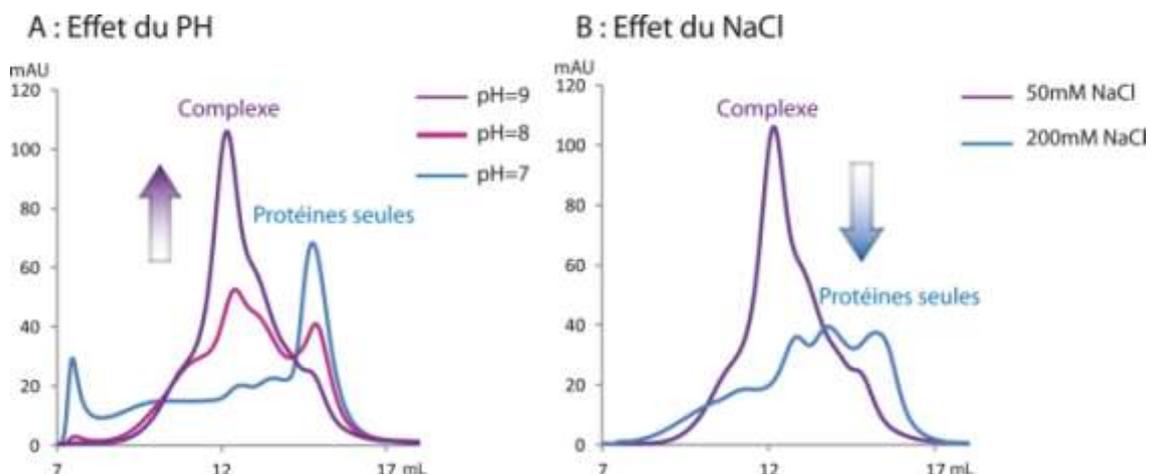
L'hypothèse émise serait que l'énergie apportée par le chauffage induirait un changement de conformation des protéines favorable à la formation des complexes. De plus, la température d'incubation à 30°C étant proche de celle de dénaturation de TCTP à 39°C (voir figure 82), cela pourrait conduire à une légère restructuration ou un faible dépliement de TCTP propice aux interactions.

Par contre, la cinétique de formation du complexe n'a pas été approfondie puisque toutes les expériences ont été effectuées sur la nuit.

### V.1.2. Influence du pH et du sel

Nous avons voulu également testé l'influence du pH et du sel sur les complexes : TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, TCTP/Bcl-xl $\Delta$ TM et TCTP/CMcl-1, en incubant ces protéines à différents pH : 7, 8 et 9, et à plusieurs concentrations en sels : de 50 à 500 mM NaCl, à température constante : 30°C.

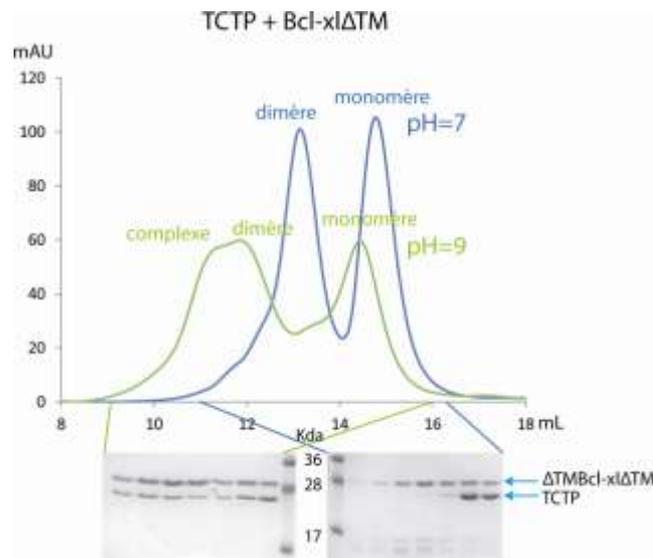
Complexe entre TCTP et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM :



**Figure 70 : Superposition de profils de gel filtration du mélange TCTP + Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM dans différentes conditions de pH (70.A) et de concentrations en NaCl (70.B).** Dans la figure 70.A, la courbe en bleu correspond au mélange incubé à pH=7, en magenta à pH=8 et en violet à pH=9. Dans la figure 70.B, la courbe en bleu correspond à une incubation du mélange à 200mM NaCl et en violet à 50mM NaCl.

La figure 70.A présente une superposition des profils d'élution du mélange TCTP+Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM incubé à 30°C à différents pH : 7, 8 et 9. La figure 70.B montre une superposition des profils d'élution du mélange TCTP+Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM incubé à 30°C à 50 et à 200mM NaCl. Dans la figure 70.A, à mesure que le pH augmente, le pic des protéines seules s'abaisse alors que celui du complexe s'accroît, ainsi le pH optimal pour la formation du complexe est pH=9. Dans la figure 70.B, à 50mM NaCl, le pic du complexe est majoritaire, alors qu'à 200mM NaCl, le pic du complexe est raplati et plusieurs petits pics apparaissent au niveau des protéines seules. Ces expériences soulignent l'importance d'une faible salinité pour stabiliser le complexe.

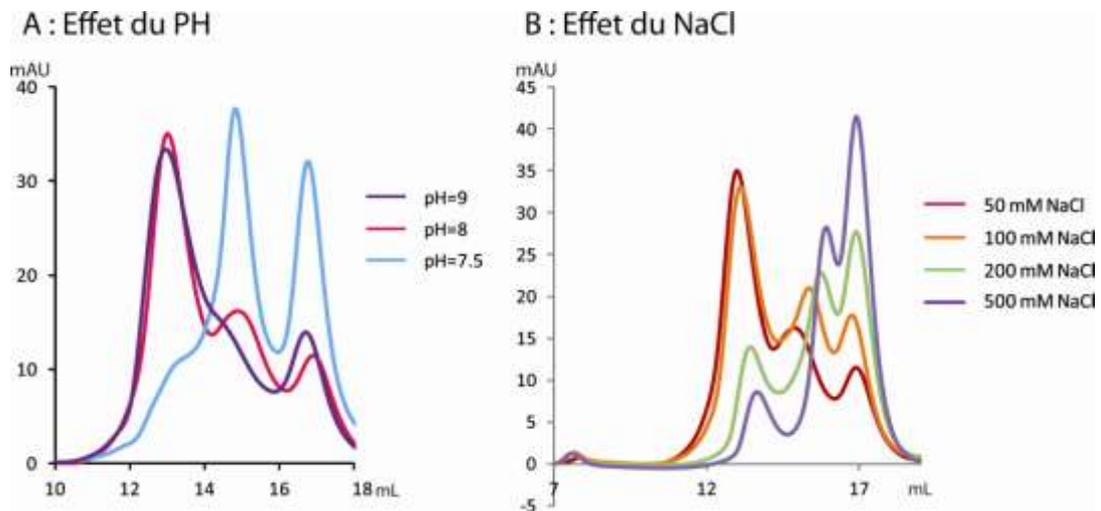
Complexe entre TCTP et Bcl-x1ΔTM :



**Figure 71 : Superposition de profils de gel filtration du mélange TCTP + Bcl-x1ΔTM à pH=7 et à pH=9, avec les gels dénaturants de leurs profils d'éluions. La courbe bleue correspond au mélange TCTP + Bcl-x1ΔTM à pH=7 et la courbe verte correspond au mélange TCTP + Bcl-x1ΔTM à pH=9.**

La figure 71 montre une superposition de deux profils d'éluion de gel filtration du mélange TCTP+Bcl-x1ΔTM incubé à 30°C, à pH=7 en bleu, et à pH=9 en vert. Bcl-x1ΔTM se trouve à la fois sous forme monomérique et dimérique. La courbe bleue présente deux pics correspondant aux deux formes de Bcl-x1ΔTM, et d'après le gel dénaturant, TCTP se trouve au même volume de rétention que le monomère de Bcl-x1ΔTM. Par conséquent, à pH=7 le complexe entre TCTP et Bcl-x1ΔTM n'est pas formé. En revanche, la courbe verte montre trois pics, et d'après le gel dénaturant des fractions d'éluion, la bande de TCTP se trouve dans les hauts poids moléculaires avec Bcl-x1ΔTM. Ainsi, ces trois pics correspondent au complexe et aux deux formes de Bcl-x1ΔTM. Par rapport au profil d'éluion à pH=7, les pics de la courbe à pH=9 sont un peu décalés vers les hauts poids moléculaires, à cause de l'effet du pH.

## Complexe entre TCTP et CMcl-1 :



**Figure 72 : Superposition de profils de gel filtration du mélange TCTP + CMcl-1 dans différentes conditions de pH (72.A) et de concentrations en NaCl (72.B).** Dans la figure 72.A, la courbe en bleu correspond au mélange incubé à pH=7,5, en magenta à pH=8 et en violet à pH=9. Dans la figure 72.B, la courbe en violet correspond à une incubation du mélange à 500mM NaCl, en vert à 200mM NaCl, en orange à 100mM NaCl, et en rouge à 50mM NaCl.

La figure 72 montre une superposition des profils d'éluion de colonne d'exclusion de taille du mélange TCTP+CMcl-1 incubé à 30°C, suivant différentes conditions de pH : 7,5, 8 et 9 (figure 72.A), et suivant plusieurs concentrations en NaCl : de 50 à 500mM (figure 72.B). D'après la figure 72.A, le pic du complexe décroît fortement lorsque le pH diminue d'une demi-unité, de 8 à 7,5, tandis qu'aux pH alcalins, entre 8 et 9, il ne semble pas y avoir de grands changements. Ainsi, il y aurait un pH critique à ne pas dépasser pour visualiser le complexe TCTP/CMcl-1. D'après la figure 72.B, le pic du complexe diminue à mesure que la quantité en NaCl augmente, ainsi une faible salinité en NaCl stabilise le complexe TCTP/CMcl-1.

### **Conclusion :**

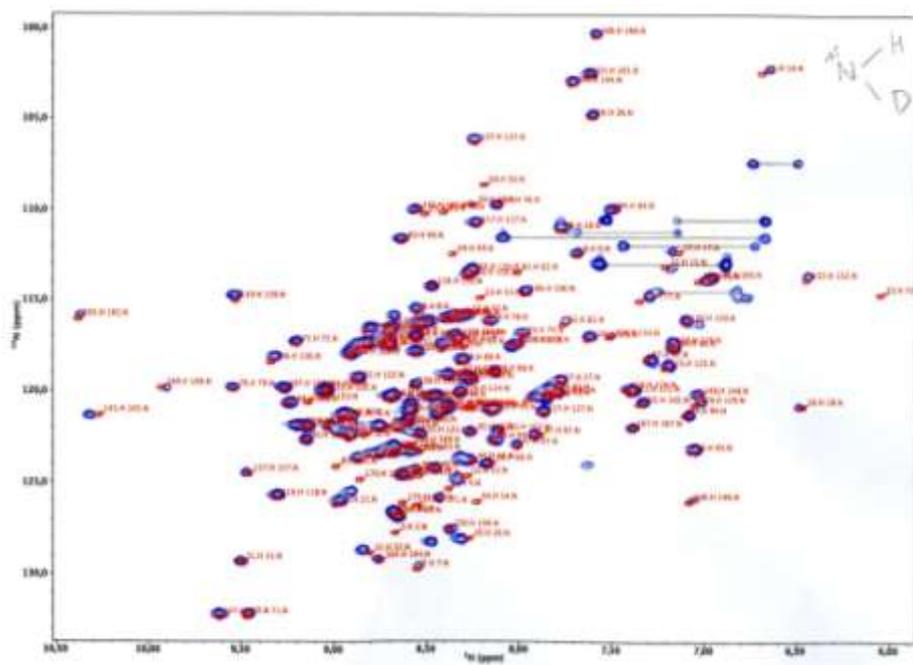
Ces expériences montrent que les trois complexes TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, TCTP/Bcl-xl $\Delta$ TM et TCTP/CMcl-1 sont formés dans les mêmes conditions : à pH 9 alcalin, et à faible salinité (50mM NaCl). Ces complexes se dissocient progressivement à mesure que la concentration en NaCl augmente, par conséquent les interactions doivent être de nature électrostatique. De plus, Bcl-xl est connue pour interagir via des interactions électrostatiques avec d'autres protéines impliquées dans l'apoptose telles que P53 et le cytochrome C (Sot et al. 2007 ; Yadaiah et al., 2007). Ces complexes sont également sensibles à la variation de pH. Or la charge des protéines, locale ou globale, varie en fonction du pH, ainsi ces données viennent conforter la nature électrostatique des interactions.

## V.1.3. Etudes structurales en RMN et en Cristallographie

### V.1.3.1. Etude préliminaire en RMN

Une fois que les conditions de formation des complexes ont été mises en évidence, nous avons voulu cartographier les zones d'interactions des complexes TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et TCTP/CMcl-1 en RMN. De plus, les structures des protéines seules ont été résolues en solution, c'est-à-dire que les déplacements chimiques de l'ensemble des protons, azotes et carbones de TCTP, de Mcl-1 et de Bcl-xl sont déjà attribués (Feng et al., 2007; Liu et al., 2010)

Dans un premier temps, nous avons étudié TCTP marquée au  $^{15}\text{N}$  afin de reproduire le spectre HSQC $^{15}\text{N}$ -H de l'article où la structure de TCTP a été résolue, et de vérifier ainsi le bon repliement de TCTP produit au laboratoire.



**Figure 73 :** Superposition des spectres HSQC $^{15}\text{N}$ -H de TCTP produit au laboratoire et de celui issu de l'article. Le spectre de TCTP provenant du laboratoire est en bleu tandis que celui issu de l'article est en rouge.

La figure 73 montre une superposition des spectres HSQC $^{15}\text{N}$ -H de TCTP produit au laboratoire en bleu, et du spectre issu de la publication en rouge. Les deux spectres se superposent pour la majorité des pics. Cependant, certains signaux ne se superposent pas car les constructions de TCTP utilisés pour ces deux expériences ne sont pas identiques, notamment les résidus restants à la suite de la coupure de l'étiquette. Nous pouvons conclure que la protéine TCTP purifiée au laboratoire est bien repliée et que nous avons pu attribuer l'ensemble de ses signaux grâce aux déplacements chimiques publiés.

Toutefois, les conditions de formation des complexes ne sont pas compatibles avec la HSQC<sup>15</sup>N-H car à pH alcalin les protons des amines s'échangent plus facilement avec ceux de l'eau, abaissant ainsi la résolution du spectre. Nous avons donc décidé de suivre l'interaction de ces deux protéines via les protons des groupements méthyles, qui ne sont pas affectés par les pH basiques. Pour ce faire, nous avons marqué TCTP au C<sup>13</sup>, et analysé les HSQC<sup>13</sup>C-H de TCTP<sup>13</sup>C seule, en présence de CMcl-1 et en présence de Bcl-xlΔ27-81ΔTM, les protéines étant incubées dans les conditions habituelles : 50mM NaCl, 10mM Tris pH=8 à 30°C sur la nuit.

La figure 74 ci-dessous présente trois spectres, le premier correspond à celui de TCTP<sup>13</sup>C seule en rouge, le deuxième à la superposition du mélange TCTP<sup>13</sup>C+CMcl-1 en bleu avec celui de TCTP<sup>13</sup>C seule en rouge, et le troisième à la superposition du mélange TCTP<sup>13</sup>C+Bcl-xlΔ27-81ΔTM en vert avec celui de TCTP<sup>13</sup>C seule en rouge. Nous avons superposé le spectre de TCTP<sup>13</sup>C seule avec ceux des mélanges afin de suivre l'apparition et la disparition des signaux de TCTP<sup>13</sup>C une fois complexée. Pour les deux mélanges, nous observons une disparition importante des signaux par rapport au spectre de TCTP<sup>13</sup>C seule. Cela signifie que la plupart des signaux des complexes ne sont pas visibles à cause de la taille trop importante des complexes, et par conséquent ils ne sont pas attribuables. Les signaux inchangés sont ceux situés au centre du spectre correspondant aux parties flexibles de la protéine TCTP<sup>13</sup>C.

Il est intéressant de noter, que les spectres des deux mélanges présentent des différences : des signaux apparaissent dans la partie droite du spectre de TCTP<sup>13</sup>C+CMcl-1 contrairement au spectre de TCTP<sup>13</sup>C+Bcl-xlΔ27-81ΔTM, ce qui montre que TCTP interagit différemment avec Bcl-xlΔ27-81ΔTM et CMcl-1.

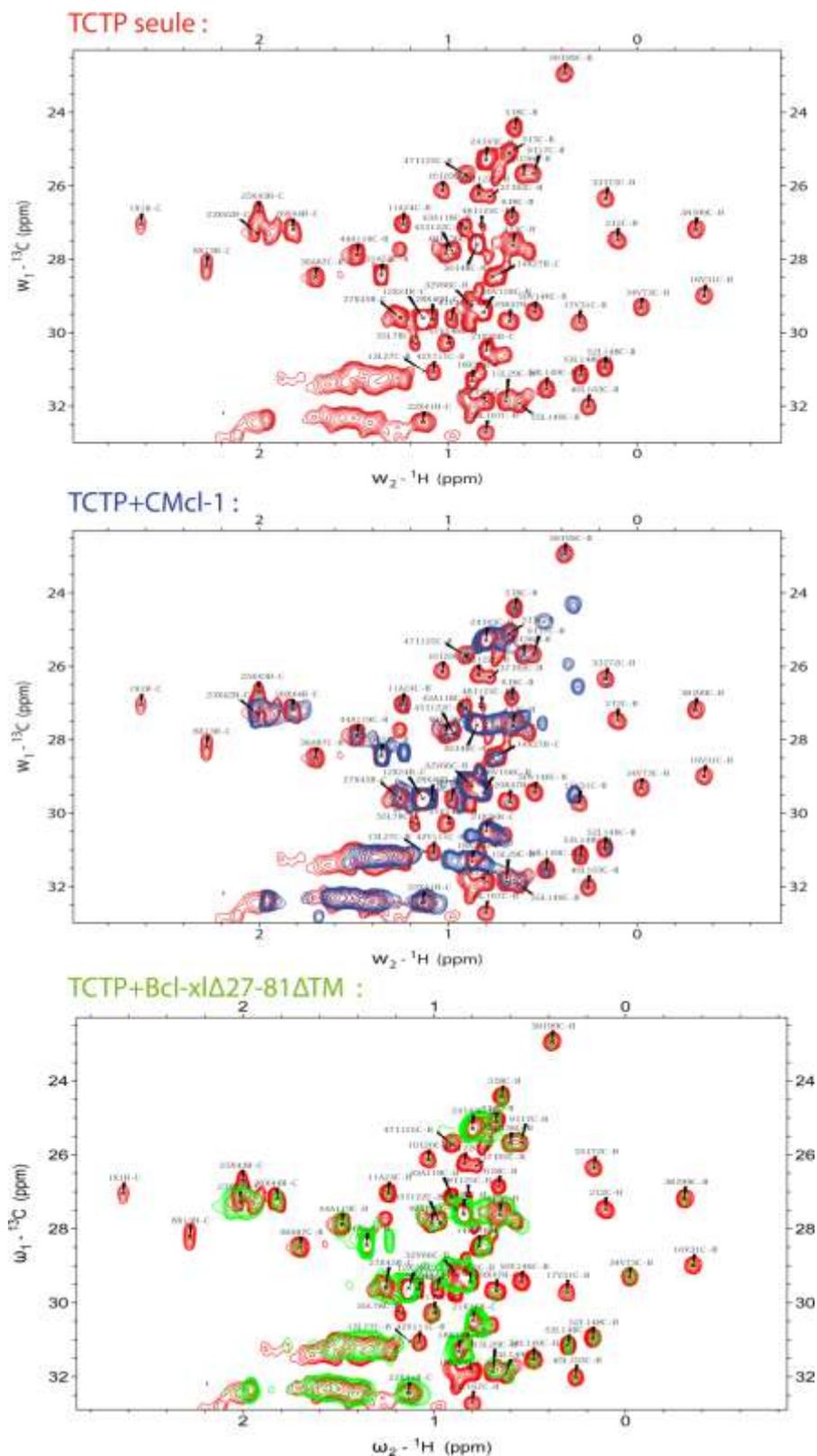


Figure 74 : Les trois spectres HSQC  $^{13}\text{C}$ -H de TCTP  $^{13}\text{C}$  seule, et des mélanges TCTP  $^{13}\text{C}$  + CMcl-1 et TCTP  $^{13}\text{C}$  + Bcl-xIΔ27-81ΔTM superposés à celui de TCTP  $^{13}\text{C}$  seule. Le spectre de TCTP  $^{13}\text{C}$  est en rouge, celui du mélange TCTP  $^{13}\text{C}$  + CMcl-1 en bleu et celui du mélange TCTP  $^{13}\text{C}$  + Bcl-xIΔ27-81ΔTM en vert.

Pour conclure, les analyses en RMN ont permis de confirmer la formation des complexes TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et TCTP/CMcl-1, mais aucune information structurale n'a pu être extraite de ces spectres. En effet, la RMN est un outil limitant quand il s'agit d'étudier des complexes de taille importante. Nous nous sommes donc tournés vers la cristallisation, une technique qui n'est pas limitée par la taille des macromolécules.

### V.1.3.2. Cristallogénèse

La cristallogénèse est une étape au cours de laquelle nous essayons d'obtenir des cristaux. Cette étape est souvent limitante et fastidieuse car il faut aboutir à des cristaux qui diffractent de manière satisfaisante. Les complexes qui ont été étudiés en cristallogénèse sont :

- His-TCTP/Bcl-xl (co-expression)
- TCTP coupé/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM (co-purification)
- TCTP/CMcl-1 (co-purification)

Dans un premier temps, des pré-tests de précipitation sont réalisés de façon à connaître l'intervalle de concentration en protéines à utiliser pour se situer entre la courbe de saturation et la zone de précipitation. Ensuite, dans cet intervalle de concentration, plusieurs screens généralistes ont été effectués de façon à parcourir des conditions très variées. Le but de ces criblages est de trouver des conditions dans lesquelles apparaissent des amorces de cristaux, des « hits ». Il est important de distinguer les « bons » précipités, qui sont blancs et cristallins, des « mauvais » précipités qui sont souvent marron. Nous avons testé différents complexes en cristallogénèse, les paramètres utilisés sont répertoriés dans le tableau 14 ci-dessous :

Complexes	Purification	DO	screens	Température	Conclusion
His-TCTP/Bcl-xl	IMAC Ni <sup>2+</sup> , Superdex S200	0,9	JCSG+, The Classics, Wizard I+II, Pro-complex, AmSo <sub>4</sub> , The Pegs	17°C et 4°C	Pas de Hits
TCTP coupé / Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM	QHP, Superdex S200	3,7 8,7	Wizard I+II, The Pegs, JCSG+, The Classics, PACT	20°C et 4°C	Pas de Hits
TCTP/CMcl-1	Superdex S200	1, 1,6	Pro-complex, JCSG+, Wizard I et II, Cations, Memfac	20°C et 4°C	Deux Hits
TCTP/CMcl-1	Superdex S200 Echantillon préchauffé à 30°C	1,65 2,45	The PEGS, Procomplex JCSG+, Wizard letII	37°C	Pas de Hits

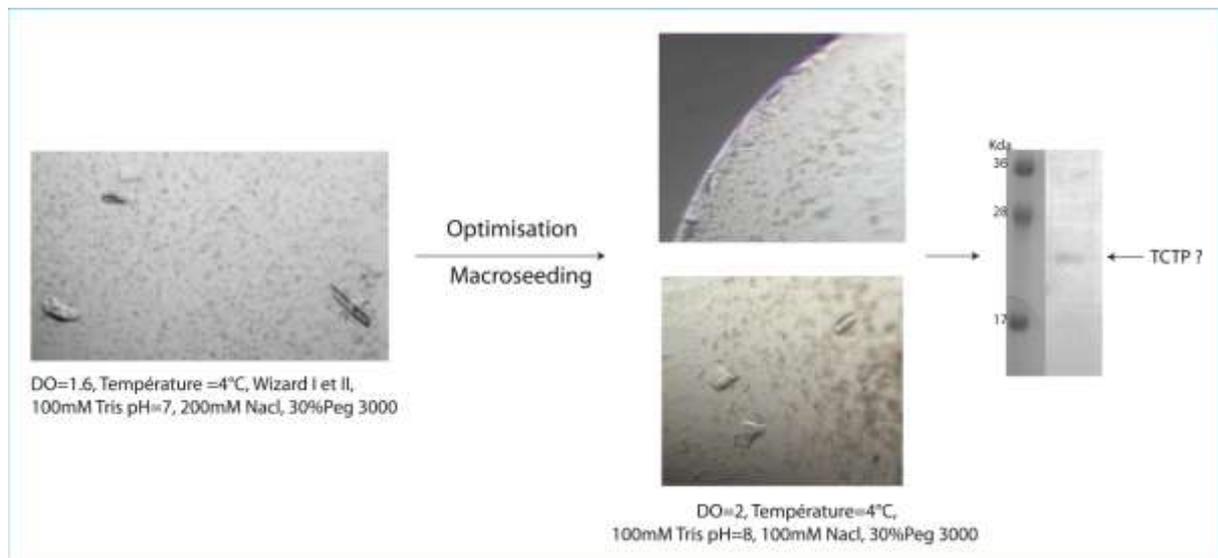
**Tableau 14 : Récapitulatif des conditions des screens généralistes réalisés.** Ces criblages ont été effectués avec les complexes His-TCTP/Bcl-xl, TCTP coupé/ Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et TCTP/CMcl-1. Ce tableau indique les étapes de purification des complexes, les DO des protéines, les screens et les températures utilisés, ainsi que la conclusion des screens.

Pour le complexe His-TCTP/Bcl-xl co-exprimé, les gouttes présentent des précipités non prometteurs. Nous n'avons donc pas persisté dans cette voie, sachant en plus que le complexe peut être un artefact lié au tag His. En outre, cette espèce est relativement polydisperse en DLS et des impuretés demeurent après purification (voir partie III.1.2.5).

Le complexe TCTP coupé/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM co-purifié a été peu étudié et les gouttes formées n'ont pas donné de précipités cristallins.

A la suite des screens généralistes réalisés sur le complexe TCTP/CMcl-1 co-purifié, deux amorces ont été identifiées : des petits cristaux à 4°C et des sphérulites à 20°C, dans le screen Wizard letII. Afin d'optimiser ces résultats, du macro-ensemencement a été réalisé avec ces germes cristallins en vue de favoriser la nucléation.

#### Optimisation des petits cristaux :

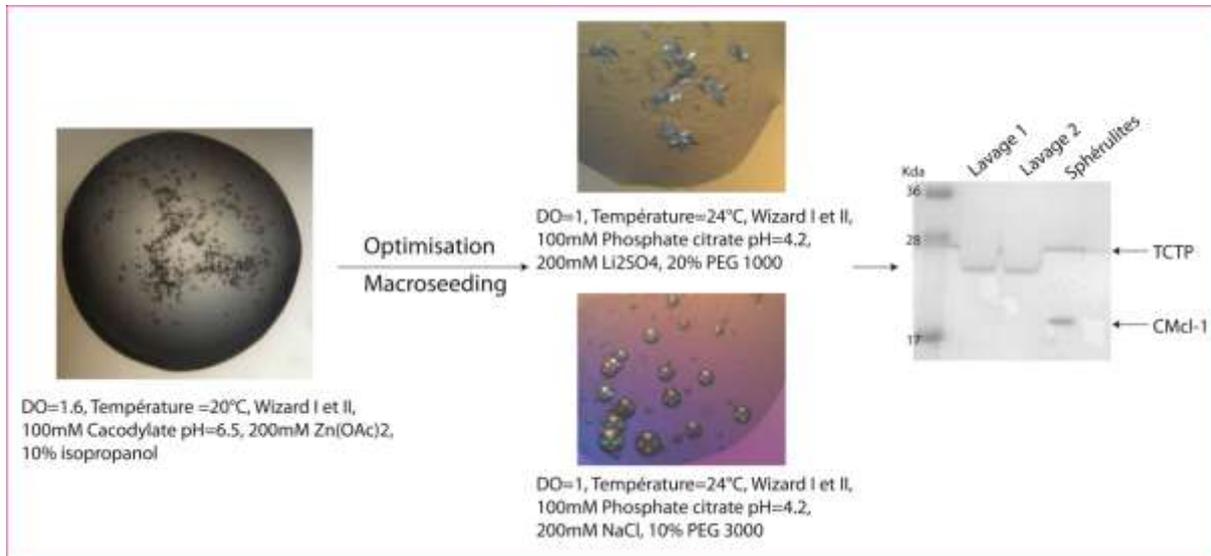


**Figure 75 : Résumé des étapes d'optimisation des petits cristaux.** Les petits cristaux ont été obtenus à 4°C, DO=1,6 dans 100mM Tris pH=7, 200mM NaCl et 30% Peg 3000. Du macro-ensemencement est réalisé à partir de ces petits cristaux dans des conditions proches de celle de départ mais avec une DO=2 en protéines. Des plus gros cristaux sont obtenus à 100mM Tris pH=8, 100mM NaCl, 30% Peg 3000 et sont analysés sur gel SDS-PAGE.

La figure 75 montre les étapes d'optimisation des petits cristaux obtenus à 4°C avec une DO=1,6 en protéines, dans 100mM Tris pH=7, 200mM NaCl et 30% Peg 3000, dans le screen généraliste Wizard I et II. Nous avons réalisé du macro-ensemencement à partir des cristaux de départ, autour des conditions initiales en faisant varier le pH de 7 à 9, la concentration en NaCl de 50 à 500mM, et le PEG 3000 de 20 à 40%. Cette technique a permis d'obtenir des cristaux de plus grande taille à 100mM Tris pH=8, 100mM NaCl et 30% Peg 3000. Nous avons vérifié sur gel dénaturant la présence de protéines dans ces cristaux : une seule bande apparaît (voir figure 75). La

migration de la bande ne permet pas d'identifier clairement s'il s'agit de TCTP ou de CMcl-1. Nous pouvons conclure que ces conditions favorisent la cristallisation d'une seule des espèces.

#### Optimisation des sphérulites :



**Figure 76 : Résumé des étapes d'optimisation des sphérulites.** Les sphérulites ont été obtenues à 20°C, DO=1,6 dans Cacodylate Tris pH=6,5, 200mM Zn(OAc)<sub>2</sub> et 10% isopropanol. Du macro-ensemencement est réalisé à partir de ces sphérulites dans le screen Wizard I et II mais avec une DO=1 en protéines. Des espèces polycristallines et des sphérulites de grosses tailles ont été obtenues et les sphérulites sont analysées sur gel.

La figure 76 présente les étapes d'optimisation des sphérulites obtenues à 20°C, avec une DO=1,6 en protéines, dans 100mM Cacodylate pH=6,5, 200mM Zn(OAc)<sub>2</sub> et 10% isopropanol, dans le screen généraliste Wizard I et II. En réalisant du macro-ensemencement à partir de ces sphérulites dans une nouvelle boîte de screen Wizard I et II, nous obtenons des sphérulites de plus grosses tailles (voir figure 76), à 100mM Phosphate Citrate pH=4,2, 200mM NaCl et 10% Peg 3000, et des espèces polycristallines (voir figure 76), à 100mM Phosphate Citrate pH=4,2, 200mM Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et 20% Peg 1000. Les sphérulites de grosse taille sont lavées dans le tampon du réservoir puis dans de l'eau. Les lavages ainsi que les sphérulites sont analysés sur gel dénaturant (voir figure 76). Nous observons une bande de protéine, correspondant à TCTP, dans tous les lavages, et deux bandes pour les sphérulites. La même bande est retrouvée dans les sphérulites et dans les lavages indiquant que les sphérulites n'ont pas été bien lavées. La deuxième bande seulement présente dans les sphérulites correspond à CMcl-1. Par conséquent, ces conditions favorisent également la solidification d'une seule espèce.

En analysant les conditions des petits cristaux et des sphérulites, nous remarquons que ces amorces sont apparues à pH=7 ou à pH=6.5 à 200mM NaCl. Il s'agit de conditions qui dissocient le complexe et où les protéines se trouvent libres, ce qui pourrait expliquer pourquoi nous ne

parvenons pas à voir les deux protéines dans ces germes. Nous avons donc décidé de mettre au point des criblages avec des conditions qui stabilisent le complexe : pH alcalin et faible salinité, en faisant varier l'agent précipitant : The PEGs. Plusieurs tampons ont été évalués : CAPS, CHES, Imidazole et Tris, tous ayant un pKa basique. Mais dans ces conditions restreintes, aucune amorce n'a été obtenue.

## V.2. Caractérisation biophysique

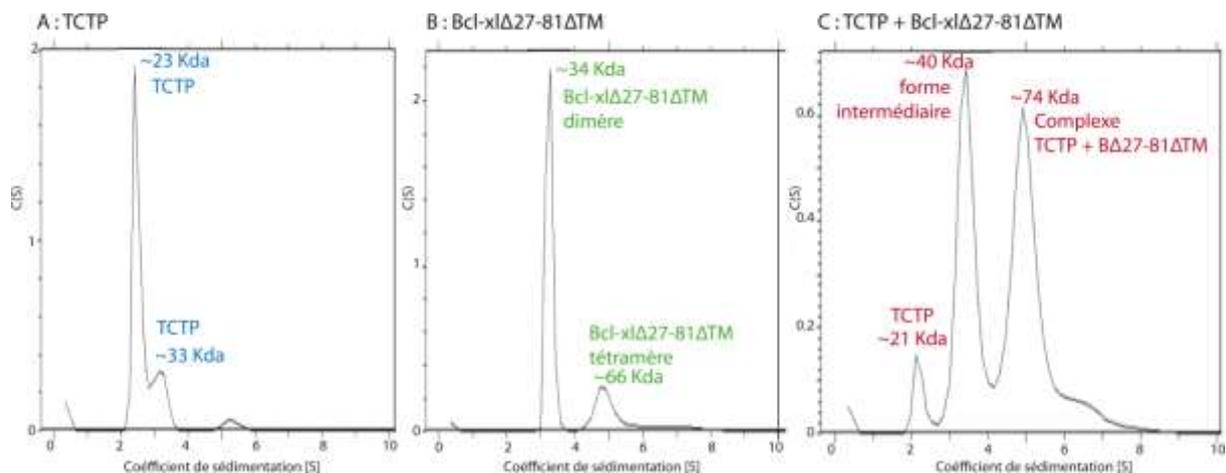
Nous avons ensuite réalisé des études biophysiques en ultracentrifugation analytique, SEC-MAS et spectrométrie de masse avec les complexes TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et TCTP/CMcl-1 en vue de déterminer leur poids moléculaire et leur stœchiométrie. Les complexes sont préparés dans les conditions habituelles.

### V.2.1. Etude des complexes avec TCTP et les différentes formes de Bcl-xl

#### Analyse en ultracentrifugation analytique du complexe TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM :

L'ultracentrifugation analytique est une technique qui permet de déterminer la forme et la masse molaire des protéines ainsi que la constante de dissociation des complexes, en mesurant le coefficient de sédimentation de ces espèces. Les échantillons sont analysés en temps réel à l'aide de détecteurs optiques qui mesurent en absorbance et en interférence.

Nous avons eu recours à cette technique afin de calculer la masse molaire et la stœchiométrie du complexe TCTP/ Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM.

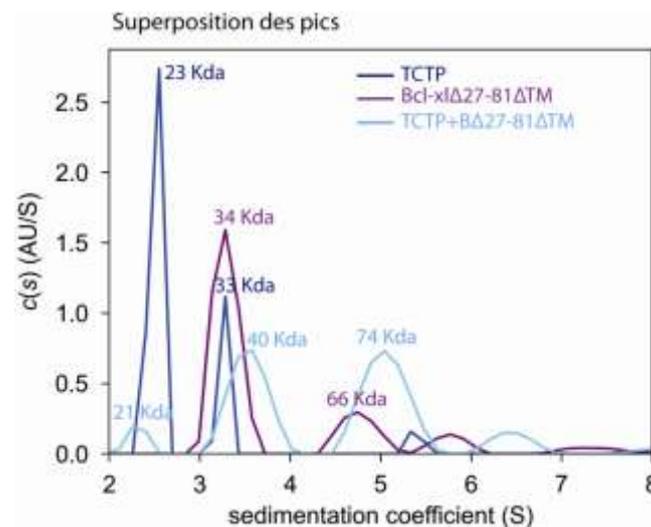


**Figure 77 : Profils de sédimentation de TCTP (77.A), Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM (77.B) et du mélange (77.C).**

Dans la figure 77 se trouve les profils de sédimentation obtenus à partir de mesures en absorbance, de TCTP (77.A), de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM (77.B) et du mélange des deux protéines (77.C). D'après la figure 77.A, TCTP se trouve majoritairement sous forme monomérique avec un poids

moléculaire calculé de 23 Kda (la masse théorique est de 20 Kda). La figure 77.B montre que Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM seule est formée principalement de dimères à 34 Kda (la masse théorique est de 35 Kda) et d'un peu de tétramères à 66 Kda (la masse théorique est de 70 Kda). Enfin, le graphe 77.C du mélange indique la présence de deux nouvelles espèces aux environs de 40 Kda et de 74 Kda. La forme à plus haut poids moléculaire pourrait correspondre au complexe 2 : 2, de masse théorique de 75 Kda, tandis que la forme à plus bas poids moléculaire pourrait s'agir du dimère de TCTP (masse théorique à 40 Kda) ou d'une forme intermédiaire.

En regroupant l'ensemble de ces données dans un seul graphique, nous remarquons que les complexes formés sont de faible intensité par rapport aux protéines seules (figure 78).

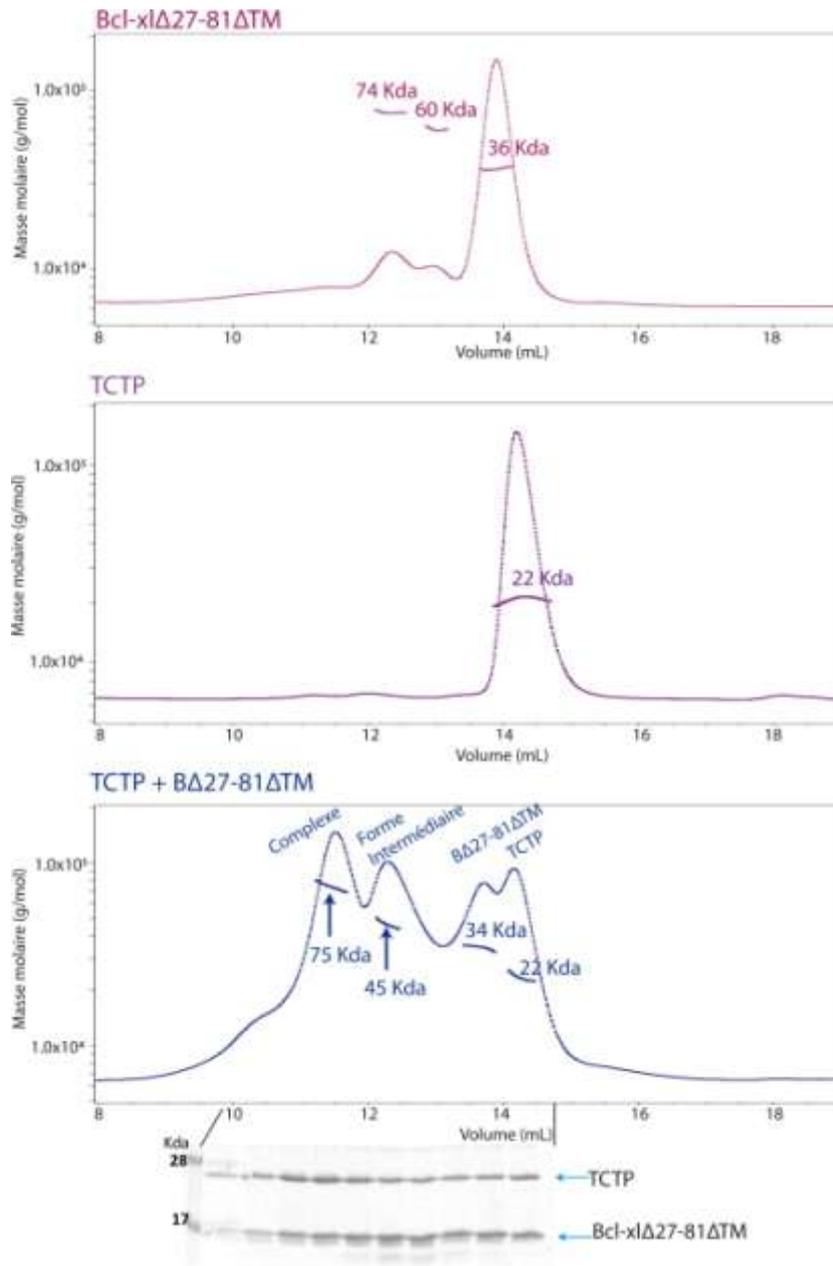


**Figure 78 : Superposition des profils de sédimentation de TCTP, de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et du mélange.** La courbe en bleu foncée représente le profil de sédimentation de TCTP seule, celle en violet de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM seule et celle en bleu cyan du mélange.

La figure 78 présente la superposition des profils de sédimentation de TCTP en bleu foncé, de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM en violet et du mélange en bleu cyan. Les complexes à 40 et à 74 Kda du mélange sont proches des formes dimériques et tétramériques de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM à 34 et à 66 Kda car le poids moléculaire de TCTP est légèrement plus élevé que celui de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. D'autres méthodes biophysiques pourraient apporter un meilleur éclairage sur ces complexes.

#### **Analyse en SEC-MALS du complexe TCTP/ Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM :**

Cette technique couple une colonne d'exclusion de taille au MALS (Multi-Angle Light Scattering). Cet outil permet de déterminer, de manière indépendante, la masse molaire et la taille des particules en solution, suivant leur façon de diffuser la lumière émise par un laser à plusieurs angles. Ces données permettent également de conclure sur l'homogénéité des échantillons. Le mélange TCTP+Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM a été analysé par cette méthode.



**Figure 79 : Alignement des profils de SEC-Mals de TCTP, de Bcl-x1Δ27-81ΔTM et du mélange des deux protéines.** Le graphe en magenta correspond aux mesures de réfractométrie et de masse molaire de Bcl-x1Δ27-81ΔTM, celui en violet correspond à TCTP et celui en bleu au mélange.

La figure 79 présente les profils dRI/dt superposés aux courbes de masse molaire, de Bcl-x1Δ27-81ΔTM en magenta, de TCTP en violet et du mélange en bleu. Bcl-x1Δ27-81ΔTM se trouve majoritairement sous forme de dimère à 36 Kda (la masse théorique est égale à 35 Kda), tandis que TCTP migre à 22 Kda (la masse théorique est de 20 Kda) à l'état de monomère. Le profil dRI/dt du mélange des deux protéines révèle de nombreux pics. A l'aide de la masse molaire détectée et du volume de rétention des pics, nous pouvons identifier les pics à 22 et à 34 Kda, qui correspondent

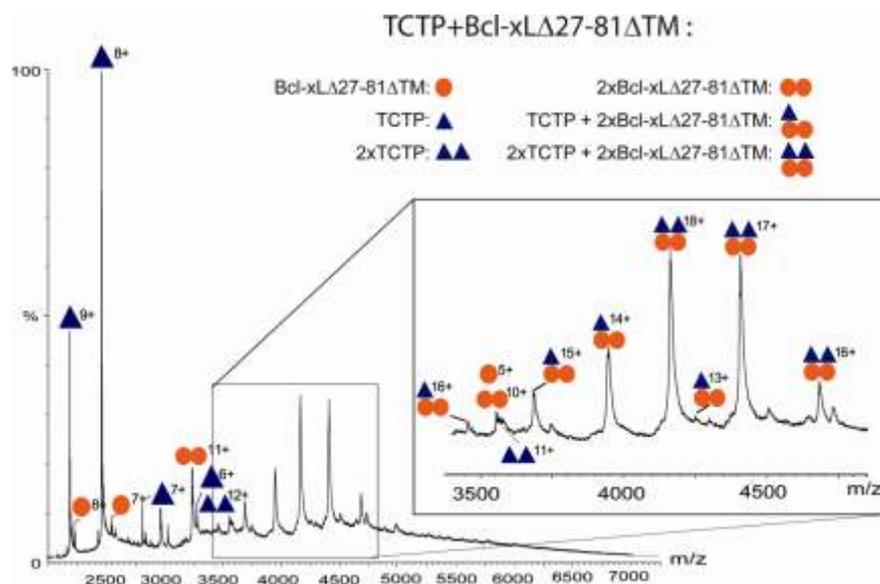
respectivement à TCTP et à Bcl-xL $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. Nous remarquons deux pics à plus haut poids moléculaire, à 75 et à 45 Kda, composés de TCTP et de Bcl-xL $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM d'après le gel dénaturant. Ainsi, comme en ultracentrifugation analytique, le SEC-MALS a mis en évidence deux complexes formés par TCTP et Bcl-xL $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM.

La mesure de la masse molaire en MALS peut varier suivant la pureté des fractions et la présence de précipités. L'espèce à 75 Kda pourrait correspondre au complexe 2xTCTP/2xBcl-xL $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM qui possède la même masse molaire, tandis que l'espèce à 45 Kda pourrait s'agir d'une forme intermédiaire composée soit de 2xTCTP/1xBcl-xL $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM de masse théorique de 57 Kda, soit de 1xTCTP/2xBcl-xL $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM de masse théorique de 55 Kda. D'après le gel dénaturant, au niveau du pic à 45Kda, la bande correspondant à Bcl-xL $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM est plus intense que celle de TCTP, donc il pourrait s'agir de la forme 1xTCTP/2xBcl-xL $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM.

Pour être vraiment sûr de la stœchiométrie des complexes, nous avons opté pour des analyses en spectrométrie de masse, qui s'avèrent être très précises.

#### **Analyse en spectrométrie de masse du complexe TCTP/Bcl-xL $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM :**

Les analyses en spectrométrie de masse (ESI-TOF) sont réalisées en condition native. Afin de détecter les complexes, le tampon d'analyse doit être alcalin et faiblement concentré en sels. Ainsi, après formation des complexes dans les conditions habituelles, un changement de tampon est effectué avec 50mM de bicarbonate d'ammonium. Le mélange TCTP+Bcl-xL $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM a été analysé avec cette méthode.

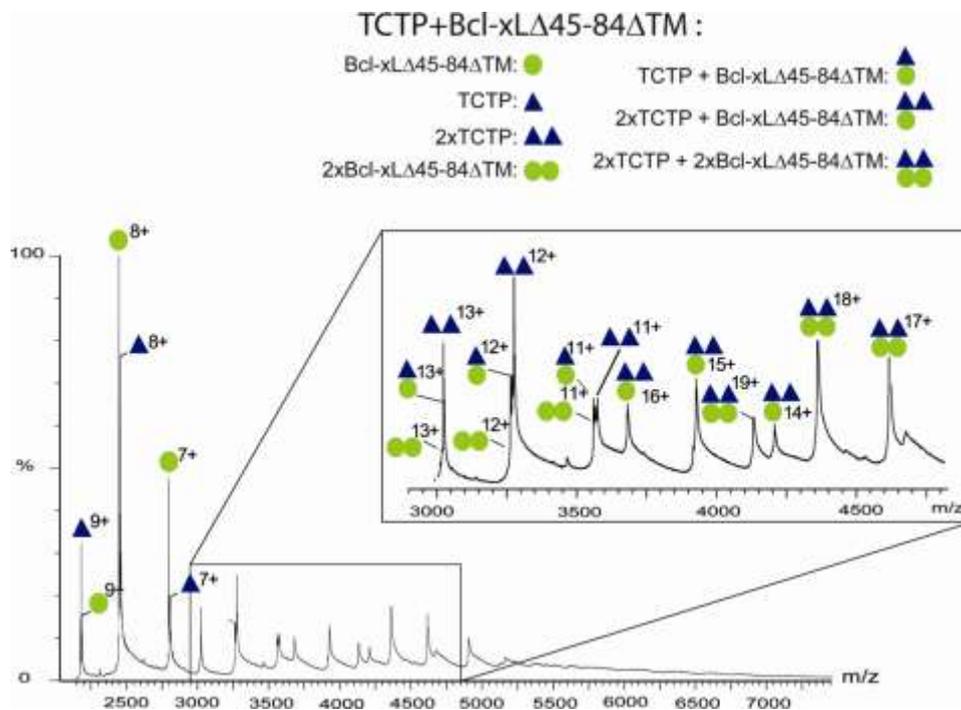


**Figure 80 : Spectre en ESI-TOF en condition native du mélange TCTP+Bcl-xL $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. Les sphères orange correspondent à Bcl-xL $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et les triangles bleus à TCTP.**

La figure 80 représente le spectre en ESI-TOF, en condition non dénaturante, du mélange TCTP+Bcl-xlΔ27-81ΔTM. Nous constatons la présence de plusieurs espèces telles que : le monomère et le dimère de Bcl-xlΔ27-81ΔTM, le monomère et le dimère de TCTP et les deux complexes : TCTP/2xBcl-xlΔ27-81ΔTM et 2xTCTP/2xBcl-xlΔ27-81ΔTM. Le complexe TCTP/Bcl-xlΔ27-81ΔTM n'est pas détecté puisque Bcl-xlΔ27-81ΔTM est purifiée uniquement sous forme de dimère et qu'une très faible quantité se dissocie en monomère. Les complexes obtenus par cette méthode viennent confirmer les résultats de l'UAC et du SEC-MALS, où nous observons le complexe 2xTCTP/2xBcl-xlΔ27-81ΔTM et une forme intermédiaire qui doit correspondre à l'espèce TCTP/2xBcl-xlΔ27-81ΔTM.

### Analyse en spectrométrie de masse du complexe TCTP/Bcl-xlΔ45-84ΔTM :

Nous avons également analysé en ESI-TOF, en condition native, le mélange TCTP+Bcl-xlΔ45-84ΔTM, où Bcl-xlΔ45-84ΔTM est un mélange de monomère et de dimère.



**Figure 81 : Spectre en ESI-TOF en condition native du mélange TCTP+Bcl-xlΔ45-84ΔTM. Les sphères vertes correspondent à Bcl-xlΔ45-84ΔTM et les triangles bleus à TCTP.**

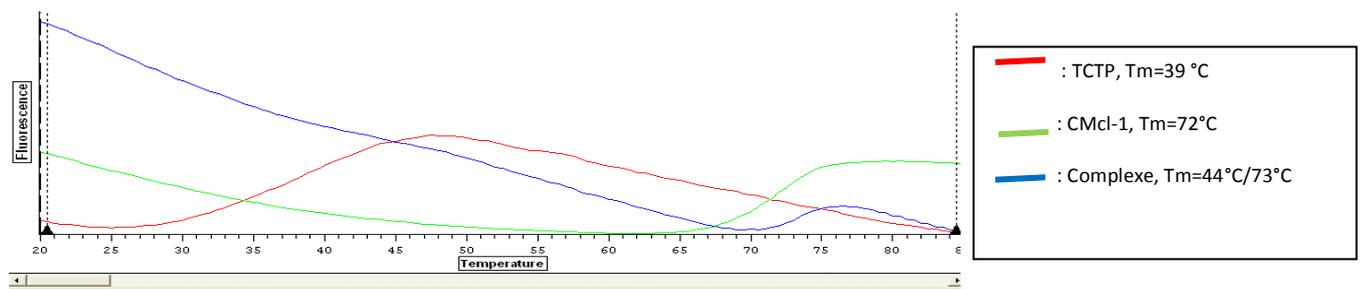
La figure 81 représente le spectre en ESI-TOF, en condition non dénaturante, du mélange TCTP+Bcl-xlΔ45-84ΔTM. Les espèces mises en évidence sont les protéines seules sous forme monomérique et dimérique ainsi que les complexes TCTP/Bcl-xlΔ45-84ΔTM, 2xTCTP/Bcl-xlΔ45-84ΔTM et 2xTCTP/2xBcl-xlΔ45-84ΔTM. Contrairement au mélange TCTP+Bcl-xlΔ27-81ΔTM, nous observons les complexes : TCTP/Bcl-xlΔ45-84ΔTM, 2xTCTP/Bcl-xlΔ45-84ΔTM, puisque Bcl-xlΔ27-81ΔTM se trouve sous forme monomérique dans la solution. Le point commun entre les deux constructions Bcl-xlΔ27-81ΔTM et Bcl-xlΔ45-84ΔTM, est la formation d'un complexe 2 : 2 avec TCTP.

## V.2.2. Etude du complexe TCTP/CMcl-1

Nous avons eu recours aux mêmes techniques qu'avec Bcl-xl (l'UAC, le SEC-MALS et la spectrométrie de masse) pour déterminer le poids moléculaire et la stœchiométrie du complexe TCTP/CMcl-1. Nous avons aussi utilisé la technique du thermofluor en vue de caractériser ce complexe.

### V.2.2.1. Caractérisation par thermofluor

Les protéines TCTP et CMcl-1 ainsi que le complexe ont été analysés en thermofluor, une technique permettant de calculer la température de dénaturation des protéines en suivant la fluorescence de l'échantillon en fonction de la température. La fluorescence provient d'un colorant ajouté au mélange, qui fluoresce uniquement en contact avec des régions hydrophobes. Or, lorsque la protéine est dénaturée, elle expose ses régions hydrophobes et induit ainsi la fluorescence du colorant (voir Matériel et Méthodes).

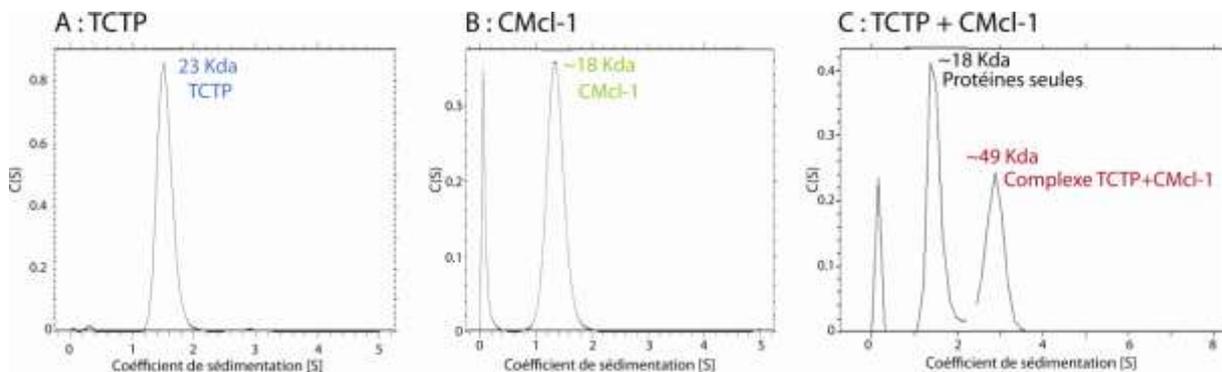


**Figure 82 : Profils de fluorescence de TCTP, CMcl-1 et du mélange.** La courbe en rouge représente TCTP qui a un  $T_m=39^\circ\text{C}$ , en vert CMcl-1 avec un  $T_m=72^\circ\text{C}$  et en bleu le mélange des deux protéines avec deux  $T_m=44^\circ\text{C}/73^\circ\text{C}$ .

La figure 82 montre les profils de fluorescence de TCTP en rouge, de CMcl-1 en vert et du mélange des deux protéines en bleu. L'ensemble des échantillons a été incubé dans les conditions de formation du complexe : à pH alcalin, à faible salinité et à 30°C sur la nuit, avant d'être analysés par thermofluor. D'après les points d'inflexion des courbes de fluorescence de TCTP et de CMcl-1, leur température de dénaturation est respectivement de 39°C et de 72°C. En revanche, la courbe de fluorescence du mélange ne présente pas clairement de pics de dénaturation mais plutôt une ligne basale. Dans certains cas, le colorant peut se lier dès le départ à la protéine, quand elle expose des régions hydrophobes sans être dénaturée, ou le colorant peut également ne pas interagir avec la protéine si elle est très hydrophile. Le complexe peut se trouver dans un de ces cas.

### V.2.2.2. Caractérisation par ultracentrifugation analytique (UAC)

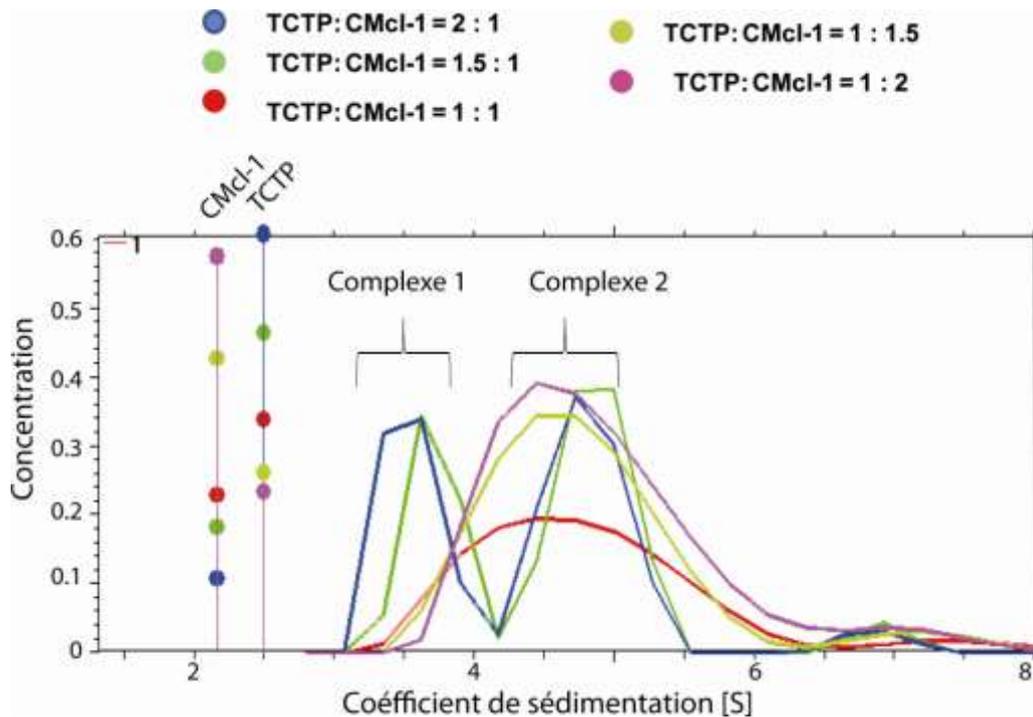
Comme pour Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, les protéines seules TCTP et CMcl-1 ainsi que le complexe, sont analysés en ultracentrifugation analytique. La différence par rapport aux expériences réalisées avec Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, est que ces protéines ont été séparées au préalable sur une gel filtration, et ce sont les fractions d'élution de chaque espèce qui ont été analysées.



**Figure 83 : Les trois figures représentent le profil de sédimentation par UCA de (83.A) TCTP, (83.B) CMcl-1 et (83.C) du complexe.**

Dans la figure 83 se trouve trois profils de sédimentation, obtenus à partir de mesures en absorbance, de TCTP seule (83.A), de CMcl-1 seule (83.B) et du complexe (83.C). D'après les figures 83.A et 83.B, la masse calculée pour les protéines seules est proche de la masse théorique : 23 Kda au lieu de 20 Kda pour TCTP et 18 Kda pour CMcl-1, ce qui correspond à la bonne masse. Le profil 84.C montre la présence du complexe aux alentours de 50 Kda, et des protéines seules. Cela laisse à penser que le complexe se dissocie et qu'il est en équilibre avec les protéines seules. Le calcul de la masse molaire en UAC dépend de plusieurs paramètres, dont la forme de la protéine. Or, ce paramètre est difficile à évaluer pour le complexe, ce qui apporte donc une imprécision au calcul de sa masse.

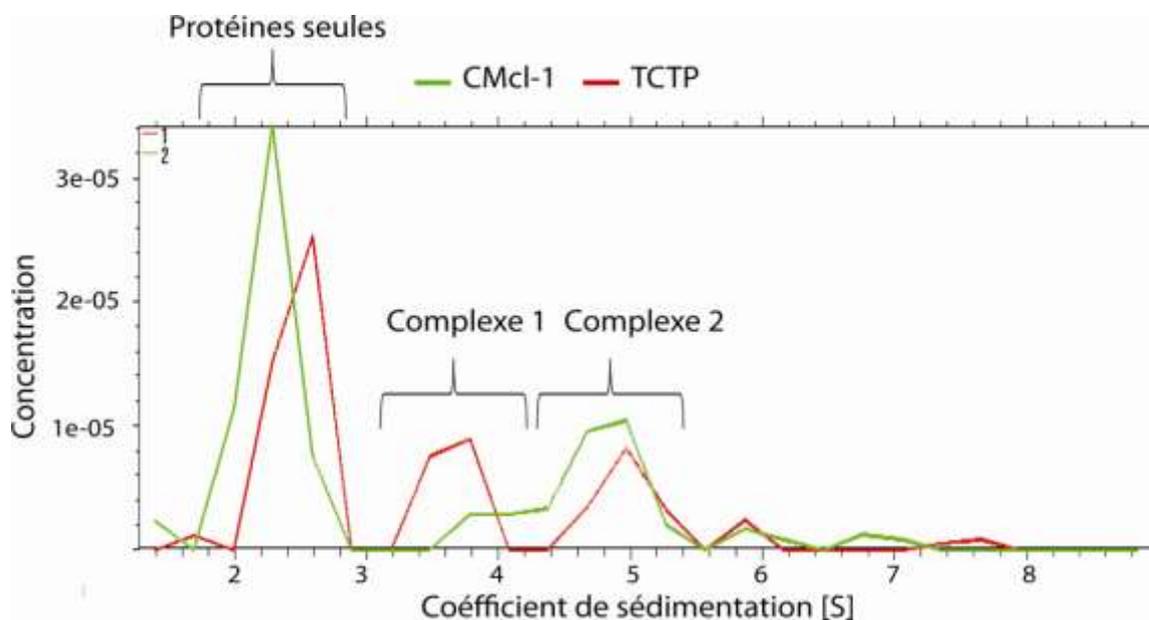
Afin d'évaluer précisément la stœchiométrie du complexe TCTP/CMcl-1, des échantillons contenant plusieurs ratios entre TCTP et CMcl-1 ont été analysés en absorbance. La superposition des graphes obtenus se trouve dans la figure 84. Par soucis de clarté, les pics des protéines seules ont été représentés par des points.



**Figure 84 : Superposition de profils de sédimentation du complexe avec différents ratios en protéines.** La courbe en bleu correspond au mélange avec deux excès de TCTP, la courbe en verte à celui avec 1,5 excès de TCTP et la courbe en rouge représente le mélange équimolaire. La courbe jaune correspond au mélange avec 1,5 excès de CMcl-1 tandis que le profil en violet est associé à deux excès de CMcl-1.

La figure 84 montre la superposition de plusieurs profils de sédimentation du mélange TCTP+CMcl-1 à différents ratios en protéines (TCTP:CMcl-1) : 2:1 en bleu, 1,5:1 en vert, 1:1 en rouge, 1:1,5 en jaune et 1:2 en violet. Par exemple, la courbe en bleu représente le profil de sédimentation du mélange avec 2 excès de TCTP, tandis qu'en magenta nous observons le profil de sédimentation du mélange avec 2 excès de CMcl-1. De manière surprenante, le profil du complexe varie suivant les ratios en protéines. Lorsque nous augmentons le ratio en TCTP, nous favorisons la présence de deux complexes, contrairement à CMcl-1. Ces deux complexes semblent être en équilibre, et le complexe 1 (voir figure 84) semble être favorisé par un excès de TCTP. La présence de plusieurs complexes n'a pas permis de quantifier la quantité en protéines présentes dans chacun de ces complexes, par conséquent il n'a pas pu être possible de déterminer leur stœchiométrie.

Des mesures en interférence sur le complexe 1 : 1 ont également été réalisées. Cela a permis d'avoir une idée de la proportion de chaque protéine présente dans les deux complexes.



**Figure 85 : Profil de sédimentation du complexe TCTP/CMcl-1 (ratio 1 : 1) mesuré en interférences.** La courbe verte représente CMcl-1 tandis que la courbe rouge correspond à TCTP.

Dans la figure 85 se trouve le profil de sédimentation du mélange TCTP+CMcl-1 équimolaire, analysé en interférences, où TCTP et CMcl-1 ont pu être détectées séparément, TCTP en rouge et CMcl-1 en vert. Contrairement au profil de sédimentation mesuré en absorbance, en rouge dans la figure 84, nous observons deux complexes. Dans le complexe 1, la courbe rouge de TCTP est au moins deux fois plus intense que la courbe verte de CMcl-1, par conséquent TCTP se trouve en excès par rapport à CMcl-1. Dans le complexe 2, les deux courbes sont à peu près de la même intensité, traduisant la présence d'une espèce stœchiométrique. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le complexe 1 est formé de l'espèce :  $2xTCTP/CMcl-1$ , tandis que le complexe 2 est constitué de la forme :  $2xTCTP/2xCMcl-1$ .

### V.2.2.3. Caractérisation par SEC-MALS

Nous avons également analysé TCTP, CMcl-1 et le mélange des deux protéines en SEC-MALS.

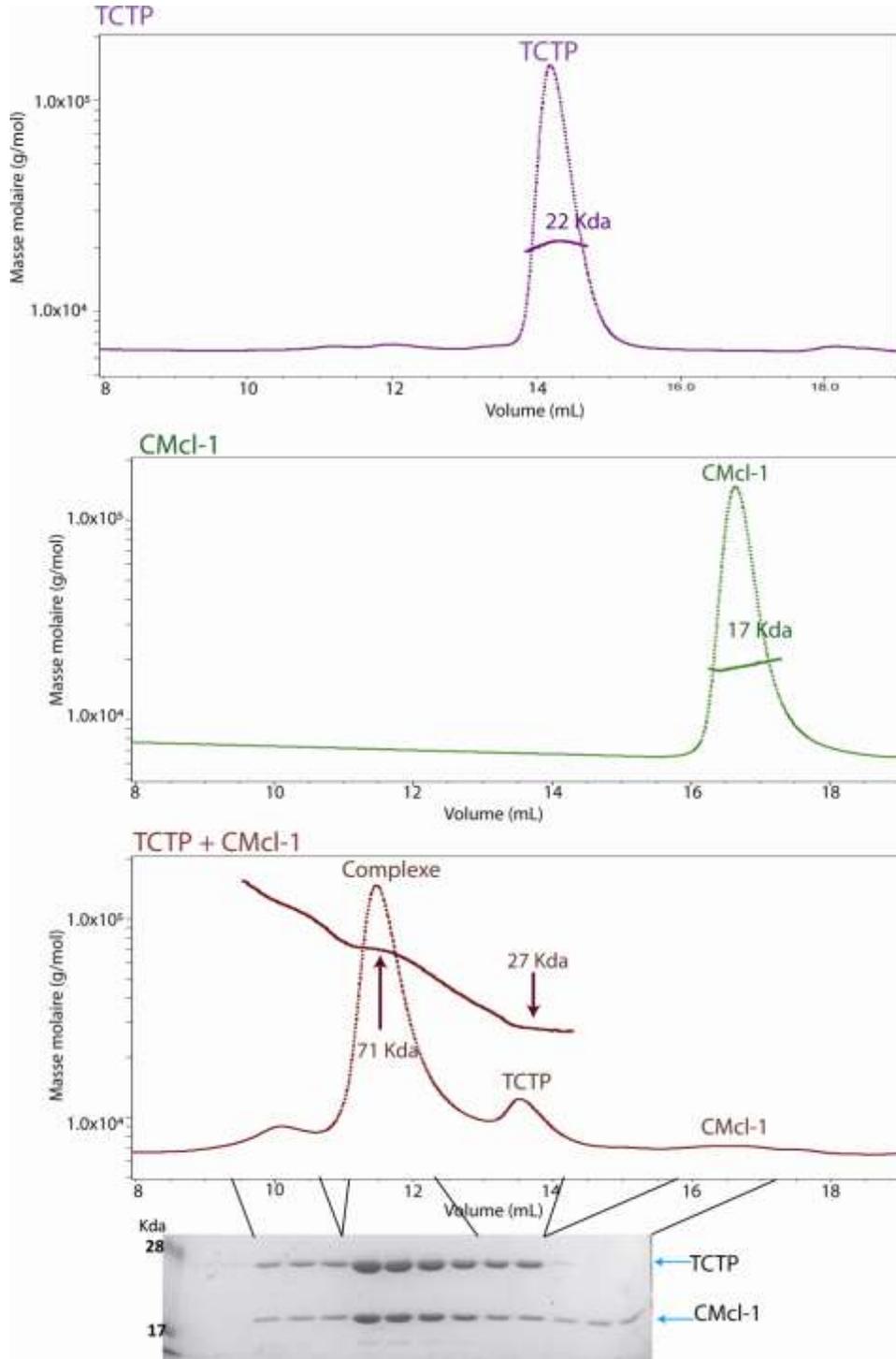


Figure 86 : Alignement de trois profils de SEC-Mals de TCTP, de CMcl-1 et du mélange des deux protéines, et du gel dénaturant associé au mélange. Le graphe en vert correspond aux mesures de réfractométrie et de masse molaire de CMcl-1, et celui en rouge bordeaux au mélange.

La figure 86 présente les profils dRI/dT superposés aux courbes de masse molaire, de TCTP en violet de CMcl-1 en vert et du mélange en rouge bordeaux. Ces échantillons ont été concentrés à 8mg/mL de façon à obtenir un fort signal et à gagner en précision dans la mesure de la masse molaire. Le profil dRI/dt de TCTP montre que cette protéine migre sous forme de monomère avec une masse mesurée de 22 Kda proche de la masse théorique à 20Kda. De même, la protéine CMcl-1 est éluée uniquement à l'état de monomère à 17 Kda. L'échantillon du mélange a en partie précipité à cause d'une trop forte concentration en protéines, c'est donc le surnageant qui a été analysé. Le pic majoritaire représente le complexe TCTP/CMcl-1 avec une masse molaire d'environ 71 Kda, ce qui est proche de la masse molaire de l'hétérotétramère 2xTCTP/2xCMcl-1 à 75Kda. Le gel dénaturant du profil du mélange confirme bien la présence des deux espèces au niveau du pic principal. De plus, le palier situé au début du pic majoritaire révèle la présence d'un complexe homogène.

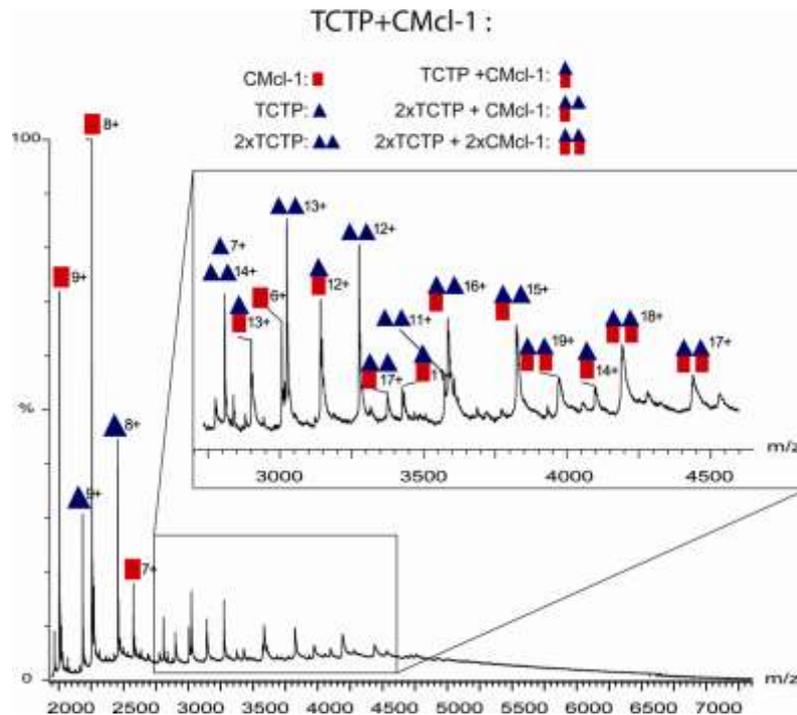
Ces mesures ont permis d'obtenir des données sur le rayon hydrodynamique (Rh) de ces protéines (voir le tableau 15 ci-dessous). Le rayon hydrodynamique du complexe est de 4.2 nm correspondant environ à la somme de ceux de TCTP (2.6 nm) et de CMcl-1 (2.00 nm).

Protéines	Volume de rétention (mL)	Rh (nm)	Dt (10 <sup>-6</sup> cm <sup>2</sup> /sec)
TCTP	13.25	2.6 +/- 0.13	1.02+/-0.05
CMcl-1	16.62	2.00 +/- 0.14	1.4+/-0.1
TCTP+CMcl-1	11.42	4.16 +/- 0.15	0.61+/-0.22

**Tableau 15 : Données obtenues en SEC-MALS sur TCTP, CMcl-1 et le complexe.** Le tableau présente le volume de rétention en mL, le rayon hydrodynamique en nm et le Dt en cm<sup>2</sup>/sec de chaque espèce.

**Analyse en spectrométrie de masse du complexe TCTP/CMcl-1 :**

Comme pour le mélange TCTP+Bcl-xIΔ27-81ΔTM, le mélange TCTP+CMcl-1 a été analysé en spectrométrie de masse en condition native, dans 50mM de bicarbonate d'ammonium, afin de ne pas dissocier le complexe.



**Figure 87 : Spectre en ESI-TOF en condition native du mélange TCTP+CMcl-1.** Les carrés rouges correspondent à CMcl-1 et les triangles bleus à TCTP.

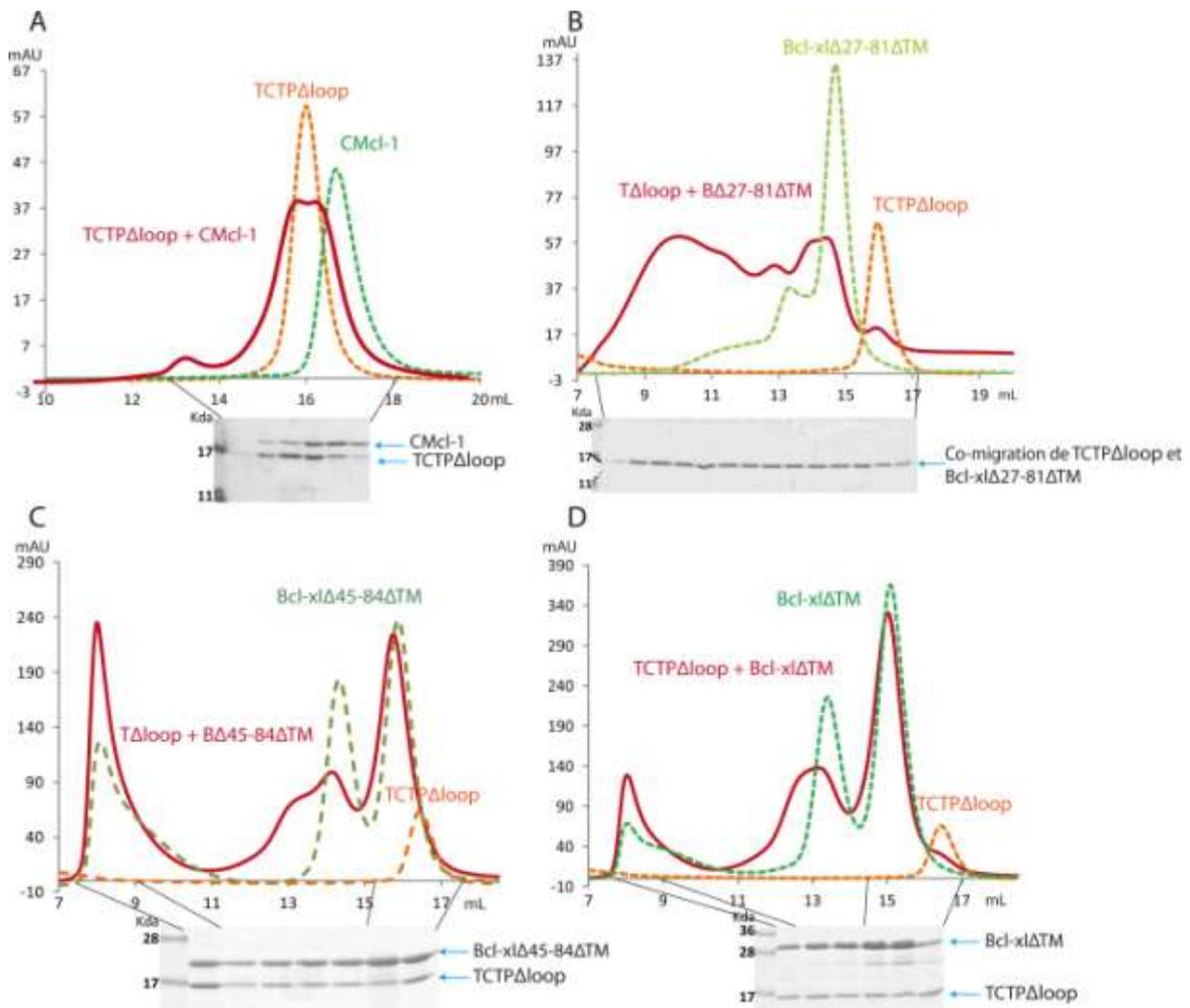
Nous pouvons voir dans la figure 87, le spectre en ESI-TOF, en condition non dénaturante, du mélange TCTP+CMcl-1, incubé préalablement dans les conditions de formation du complexe. Cette expérience met en évidence la présence du monomère de CMcl-1, du monomère et du dimère de TCTP ainsi que de trois formes de complexes : TCTP/CMcl-1, 2xTCTP/CMcl-1 et 2xTCTP/2xCMcl-1. Des expériences avec du DTT montrent que le dimère de TCTP peut être réduit en monomères. Ces résultats viennent confirmer l'existence d'un complexe 2:2, comme ce qui a été mis en avant en SEC-MALS. La spectrométrie de masse met également en évidence l'existence d'autres formes de complexes, comme dans les expériences en UAC, où deux complexes ont été observés. L'ensemble de ces analyses biophysiques sont cohérentes et montrent la présence de plusieurs formes de complexes en équilibre.

### V.3. Détermination des zones d'interactions

Les complexes TCTP/Bcl-xls (Bcl-xls : les différentes constructions de Bcl-xl) et TCTP/CMcl-1 se forment à pH alcalin, à faible concentration en NaCl et à 30°C. Or, la faible salinité et la température élevée peuvent favoriser des interactions non-spécifiques. Dans cet objectif et dans le but de déterminer la zone d'interaction des complexes, nous avons mis au point des mutants de TCTP et de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. Toutes les incubations ont été réalisées dans les mêmes conditions : dans un tampon à pH=9, à 50mM NaCl et à 30°C sur la nuit.

### V.3.1. Etude de TCTP $\Delta$ loop

Le mutant TCTP $\Delta$ loop a été élaboré en vue de tester le rôle de la boucle dans la formation des complexes. La figure 88 révèle les profils d'éluion de gel filtration des mélanges TCTP $\Delta$ loop+CMcl-1 (figure 88.A), TCTP $\Delta$ loop+Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM (figure 88.B), TCTP $\Delta$ loop+Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM (figure 88.C) et TCTP $\Delta$ loop+Bcl-xl $\Delta$ TM (figure 88.D), où Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM et Bcl-xl $\Delta$ TM se trouvent sous forme monomérique et dimérique.



**Figure 88 :** Profils d'éluion de gel filtration et gels dénaturants des mélanges de TCTP $\Delta$ loop en présence de CMcl-1 (88.A), de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM (88.B), de Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM (88.C) et de Bcl-xl $\Delta$ TM (88.D). Dans ces figures, les courbes en pointillé représentent les protéines seules : en orange TCTP $\Delta$ loop, et en vert les différentes formes de Bcl-xl et CMcl-1. Les courbes en trait plein rouge correspondent aux mélanges.

Dans la figure 88, les courbes rouges en trait plein correspondent aux mélanges tandis que les courbes en pointillé aux protéines seules : en orange TCTP $\Delta$ loop et en vert les constructions de Bcl-xl et CMcl-1. Dans la figure 88.A, la courbe du mélange TCTP $\Delta$ loop+CMcl-1 épouse la forme des

courbes des protéines seules et aucun pic n'est observé dans les hauts poids moléculaires, ce qui montre qu'aucun complexe n'est formé. La boucle de TCTP est donc indispensable à l'interaction avec CMcl-1.

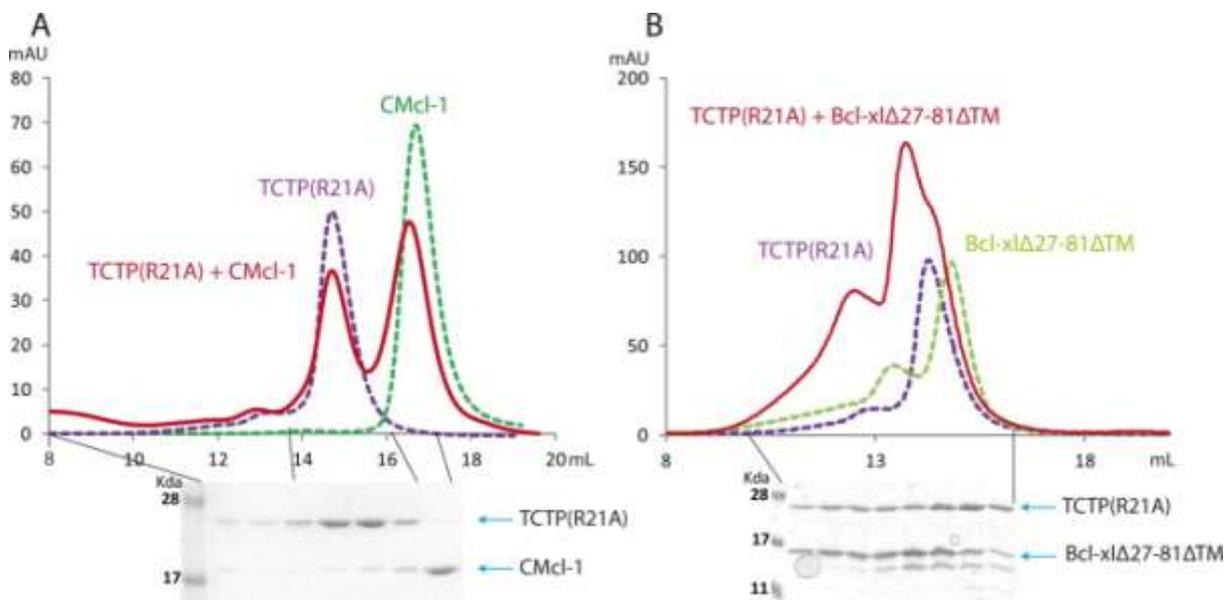
D'après les courbes rouges des figures 88.B, 88.C et 88.D, des nouvelles espèces apparaissent à plus haut poids moléculaire, et les pics associés à la forme dimérique des constructions de Bcl-xl diminuent. Par conséquent, TCTP $\Delta$ loop interagit avec Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, et comme pour TCTP (voir figure 52), TCTP $\Delta$ loop se lie préférentiellement avec leur forme dimérique.

Pour Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM (figure 88.B), l'interaction avec TCTP $\Delta$ loop engendre des multi-complexes, ainsi la boucle de TCTP aiderait à stabiliser une seule forme de complexe.

Ces expériences sont également réalisées à 4°C, et comme attendu, les complexes ne sont plus formés.

### V.3.2. Etude du mutant R21A de TCTP, TCTP(R21A)

Il a été mis en évidence que l'arginine en position 21 de TCTP est impliquée dans l'interaction avec CMcl-1 et que sa mutation en alanine casse l'interaction *in vivo* (Zhang et al., 2002). Nous avons élaboré ce mutant pour vérifier s'il empêche bien TCTP d'interagir avec CMcl-1 *in vitro*. Ce mutant a également été testé sur Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM.

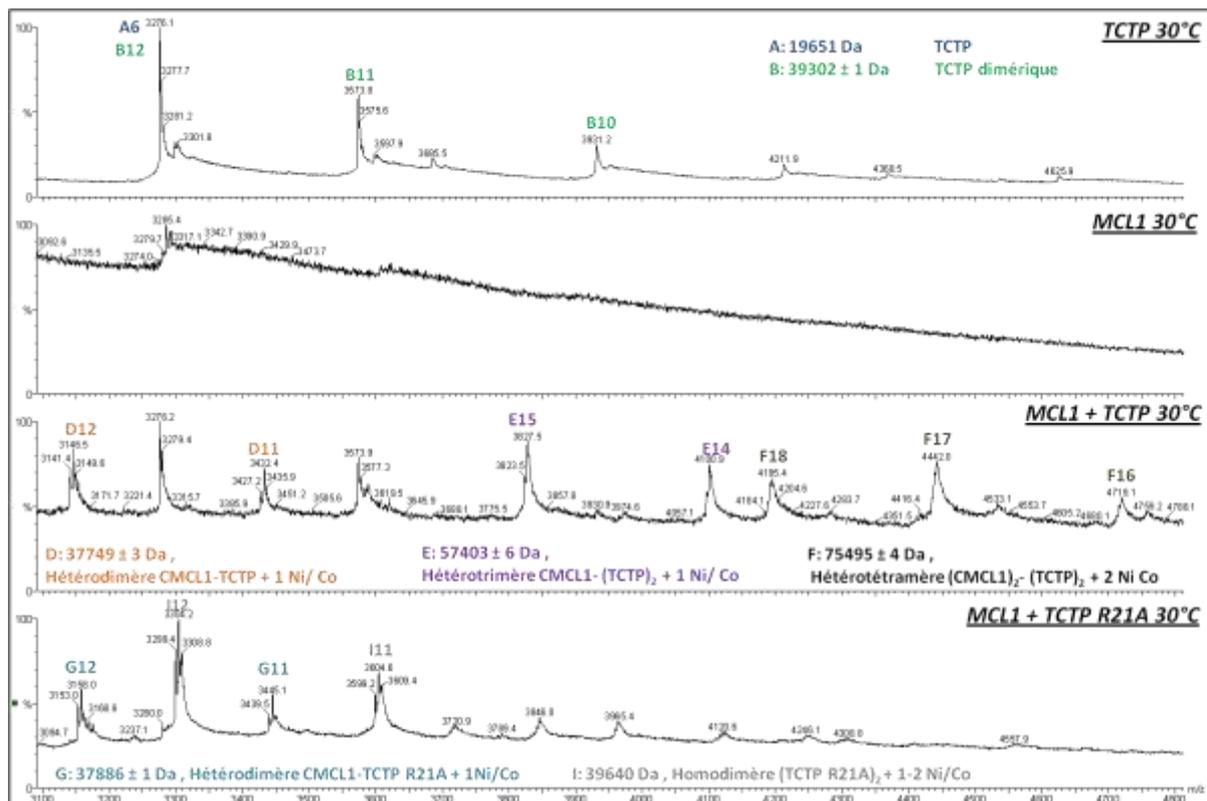


**Figure 89 : Profils d'élution de gel filtration et gels dénaturants des mélanges TCTP(R21A)+CMcl-1 (89.A) et TCTP(R21A)+Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM (89.B).** Dans ces figures, les courbes en pointillé représentent les protéines seules : en violet TCTP(R21A), et en vert les différentes Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et CMcl-1. Les courbes en trait plein rouge correspondent aux mélanges.

La figure 89 présente les profils d'élution de gel filtration : des mélanges TCTP(R21A)+CMCl-1 (figure 89.A) et TCTP(R21A)+Bcl-xlΔ27-81ΔTM (figure 89.B) en rouge, et les protéines seules (les contrôles) en pointillé vert pour Bcl-xlΔ27-81ΔTM et CMCl-1, et en pointillé violet pour TCTP(R21A). Dans la figure 89.A, la courbe rouge du mélange TCTP(R21A)+CMCl-1 épouse la forme des pics des protéines seules en pointillé, et aucun pic n'apparaît au niveau des hauts poids moléculaires, par conséquent il n'y a pas de complexe formé. Ce résultat vient confirmer l'importance de l'arginine en position 21 de TCTP pour le maintien du complexe TCTP/CMCl-1.

En ce qui concerne la figure 89.B, le mélange TCTP(R21A)+Bcl-xlΔ27-81ΔTM montre un profil d'élution bizarre, il est donc difficile de conclure sur l'effet de l'arginine 21 de TCTP sur le complexe TCTP/Bcl-xlΔ27-81ΔTM. Afin de confirmer ces résultats, nous avons réalisé les mêmes expériences en spectrométrie de masse en condition non dénaturante avec les mélanges : TCTP(R21A)+CMCl-1 et TCTP(R21A)+Bcl-xlΔ27-81ΔTM.

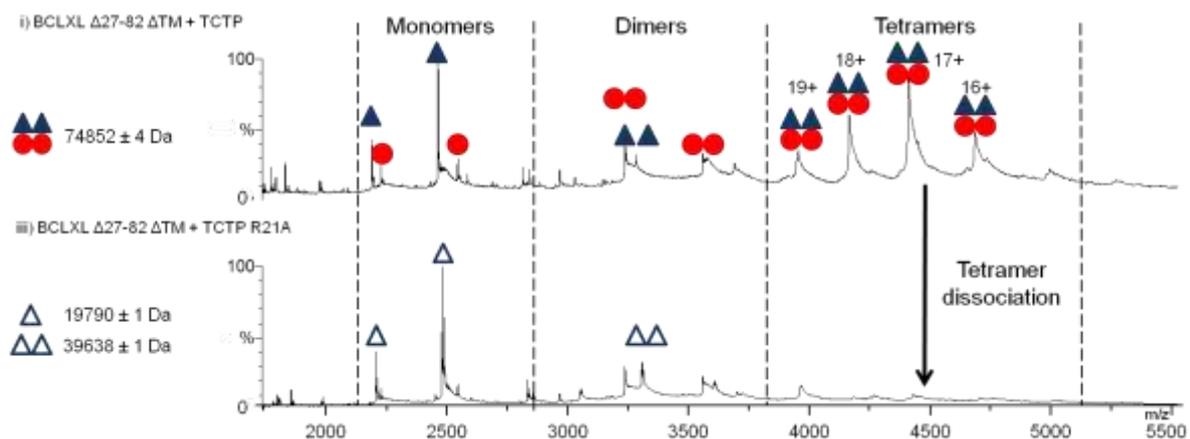
#### Spectrométrie de masse entre TCTP(R21A) et CMCl-1 :



**Figure 90 : Alignement de spectres en conditions natives de TCTP, CMCl-1, CMCl-1+TCTP et CMCl-1+TCTP(R21A).** L'espèce A correspond au monomère de TCTP tandis que l'espèce B au dimère de TCTP. L'espèce D correspond à l'hétérodimère TCTP/CMCl-1, l'espèce E à l'hétérodimère 2xTCTP/CMCl-1 et l'espèce F à l'hétérotétramère 2xTCTP/2xCMCl-1. L'espèce G correspond à l'hétérodimère TCTP(R21A)/CMCl-1 et l'espèce I à l'homodimère 2xTCTPR21A.

La figure 89 montre l'alignement de plusieurs spectres de masse, en condition native, de: TCTP seule, CMcl-1 seule, TCTP+CMcl-1 et TCTP(R21A)+CMcl-1, ces protéines étant incubées dans les conditions habituelles de formation des complexes. Le spectre du mélange TCTP+CMcl-1 montre la présence de l'hétérodimère TCTP/CMcl-1, de l'hétérotrimère 2xTCTP/CMcl-1 et de l'hétérotétramère 2xTCTP/2xCMcl-1. En revanche, dans le spectre du mélange TCTP(R21A)+CMcl-1, nous observons uniquement l'hétérodimère TCTP(R21A)/CMcl-1, par conséquent l'arginine 21 permet l'assemblage de ces protéines en hétérotétramère. Les résultats de spectrométrie de masse sont cohérents avec ce que nous observons en gel filtration : l'arginine R21 de TCTP est essentielle à la formation d'un complexe 2/2.

#### Spectrométrie de masse entre TCTP(R21A) et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM:

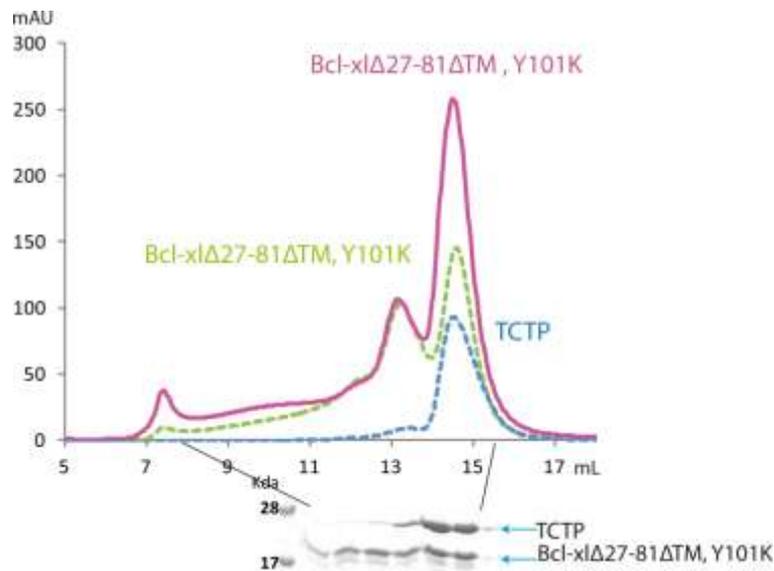


**Figure 91 : Alignement de spectres de masse, en condition native, des mélanges : Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM+TCTP et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM+TCTP(R21A).** Les sphères en orange représentent Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, les triangles bleus pleins TCTP, et les triangles bleus vides TCTP(R21A).

La figure 91 révèle l'alignement des spectres de masse, en condition native, des mélanges : TCTP+Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et TCTP(R21A)+Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. Le spectre du mélange TCTP+Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM montre la présence de l'hétérotétramère 2xTCTP/2xBcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. En revanche, dans le spectre du mélange TCTP(R21A)+Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, l'hétérotétramère n'apparaît plus, par conséquent TCTP muté n'interagit plus avec Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. Malgré l'expérience non concluante en gel filtration sur TCTP(R21A)+Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, la spectrométrie de masse nous a permis de conclure sur l'effet de l'arginine 21 de TCTP sur le complexe TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, elle est essentielle à l'interaction.

### V.3.3. Etude du mutant Y101K de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM

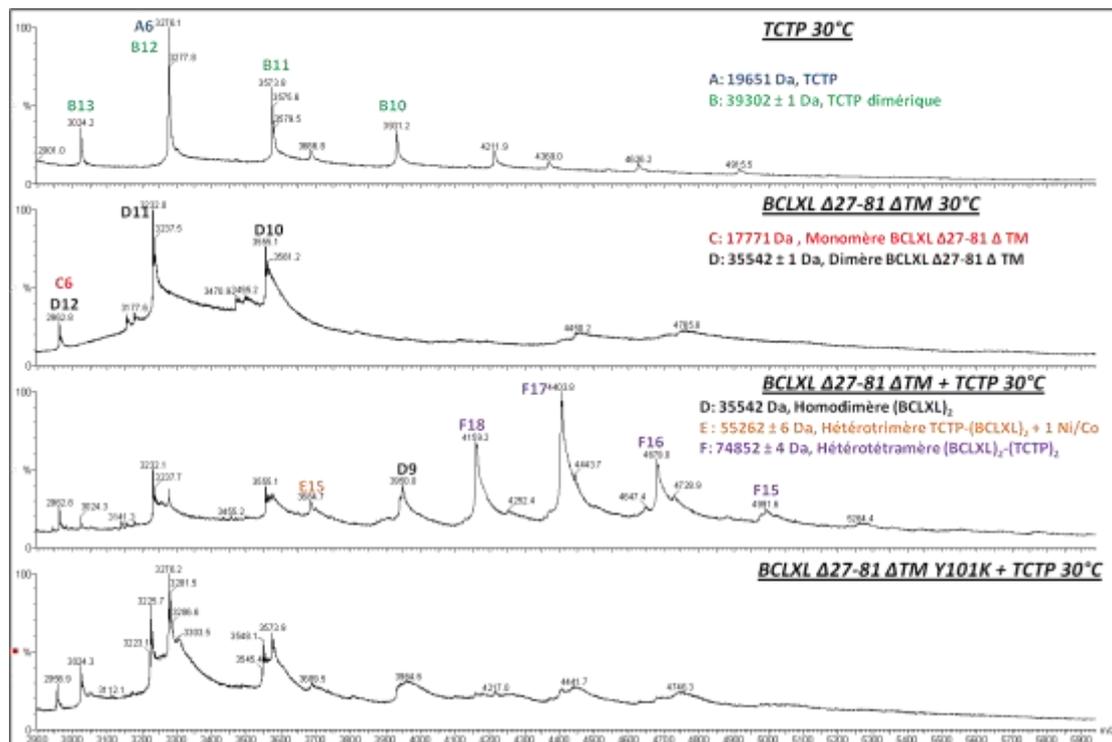
Les principaux résidus du sillon hydrophobe de Bcl-xl impliqués dans l'interaction avec le peptide BH3 de Bax ont été mis en évidence, dont la tyrosine en position 101 (Min et al., 1999). Afin de savoir si TCTP interagit via cette tyrosine, nous avons élaboré le clone Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, Y101K.



**Figure 92 :** Gel dénaturant et profil d'éluion de gel filtration du mélange TCTP+Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM,Y101K. Dans cette figure, les courbes en pointillé représentent les protéines seules : en bleu TCTP, et en vert Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM,Y101K. La courbe en trait plein magenta correspond au mélange.

Dans la figure 92, la courbe magenta est associée au mélange TCTP+Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, Y101K, tandis que les courbes en pointillé correspondent aux protéines seules : vert à Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM,Y101K et bleu à TCTP. La courbe du mélange épouse la forme des deux courbes des protéines seules et aucune espèce n'est détectée vers les hauts poids moléculaires, ce qui montre qu'aucun complexe n'est formé et que le mutant n'interagit pas avec TCTP. Par conséquent, la tyrosine en position 101 de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM est essentielle pour la formation du complexe. Pour confirmer cette expérience, nous avons réalisé des analyses en spectrométrie de masse.

### Spectrométrie de masse de TCTP + Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, Y101 K :

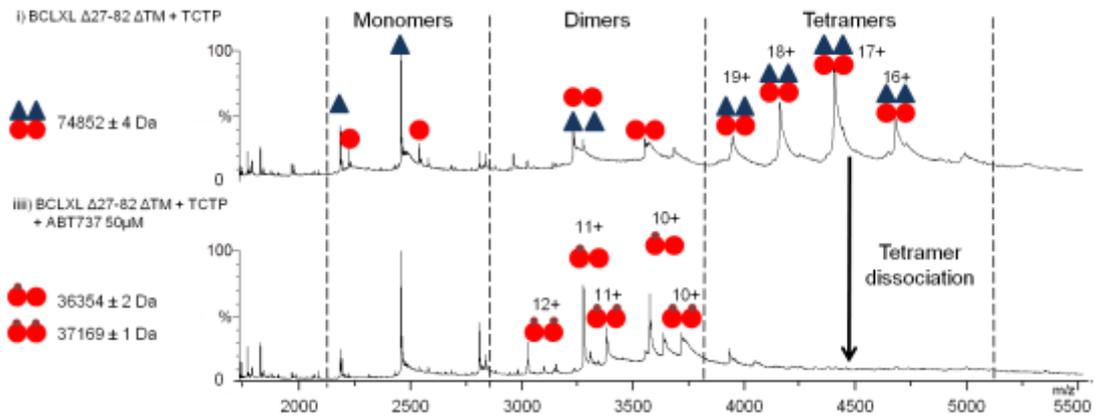


**Figure 93 : Alignement de spectres de masse, en condition native, de TCTP, Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM +TCTP et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM,Y101K+TCTP. L'espèce A correspond au monomère de TCTP tandis que l'espèce B au dimère de TCTP. L'espèce C correspond au monomère de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, et l'espèce D au dimère. L'espèce E correspond à l'hétérodimère TCTP/2xBcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et l'espèce F à l'hétérotétramère 2xTCTP/2xBcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM.**

Dans la figure 93 se trouve l'alignement de plusieurs spectres de masse, en condition native, de : TCTP seule, Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM seule, TCTP+Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et TCTP+Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM,Y101K. Le spectre du mélange TCTP+Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM montre la présence de l'hétérotrimère TCTP/2xBcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et de l'hétérotétramère 2xTCTP/2xBcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. Ces deux complexes n'apparaissent plus dans le spectre du mélange TCTP+Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM,Y101K, par conséquent TCTP n'interagit plus avec le mutant de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. La spectrométrie de masse vient confirmer ce que nous obtenons en gel filtration, la tyrosine Y101 de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM est essentielle à l'interaction avec TCTP.

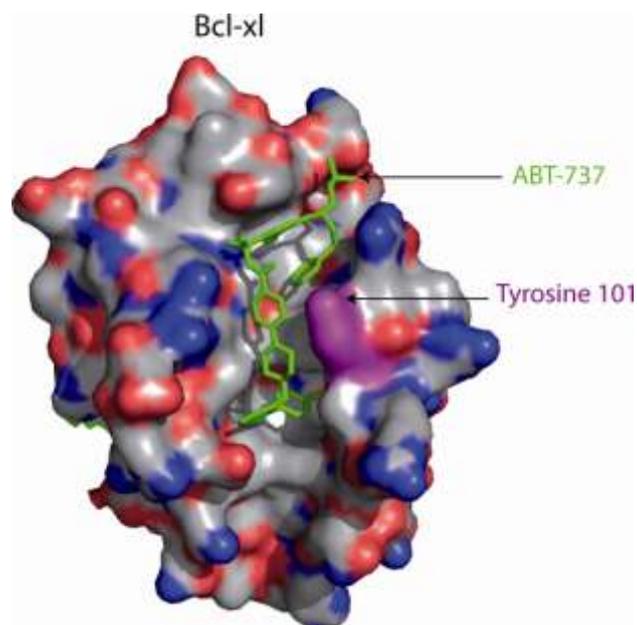
### V.3.4. Etude de compétition avec l'inhibiteur ABT-737

Le composé chimique ABT-737 est un anticancéreux induisant l'apoptose des cellules tumorales en inhibant des protéines anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2. Cette molécule présente une affinité de l'ordre du nanomolaire avec Bcl-2, Bcl-xl et Bcl-w, mais ne se lie pas à Mcl-1 (Vogler M. et al, 2009).



**Figure 94 : Alignement de spectres de masse, en condition native, des mélanges Bcl-xlΔ27-81ΔTM+TCTP et Bcl-xlΔ27-81ΔTM+TCTP+ABT737.** Les sphères en orange représentent Bcl-xlΔ27-81ΔTM, les triangles bleus pleins TCTP, et les petits ronds marron ABT-737.

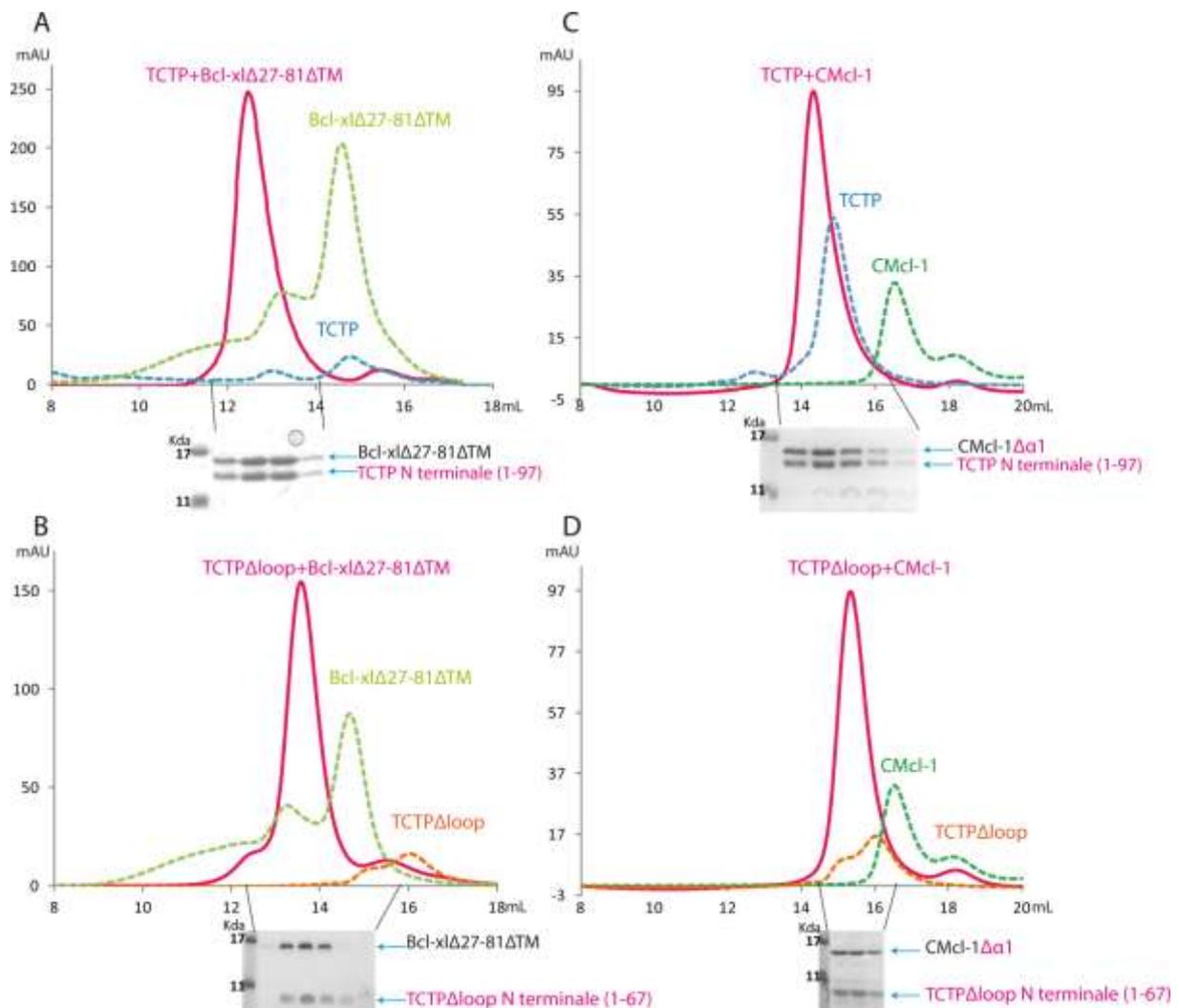
La figure 94 montre l'alignement des spectres de masse, en condition native, des mélanges TCTP+Bcl-xlΔ27-81ΔTM et TCTP+Bcl-xlΔ27-81ΔTM+ABT-737. Le spectre du mélange TCTP+Bcl-xlΔ27-81ΔTM montre la présence de l'hétérotétramère 2xTCTP/2xBcl-xlΔ27-81ΔTM alors que le spectre du mélange TCTP+Bcl-xlΔ27-81ΔTM+ABT-737 indique uniquement la présence des complexes : 2xBcl-xlΔ27-81ΔTM/ABT-737 et 2xBcl-xlΔ27-81ΔTM/2xABT-737. Cette expérience montre que la molécule ABT-737 rentre en compétition avec TCTP pour interagir avec Bcl-xlΔ27-81ΔTM. Or, la molécule ABT-737 interagit avec le sillon hydrophobe de Bcl-xl, comme l'indique la figure 95 ci-dessous, nous pourrions donc émettre l'hypothèse que TCTP se lie également via ce sillon, d'autant plus qu'elle interagit avec la tyrosine 101 de Bcl-xl qui se situe sur le contour du sillon.



**Figure 95 : Structure de Bcl-xl avec le ligand ABT-737 en vert et la tyrosine 101 en magenta.**

### V.3.5. Etude de la partie N terminale de TCTP

Une digestion ménagée à la thrombine nous a permis de mettre en évidence une interaction entre la région N terminale de TCTP et les protéines CMcl-1 et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. Pour ce faire, nous avons rajouté 20 $\mu$ L de thrombine à 1U/ $\mu$ L au moment de l'incubation à 30°C. Ces expériences ont également été réalisées avec TCTP $\Delta$ loop.



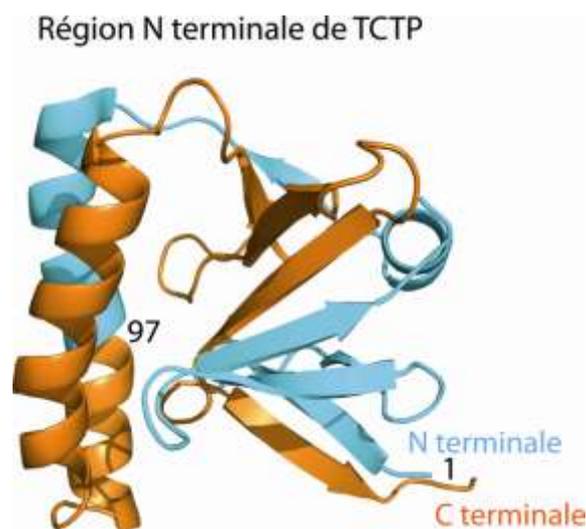
**Figure 96 : Profils d'élutions de colonne d'exclusion de taille des complexes avec la partie N terminale de TCTP et de TCTP $\Delta$ loop.** Les mélanges sont constitués de: (96.A) TCTP+Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, (96.B) TCTP $\Delta$ loop+Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, (96.C) TCTP+CMcl-1 et (96.D) TCTP $\Delta$ loop+CMcl-1. Dans ces figures, les courbes en pointillé représentent les protéines seules : en orange TCTP $\Delta$ loop, en bleu TCTP, en vert Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et CMcl-1. Les courbes en trait plein rose correspondent aux mélanges.

Dans la figure 96, les courbes en trait plein roses correspondent aux mélanges tandis que les courbes en pointillé aux protéines seules : en orange TCTP $\Delta$ loop, en bleu TCTP, et en vert Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et CMcl-1. Les figures 96.A et 96.B représentent les mélanges de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM avec respectivement TCTP et TCTP $\Delta$ loop. Dans ces figures, les courbes en rose font ressortir une nouvelle

espèce, migrant dans les plus hauts poids moléculaires, formée de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et de la partie N terminale de TCTP ou de TCTP $\Delta$ loop, d'après les gels dénaturants. Contrairement aux formes entières, les complexes sont formés de manière majoritaire, ce qui souligne une forte interaction. Les bandes des gels dénaturants ont été analysées en spectrométrie de masse en MALDI et les analyses montrent que les parties TCTP(1-97) et TCTP $\Delta$ loop(1-67) interagissent avec Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. Nous pouvons remarquer que le complexe formé par TCTP(1-97) migre à un volume de rétention plus élevée que celui avec TCTP $\Delta$ loop(1-67), qui est dépourvue de boucle.

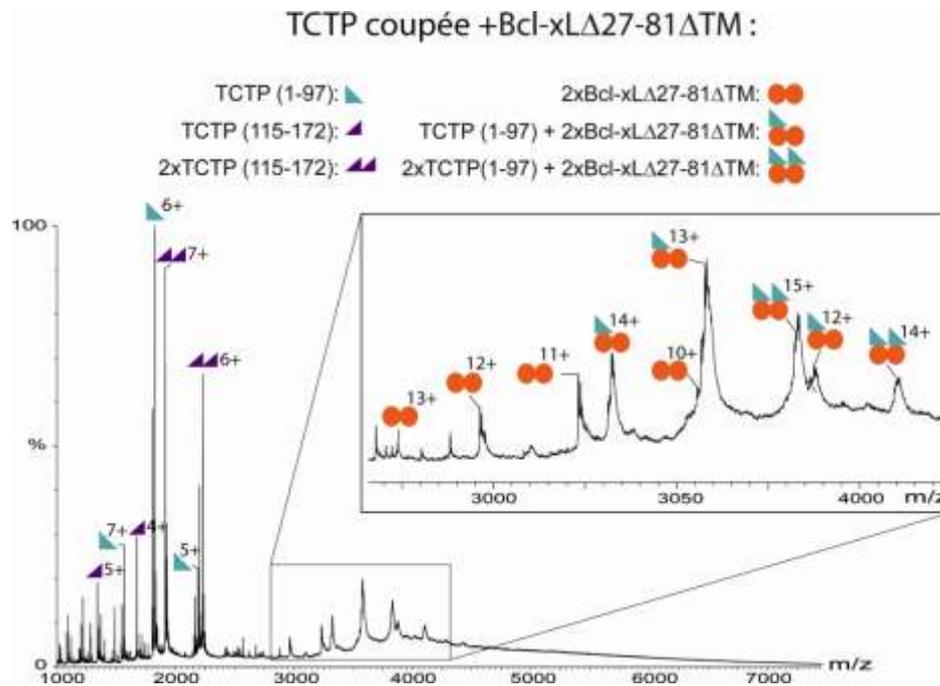
De la même manière, les figures 96.C et 96.D mettent en avant les complexes entre CMcl-1 et la partie N terminale de TCTP et de TCTP $\Delta$ loop. Contrairement à Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, qui reste insensible à la thrombine, CMcl-1 perd son hélice  $\alpha$ 1. Les complexes mis en évidence sont donc CMcl-1 $\Delta$  $\alpha$ 1/TCTP(1-97) et CMcl-1 $\Delta$  $\alpha$ 1/TCTP $\Delta$ loop(1-67). Contrairement à la protéine CMcl-1 entière, la boucle de TCTP ne semble pas intervenir dans le complexe, puisque CMcl-1 $\Delta$  $\alpha$ 1 interagit avec TCTP $\Delta$ loop(1-67).

Les complexes formés avec les parties N terminales de TCTP et de TCTP $\Delta$ loop avec Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et CMcl-1 $\Delta$  $\alpha$ 1 sont majoritaires et traduisent une forte affinité. D'après la structure globulaire de TCTP, la coupure engendrerait une déstructuration de la protéine puisque le cœur hydrophobe est clivé en son centre. La figure 97 ci-dessous met en avant le clivage de la protéine en deux : la partie N terminale (1-97) est colorée en bleue, tandis que la partie C terminale (98-172) est en orange. Nous supposons que la partie N terminale de TCTP, qui met en avant un épitope caché, se structure en interagissant avec ses partenaires. Ces complexes nécessitent davantage de recherches.



**Figure 97 : Structure cristallographique de TCTP (1YZ1) colorée suivant les deux parties coupées par la thrombine.** En bleu, nous avons la partie N terminale constituée des 97 premiers acides aminés, et en orange, nous observons la partie C terminale des résidus 98 à 172.

Pour confirmer ces résultats, nous avons analysé le complexe TCTP(1-97)/Bcl-xLΔ27-81ΔTM en spectrométrie de masse (ESI-TOF), en condition native.

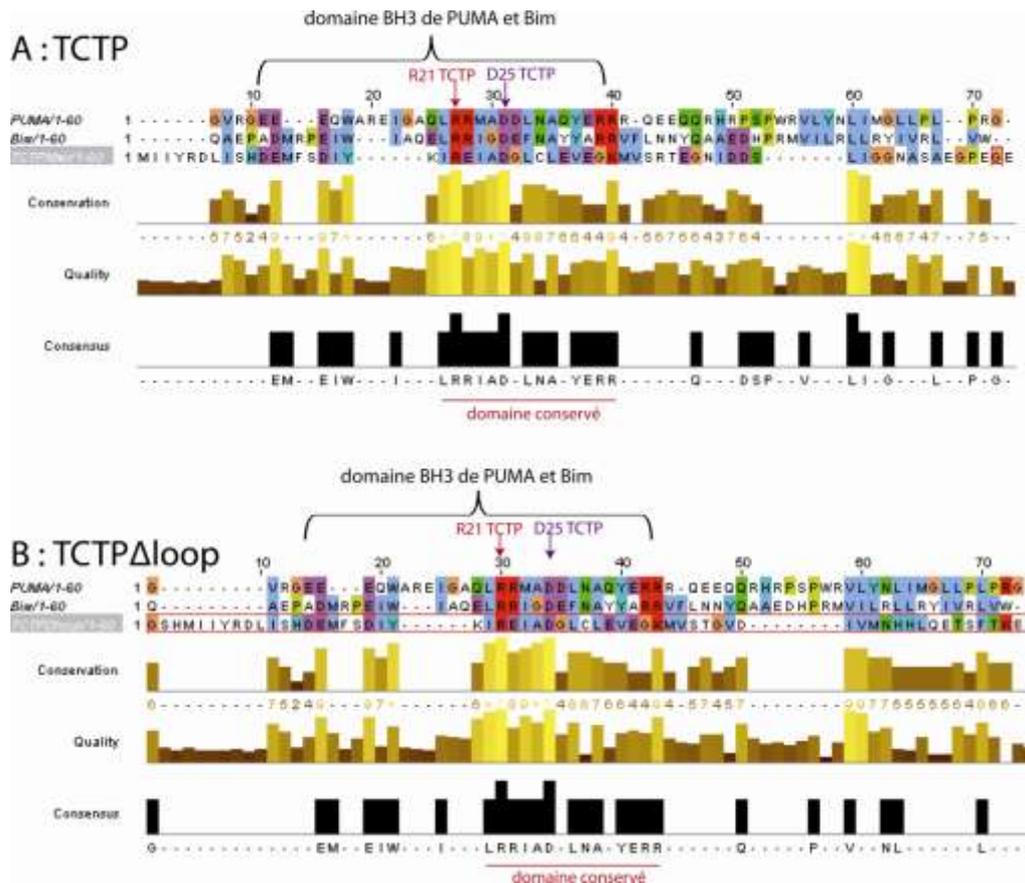


**Figure 98 :** Spectre de masse en ESI-TOF, en condition non dénaturante, du mélange TCTP+Bcl-xLΔ27-81ΔTM incubé avec de la thrombine. Les sphères orange correspondent à Bcl-xLΔ27-81ΔTM, les triangles bleu clair à TCTP(1-97) et les triangles bleu foncé à TCTP(115-172).

La figure 98 représente le spectre ESI-TOF, en condition native, du mélange TCTP+Bcl-xLΔ27-81ΔTM incubé avec de la thrombine. Plusieurs fragments de TCTP sont observés : la partie N terminale (1-97), la région C terminale (115-172), qui provient de la dégradation de la partie (98-172) de TCTP, et son dimère 2x(115-172), formé via la cystéine en C terminale. Nous retrouvons les complexes avec les dimères de Bcl-xLΔ27-81ΔTM : 2xTCTP(1-97)/2xBcl-xLΔ27-81ΔTM et TCTP(1-97)/2xBcl-xLΔ27-81ΔTM. Ces complexes ne font intervenir que la partie N terminale de TCTP, il s'agit donc de complexes sélectifs.

### V.3.6. Alignement de séquences entre TCTP, Bim et Puma

Dans la figure 99, des alignements de séquences des 60 premiers acides aminés de TCTP (et de TCTPΔloop) avec les domaines BH3 de Puma et de Bim mettent en évidence une région commune, présentant un consensus : LRRAD-LNA-YERR, comme l'indique la figure ci-dessous.



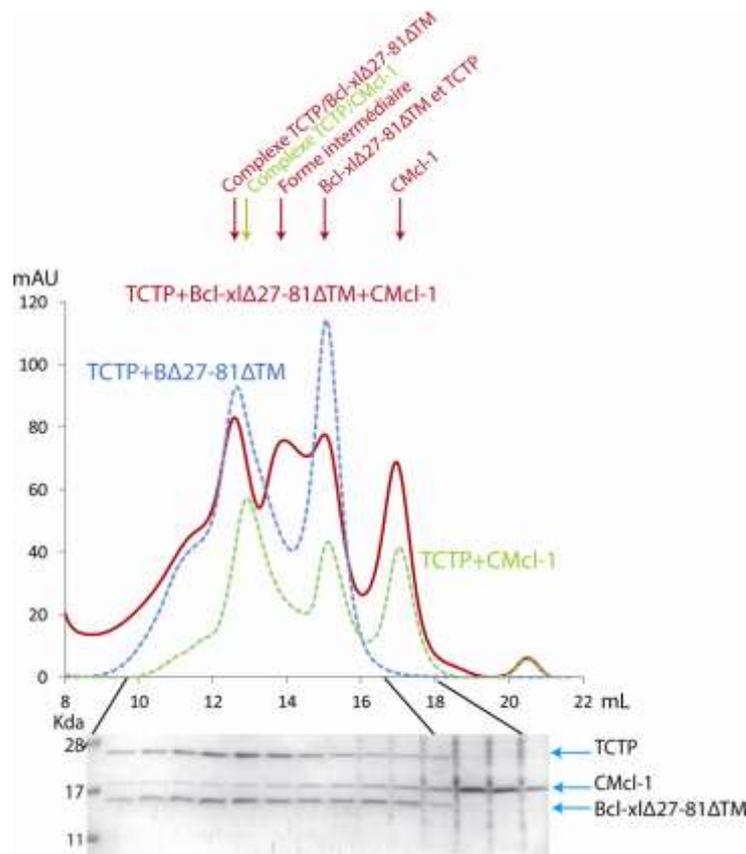
**Figure 99 : Alignements de séquence de : TCTP (1-60) avec les domaines BH3 de Puma et Bim (99.A) et de TCTPΔloop avec les mêmes domaines (99.B). La conservation, la qualité et le consensus entre ces séquences sont indiqués.**

Cette région comprend deux acides aminés conservés parmi ces trois protéines : R<sub>21</sub> et D<sub>25</sub> de TCTP. Les mêmes résultats sont observés avec TCTPΔloop. Les expériences précédentes et les résultats de l'article de Yang et al., 2005, mettent en évidence l'implication de la partie N terminale et de l'arginine 21 de TCTP dans ces complexes. Cet alignement de séquences d'acides aminés met probablement à jour un domaine BH3 « non canonique » dans la région N terminale de TCTP, comprenant l'arginine 21, et constitué des résidus : I<sub>20</sub>R<sub>21</sub>EIAD<sub>25</sub>GLCLEVEGK. D'après l'article de Levi J. (Beverly, 2012) au sujet des protéines possédant un domaine BH3 non canonique, le consensus LXXβD (où β=A, G, S ou C) est presque totalement respecté, malgré qu'à la place de la leucine il y ait l'isoleucine 20, nous retrouvons bien les résidus I<sub>20</sub> et D<sub>25</sub> espacés de 4 acides aminés et l'alanine en position 24.

De plus, la région comprise entre les acides aminés en position 20 et 27 est hautement conservée parmi la souris, le lapin et l'homme (Yang et al., 2005). Par conséquent, ce domaine de TCTP, correspondant aux brins β3 et β4, pourrait être la zone d'interaction avec CMcl-1 et Bcl-xlΔ27-81ΔTM.

### V.3.7. Etude de compétition entre TCTP+CMcl-1+ Bcl-xlΔ27-81ΔTM

Après avoir isolé les deux complexes TCTP/Bcl-xlΔ27-81ΔTM et TCTP/CMcl-1 sur gel filtration, nous avons voulu savoir si CMcl-1 et Bcl-xlΔ27-81ΔTM interagissent de manière compétitive avec TCTP ou pas. Pour ce faire, les trois protéines ont été mélangées dans les conditions de formation des complexes. Ensuite, l'échantillon a été injecté sur une colonne d'exclusion de taille de type S200 10/300.



**Figure 100 : Superposition de profils de gel filtration des mélanges : TCTP+Bcl-xlΔ27-81ΔTM+CMcl-1, TCTP+Bcl-xlΔ27-81ΔTM et TCTP+CMcl-1, et gel dénaturant des fractions du profil d'élution du mélange des trois protéines. La courbe rouge en trait plein représente le mélange des trois protéines, la courbe bleue en pointillé le mélange TCTP+Bcl-xlΔ27-81ΔTM et la courbe verte en pointillé le mélange TCTP+ CMcl-1.**

La figure 100 révèle les profils d'élution en colonne d'exclusion des mélanges : TCTP+Bcl-xlΔ27-81ΔTM+CMcl-1 en rouge, TCTP+Bcl-xlΔ27-81ΔTM en bleu, et TCTP+CMcl-1 en vert, ainsi que le gel dénaturant des fractions du profil d'élution du mélange des trois protéines. Le profil d'élution du mélange des trois protéines présente plusieurs pics. Afin de les identifier, nous y avons superposé les profils d'élution des mélanges des deux protéines : TCTP+Bcl-xlΔ27-81ΔTM et TCTP+CMcl-1, et nous pouvons constater que le pic à plus haut poids moléculaire de la courbe rouge est très proche de

celui de la courbe bleue, et nous pouvons identifier les pics des protéines seules TCTP, Bcl-xL $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et CMcl-1 de la courbe rouge. De plus, le gel dénaturant indique que la bande correspondant à CMcl-1 est très peu déplacée vers les hauts poids moléculaires. Ces données prouvent que le complexe formé à haut poids moléculaire dans le mélange des trois protéines est TCTP/Bcl-xL $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. Cependant, le pic intermédiaire entre le complexe TCTP/Bcl-xL $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et Bcl-xL $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM demeure indéterminé mais ne correspond pas à un complexe à 3.

## V.4. Différences d'interactions entre les deux partenaires

L'ensemble de ces expériences nous a permis de déceler les similitudes et les différences dans l'interaction de TCTP avec ses deux partenaires anti-apoptotiques Mcl-1 et Bcl-xl.

D'un côté, les complexes TCTP/CMcl-1 et TCTP/Bcl-xL $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM présentent des caractéristiques biochimiques communes : ils se dissocient en-dessous d'un pH alcalin et à forte salinité, et nécessitent d'une incubation à 30°C pour être formés. De plus, la mutation de l'arginine en position 21 de TCTP en alanine casse l'interaction avec ses deux partenaires, par conséquent CMcl-1 et Bcl-xL $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM interagissent sur une zone commune dans la région N terminale de TCTP. De même pour les expériences de digestion ménagée à la thrombine, la partie N terminale de TCTP se lie à Bcl-xL $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et à CMcl-1 $\Delta$ 1.

De plus, ces mélanges ont en commun de former un complexe de ratio 2 : 2, qui semble être la forme maximale. Les mélanges TCTP+CMcl-1 et TCTP+ Bcl-xL $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM présentent des complexes de même stœchiométrie : 2/2, 2/1 et 1/1, contrairement au mélange TCTP+Bcl-xL $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM qui présente les complexes : 2/2 et 1/2. Bcl-xL $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM étant purifiée uniquement sous forme de dimères, le complexe de ratio 2/1 ne peut pas être identifié. Ces données pourraient mettre en avant un mode d'assemblage en étapes successives pour aboutir au complexe 2/2, voir figure 101.

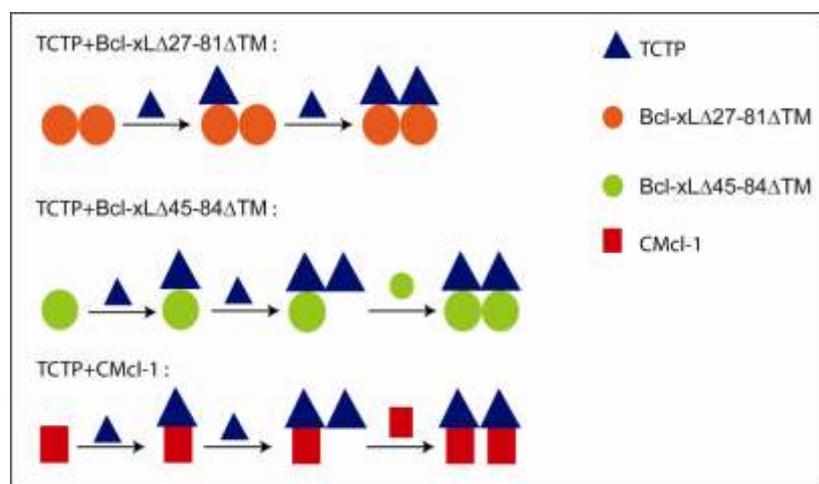


Figure 101 : Modes d'assemblages des différents complexes.

D'un autre côté, certaines différences apparaissent. En incubant les protéines ensemble, nous observons que Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM présente une plus forte affinité avec TCTP que CMcl-1. De plus, d'après des études en colonne d'exclusion de taille, la boucle de TCTP est essentielle pour la formation du complexe TCTP/CMcl-1 contrairement au complexe TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. Sans compter que les spectres RMN montrent que TCTP ne se comporte pas de la même manière avec ses deux partenaires.

La différence importante est que CMcl-1 n'a jamais été observée en tant que dimère contrairement à Bcl-xl, cela signifie peut-être que leur mode d'action soit différent.

Les travaux réalisés sur Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM ainsi que sur CMcl-1 font l'objet d'une publication en cours de préparation (voir annexe 14).

## VI. Conclusion générale et Perspectives

---

La thématique de recherche de l'équipe d'Adam Telerman du LBPA porte sur la compréhension des mécanismes moléculaires et génétiques de la réversion tumorale. Il s'agit d'un processus au cours duquel la cellule cancéreuse perd son phénotype malin et devient donc révertante. TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein) a été identifiée comme une protéine clef de la réversion tumorale car sa délétion dans les cellules cancéreuses induit, à elle seule, leur transformation en cellules révertantes. TCTP est également une protéine multifonctionnelle, impliquée dans de nombreux mécanismes de la cellule (voir partie I.3.1 figure 13)), mais aucune information n'est à ce jour disponible quant-à son mode d'action en termes moléculaires avec ses partenaires. Lors de ce travail de thèse, nous avons choisi d'étudier son rôle dans la régulation de l'apoptose. Des données bibliographiques montrent que TCTP interagit avec les protéines de la famille des Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xl, en renforçant leur action anti-apoptotique (Liu et al., 2005; Yang et al., 2005). Nous avons voulu caractériser ces interactions afin de mieux comprendre son mode de fonctionnement.

Notre objectif a consisté dans un premier temps à isoler les complexes TCTP/Bcl-xl (avec les différentes constructions de Bcl-xl) et TCTP/CMcl-1 puis dans un second temps à mener des études biochimiques, biophysiques et structurales afin de caractériser ces complexes. Ce travail a débuté par des étapes de clonage et a continué par des étapes de purification afin d'obtenir une quantité de protéines suffisante et sans impuretés. Nous avons suivi deux stratégies couramment utilisées au laboratoire pour isoler les complexes : la co-expression et la co-purification.

Nous avons, tout d'abord, effectué des minitests de co-expression en vue d'identifier les domaines d'interaction de ces complexes. De nombreuses constructions ont été testées et deux co-expressions prometteuses ont été poussées à grande échelle : GST-CMcl-1/TCTP et His-TCTP/Bcl-xl. Cependant, le complexe CMcl-1/TCTP s'est avéré difficile à purifier et le complexe His-TCTP/Bcl-xl se fait dégrader partiellement. De plus, l'étiquette His semble influencer sur la formation du complexe His-TCTP/Bcl-xl qui possède une masse apparente de 500Kda environ. Malgré la taille importante de ce complexe, il pourrait réellement s'agir d'une espèce existante dans les cellules puisque Bcl-xl et TCTP s'oligomérisent (Chenal et al., 2012; Sirois et al., 2011).

Au cours de la co-purification, l'obtention des protéines CMcl-1 et TCTP en quantité suffisante, sans impuretés ni dégradations, a nécessité la mise au point de l'enzyme de clivage, des

conditions de culture et de purification. L'étape de coupure de l'étiquette His fusionnée à Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM a dû être également optimisée.

Des expériences en gels natifs ont permis de déceler une interaction entre TCTP et ses partenaires CMcl-1, Bcl-xl et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, et des expériences en GST pull down ont fait ressortir une affinité entre TCTP et les deux formes Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et Bcl-xl $\Delta$ TM. Ces données montrent que ces complexes existent bien *in vitro*. L'étape suivante a donc consisté à les isoler en quantité suffisante sur colonne d'exclusion de taille pour ensuite les caractériser.

Au cours de l'étude ces complexes, la difficulté majeure a résidé dans la mise au point des conditions de formation des complexes. Différents paramètres ont été testés comme la température d'incubation, la concentration en sel, le pH et la concentration en protéines. A la suite de nombreuses expériences et en s'inspirant des résultats de l'article de Liu (Liu et al., 2010), les conditions de formation des complexes ont été mises en évidence : incubation sur la nuit à 30°C, faible salinité à 50mM NaCl, pH=9 alcalin et concentration en protéines de l'ordre de 100 $\mu$ M. Un pH inférieur à 8, une forte salinité ou une incubation à 4°C défavorisent ces complexes. Ces expériences soulignent que ces interactions sont régies par des forces électrostatiques et que l'énergie apportée par le chauffage induirait un changement de conformation des protéines favorable à la formation des complexes.

Une fois les complexes isolés, des études structurales ont été entreprises. Le complexe le plus intensément étudié a été TCTP/CMcl-1, isolé en co-purification. Malgré la formation de germes cristallins, aucune piste sérieuse n'a été décelée. La taille trop importante des complexes n'a pas permis d'analyser les spectres en RMN, les signaux des complexes n'étant pas détectables. Par ailleurs, des études en chromatographie d'exclusion stérique SECS-Mals ont mis en évidence des fractions homogènes du complexe TCTP/CMcl-1 qui seront analysées en SAXS pour éventuellement obtenir l'enveloppe du complexe et déterminer ainsi l'emplacement des protéines. Les études réalisées en cristallographie et en RMN n'ayant pas abouti, le SAXS pourrait représenter une nouvelle alternative pour obtenir des données structurales.

D'après les structures cristallographiques, deux types de dimères de Bcl-xl sont observés : soit le dimère par permutation des hélices  $\alpha$ 1, dans le cas de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, soit le dimère par permutation des hélices  $\alpha$ 6,  $\alpha$ 7 et  $\alpha$ 8, pour Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM et Bcl-xl $\Delta$ TM (voir figure 10). Les expériences montrent que TCTP se lie aux deux types de dimères, et que cette protéine interagit préférentiellement avec les dimères par rapport aux monomères. Il est à noter que ces interactions ont probablement lieu dans la membrane mitochondriale et que l'environnement lipidique doit

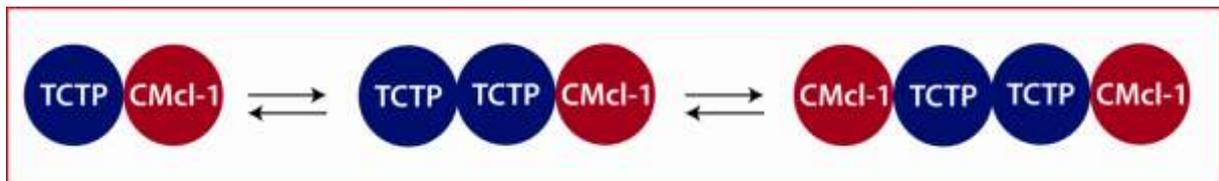
influer sur les changements de conformation de ces protéines. Des études récentes avec Bax et des détergents non-ioniques ont mis en évidence, par cristallographie, un dimère de Bax avec des permutations d'hélices  $\alpha$  ainsi que le complexe entre Bax et Bim (Czabotar et al., 2013). Le même type de permutation que Bcl-xl, avec les hélices  $\alpha_6$ ,  $\alpha_7$  et  $\alpha_8$  est retrouvé avec Bax, ce qui vient conforter l'idée d'un rôle biologique de ce dimère dans les membranes. En effet, ces détergents induisent des changements de conformation des protéines, mimant en quelque sorte l'action des membranes mitochondriales. Nous envisageons de tester les complexes TCTP/CMcl-1 et TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM avec ces détergents en vue de les stabiliser pour ensuite les cristalliser. De plus, des études en mobilité ionique en spectrométrie de masse avec Bcl-xl, nous permettraient d'identifier sous quelles formes les protéines se trouvent dans le complexe. Nous pourrions savoir ainsi quel type de permutation de Bcl-xl est présent dans les complexes.

Les études structurales ne donnant pas de résultats probants, nous avons caractérisé ces complexes à l'aide d'outils biophysiques pour connaître précisément leurs stœchiométries et leurs masses molaires. L'ensemble des expériences biophysiques mettent en évidence la présence d'une espèce de stœchiométrie 2 :2 pour les complexes TCTP/CMcl-1, TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM. De plus, différentes espèces intermédiaires ont été détectées suivant les complexes et les méthodes utilisées. En spectrométrie de masse en condition native, pour les mélanges TCTP+CMcl-1 et TCTP+Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM la présence des espèces intermédiaires (TCTP : CMcl-1 ou Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM) 1 :1 et 2 :1 ont été mises en évidence, tandis que le mélange TCTP+Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM présente les formes 1 :1 et 1 :2. La protéine Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM se purifiant uniquement sous forme de dimère, le complexe 2xTCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM ne peut pas exister. De manière générale, la présence d'espèces intermédiaires montre qu'il existe probablement un équilibre entre la forme 2 :2 et les autres formes de complexes. Pour les mélanges TCTP+CMcl-1 et TCTP+Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM, le complexe 2 :2 semble se former à la suite d'une succession d'étapes, indiquée dans la figure 102, comprenant d'abord la formation de l'hétérodimère TCTP+Bcl-2f (Bcl-2f représente CMcl-1 ou Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM), puis d'un hétérotrimère formé par l'addition d'une protéine de TCTP, et enfin d'un hétérotétramère constitué par l'ajout d'une protéine Bcl-2f.



**Figure 102 : Schéma des équilibres entre TCTP et ses partenaires anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2 (Bcl-2f = Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM ou CMcl-1).**

Pour le mélange TCTP+CMcl-1, nous pensons que la forme intermédiaire (TCTP : CMcl-1) 2 :1 est constituée d'un dimère de TCTP, et non de deux monomères de TCTP, associé à un monomère de CMcl-1, comme l'indique la figure 103. Comme CMcl-1 n'a jamais été détectée sous forme de dimère, nous supposons que la forme tétramérique 2 :2 est composée d'un dimère de TCTP avec un monomère de CMcl-1 de chaque côté (voir figure 103).



**Figure 103 : Schéma des équilibres entre TCTP et CMcl-1.**

Au sujet de Bcl-xl $\Delta$ 45-84 $\Delta$ TM, il est difficile d'extrapoler le mécanisme d'assemblage du complexe 2 :2 puisque cette protéine se trouve à la fois sous forme monomérique et dimérique. Pour le mélange TCTP+Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, contrairement à CMcl-1, nous pensons que l'hétérotrimère est formé d'un dimère de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et d'un monomère de TCTP puisque Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM se trouve uniquement sous forme de dimère. En ce qui concerne l'hétérotétramère, plusieurs assemblages sont possibles, dont le dimère de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM avec le dimère de TCTP. De manière générale, nous manquons d'informations pour établir clairement un mécanisme d'assemblage pour ces complexes.

Dans le but de déterminer les zones d'interactions, des mutants ont été générés. D'après des données bibliographiques, la tyrosine 101 de Bcl-xl est un résidu du sillon hydrophobe essentiel à l'interaction avec Bax (Min et al., 1999). Le mutant a été élaboré pour vérifier s'il en est de même avec TCTP. D'après des expériences en colonne d'exclusion de taille et en spectrométrie de masse en condition non dénaturante, TCTP ne se lie pas au mutant Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM,Y101K, par conséquent ce résidu est également nécessaire à l'interaction avec TCTP. Ces résultats laissent penser que Bcl-xl se lie de manière exclusive à TCTP ou à Bax, mais des tests de compétition doivent confirmer cette hypothèse. Par ailleurs, nous souhaitons réaliser des mutants sur CMcl-1 afin de savoir si le résidu situé à la même position que la tyrosine Y101 de Bcl-xl (l'histidine 224) a le même effet sur le complexe.

Des expériences de compétition suivies en spectrométrie de masse en condition native, entre TCTP et ABT 737, un inhibiteur spécifique de Bcl-xl, montrent que cet agent chimique rentre en compétition avec TCTP et casse le complexe entre TCTP et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. La structure de Bcl-xl avec ABT 737 (référence PDB : 2YXJ), indique que cette molécule se lie au niveau du sillon

hydrophobe de Bcl-xl délimité par la tyrosine 101 (Lee et al, 2007). Par conséquent, TCTP doit également interagir au niveau de la poche hydrophobe de Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM, et probablement de manière similaire aux protéines BH3-only. Des expériences de compétition en spectrométrie de masse avec des composés chimiques, tels que l'Obatoclox (GX-15-70, Gemin X Biotechnologies) et le Gossypol (AT-101, Ascenta), ou avec des peptides BH3 de Bax ou de Bim qui inhibent à la fois Bcl-xl et CMcl-1, pourront être envisagées avec TCTP afin de mieux cerner la zone d'interaction des deux complexes.

Nous avons également testé TCTP dépourvue de sa boucle (38-67). Les expériences en colonne d'exclusion de taille montrent que la boucle est primordiale pour l'interaction avec CMcl-1 alors qu'elle n'affecte pas les complexes composés des différentes constructions de Bcl-xl. Par conséquent, TCTP ne semble pas interagir exactement de la même manière avec ces deux protéines. Ainsi, nous pourrions envisager les mutations de plusieurs résidus au niveau de la boucle de TCTP afin de mettre en évidence les acides aminés engagés dans l'interaction avec CMcl-1.

D'autres mutations peuvent être intéressantes à réaliser, d'après l'article de Susini (Susini et al., 2008), le mutant K102A de TCTP réduit l'activité anti-apoptotique de TCTP dans les mitochondries en empêchant indirectement la dimérisation de Bax. Nous pourrions voir si cette mutation est corrélée à l'interaction avec Bcl-xl et CMcl-1. Par ailleurs, des études en co-immunoprécipitation ont montré que la mutation K257V de Mcl-1 murin décroît l'affinité de Mcl-1 pour TCTP, tout en conservant celle avec Bax et Bim (Liu et al., 2005). Il serait donc intéressant de tester ce mutant d'autant plus que la lysine 257 se situe en dehors du sillon hydrophobe, à l'extrémité de l'hélice  $\alpha$ 5, ce qui irait en contradiction avec notre hypothèse qui suppose que le sillon hydrophobe de CMcl-1 est impliqué dans l'interaction avec TCTP.

Il a été mis en évidence que l'arginine en position 21 de TCTP est impliquée dans l'interaction avec CMcl-1 et que sa mutation en alanine empêche l'interaction *in vivo* (Zhang et al., 2002). Nous avons testé ce mutant avec CMcl-1 et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM en colonne d'exclusion de taille et en spectrométrie de masse en condition native. Nous pouvons conclure que ce résidu est essentiel au maintien de ces deux complexes. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'article de Yang et al., 2005 qui indiquent que la partie N terminale de TCTP est importante dans l'interaction avec Bcl-xl. De plus, les résidus de la région N terminale compris entre les positions 20 et 27 sont hautement conservés parmi la souris, le lapin et l'homme (Yang et al., 2005). Par ailleurs, des comparaisons de séquence d'acides aminés entre la partie N terminale de TCTP et les domaines BH3 de Puma et de BIM, ont mis en relief un potentiel domaine BH3 non canonique au niveau des feuillettes  $\beta$ 3 et  $\beta$ 4 de TCTP, comprenant l'arginine 21. Cette partie comprise entre les résidus 20 à 34, pourrait

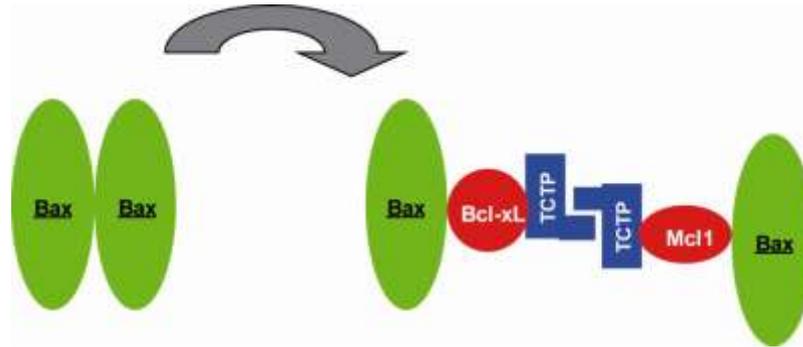
correspondre à la zone d'interaction avec CMcl-1 et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. Ces alignements montrent que l'acide aspartique 25 de TCTP est fortement conservée avec Puma et BIM. Il serait donc intéressant de vérifier si sa mutation permet de casser l'interaction avec ses partenaires.

De plus, une protéolyse ménagée à la thrombine nous a permis de mettre en évidence des complexes de fortes affinités entre la partie N terminale de TCTP (1-97) (ou de TCTP $\Delta$ loop (1-67)) et les protéines Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et CMcl-1 $\Delta$  $\alpha$ 1. D'après des analyses en spectrométrie de masse (MALDI), l'enzyme de clivage coupe les hélices et le cœur hydrophobe de TCTP en deux, engendrant certainement une déstructuration de la protéine. D'après les expériences en spectrométrie de masse en condition native (ESI-TOF), la partie N terminale de TCTP interagit de manière spécifique avec Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM pour former les complexes (TCTP : Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM) 2 : 2 et 1 : 2.

Nous pensons que lorsque TCTP est digérée, la partie 1-97 est libérée et présente plus facilement un épitope caché, comme le potentiel domaine BH3 non canonique, et se lie plus fortement aux partenaires. Ainsi, lorsque TCTP entier est incubé dans les conditions de formation des complexes (30°C, 50mM NaCl, pH9), la protéine pourrait changer de conformation et exposer ce site à ses partenaires. Le mode d'action de TCTP met probablement en jeu une restructuration de sa partie N terminale mais d'autres expériences sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

L'idéal serait d'identifier la séquence la plus courte de la région N terminale de TCTP en complexe avec Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM et CMcl-1 $\Delta$  $\alpha$ 1, pour initier des études en cristallographie et en RMN. Les premières études pourraient se porter sur les feuillets  $\beta$ 3 et  $\beta$ 4 afin de vérifier si ce domaine interagit comme un peptide BH3. Contrairement aux complexes précédents, limités par leur taille importante, le peptide de TCTP pourrait être analysé en RMN.

Nous avons voulu tester la sélectivité entre les deux partenaires de TCTP : CMcl-1 et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. Les résultats montrent que les trois protéines n'interagissent pas ensemble et que le complexe qui se forme, en présence des trois protéines, est celui entre TCTP et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM. Ainsi, CMcl-1 et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM rentrent en compétition pour un même site de TCTP et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM présente une plus forte affinité pour TCTP. Ces données nous permettent de remettre en cause l'hypothèse du model décrit dans l'article de Susini (Susini et al., 2008), qui est présenté dans la figure 104 ci-dessous.



**Figure 104 : Modèle d'interaction entre TCTP, Mcl-1, Bcl-xL et Bax, d'après Susini et al., 2008.**

Dans cet article, il est suggéré que TCTP forme un complexe avec les protéines, Bcl-xL et Mcl-1, de façon à empêcher la dimérisation de Bax. Nos expériences montrent que ces protéines doivent procéder autrement pour bloquer l'activité de Bax.

D'après la bibliographie, il est décrit que TCTP renforce l'activité anti-apoptotique de Mcl-1 et de Bcl-xL et qu'elle empêche indirectement la dimérisation de Bax (Liu et al., 2005; Susini et al., 2008; Yang et al., 2005). Une hypothèse possible serait que TCTP renforce l'interaction entre Mcl-1 ou Bcl-xL avec Bax ou que TCTP agisse en tant que chaperonne en stabilisant ces protéines dans les membranes, où des changements de conformation s'opèrent, afin qu'elles puissent accomplir leur fonction.



## VII. Annexe

---

Annexe 1 : Liste des protéines non canoniques interagissant avec la famille des Bcl-2.

Annexe 2 : Effets de la phosphorylation sur Mcl-1.

Annexe 3 : Protocoles pour les réactions BP et LR.

Annexe 4 : Plasmides générés pour expression dans *E. Coli*.

Annexe 5 : Plasmides générés pour une expression dans cellules d'insectes.

Annexe 6 : Cartes des vecteurs des plasmides les plus fréquemment exprimés.

Annexe 7 : Protocole de purification de His-MBP-CMcl-1.

Annexe 8 : Protocole de purification de GST-TCTP (pGGWA).

Annexe 9 : Protocole de purification de His-Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM.

Annexe 10 : Minitests de co-expression dans *E. Coli*.

Annexe 11 : Profils d'élution du complexe His-TCTP/Bcl-xl co-exprimé.

Annexe 12 : Profils d'élution des complexes His-TCTP/Bcl-xl, His-10glyTCTP/Bcl-xl et de GST-TCTP/Bcl-xl co-exprimés.

Annexe 13 : Profils d'élution du mélange équimolaire TCTP+Bcl-xl $\Delta$ TM.

Annexe 14 : Publication en cours de préparation.

Annexe 1 : Liste des protéines non canoniques interagissant avec la famille des Bcl-2.

TABLE I. List of Non-Canonical Proteins That Interact With BCL2-Family Members

Symbol	Name	Alternative names	Interaction identified	Function	References
BCL2					
MYC	MYC	c-MYC	IP, co-localization w/ func.	Anti-apopt/prolif.	Jin et al. [2004]
CASP8	Caspase8	FLICE	Co-ip, co-local	Apopt.	Ng et al. [1997]
SMN1 [Coovert et al., 2000]	Survival of motor neuron 1	SMA	Y2H, co-ip, co-local, func.	Anti-apopt.	Iwahashi et al. [1997]
SOD1 [Gould et al., 2006]	Superoxide dismutase 1	SOD	Co-ip, crosslinking, func.	Anti-apopt.	Fasinelli et al. [2004]
RAS	Related RAS	p23	Y2H, co-ip	n.d.	Fernandez-Sarabia and Bischoff [1993]
MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8	JNK1	Co-ip, functional	Apopt.	Yamamoto et al. [1999]
RAF1 [Olivier et al., 1997]	Nicotin 1,4,5-triphosphate receptor 1	c-RAF	Co-ip	Anti-apopt.	Wang et al. [1994]
TPST	Prion Protein	IP3R1, InsP3R	Co-ip, functional	Apopt.	Chen et al. [2004]
PRNP	Transformed mouse 3T3 cell double minute 4	PiP, PiPc	Y2H	n.d.	Kurschner and Morgan [1995]
MDM4	Tumor receptor p53 binding protein, 2	MDMX	Co-ip, co-local, functional	Apopt.	Mancini et al. [2009]
TP53BP2	Insulin receptor substrate 2	53BP2, ASPP2, PPP1R13A	Y2H, co-ip, co-local	Apopt.	Naumovski and Cleary [1996]
IRS2	Insulin receptor substrate 1	IRS-2	Co-ip	Anti-apopt.	Ueno et al. [2000]
PPP2CA	Protein phosphatase 2, catalytic subunit, alpha	PP2Ac, PP2CA	Co-ip, functional	n.d.	Deng et al. [1998]
PABP1	Poly(AADP-ribose) polymerase 1	ADPRT1, PARP	Co-ip	Apopt.	Song et al. [2002]
TP53AIP1	p53 regulated apoptosis inducing protein 1	P53AIP1	Co-ip, co-local, functional	Apopt.	Matsuda et al. [2002]
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	ERK, P42MAPK	Co-ip, functional	Apopt.	Tamura et al. [2004]
PXN	Paxillin	FLJ16691	Co-ip	n.d.	Sorenson and Sheibani [1999]
RP53A	Ribosomal protein S3A	FTE1, MFTL	Co-ip	Anti-apopt.	Hu et al. [2000]
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	p33	Co-ip	Prolif.	Schmitt et al. [2007]
CASP3	Caspase 3	CPP32, CPP328	Co-ip	Apopt.	Cheng et al. [1997]
RAD9A	RAD9 homolog A	Rad9	In vitro cleavage assay	Apopt.	Komatsu et al. [2000]
RTN4	Reticulon 4	RTN-x	Y2H, co-ip, co-local, func.	Apopt.	Tagami et al. [2000]
P5EN1	Presenilin 1	AD3, FAD, PS1	Y2H, co-ip, cross-link, func.	Apopt.	Alberici et al. [1999]
SPNS1	Sprintar homologue 1	Hspn1	Co-ip, co-local	Autophagy	Yanagisawa et al. [2003]
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1	Cdc2	Co-ip	Cell cycle	Pathan et al. [2001]
FKBP8	FK506 binding protein B, 38 kDa	FKBP38	Y2H, co-ip, co-local, func.	Anti-apopt.	Shirane and Nakayama [2003]
NRAA1	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	Nur77, TR3	M2H, co-ip, co-local, func.	Apopt.	Lin et al. [2004]
IRS1	Insulin receptor substrate 1	HIRS-1	Co-ip, co-local, functional	Anti-apopt.	Ueno et al. [2000]
NLRP1	NLR family, pyrin domain containing 1	Card7, NALP1	Co-ip, functional	Apopt.	Bruey et al. [2007]
TP53	Tumor protein p53	p53, TRP53	Co-ip, functional	Apopt.	Mihara et al. [2003]
PPP1CA	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha	PP-1A, PPP1A	Y2H, co-ip, co-local	Apopt.	Ayllón et al. [2011]
CAPN2	Calpain 2	CANP2, CANPL2	Cleavage assay	Apopt.	Gil-Parrao et al. [2002]
Pin1	Peptidylprolyl cis/trans isomerase	DDD, UBL5	Co-ip	n.d.	Pathan et al. [2001]
AVEN	Apoptosis, caspase activation inhibitor	PDCD12	Y2H, co-ip	Anti-apopt.	Chau et al. [2000]
BCAP31	B-cell receptor-associated protein 31	Bap31, p28	Far western/seq, co-ip, func.	Apopt.	Ng et al. [1997]
BFAR	Bifunctional apoptosis inhibitor	BAR, RNF47	Y2H, co-ip, functional	Anti-apopt.	Zhang et al. [2000]
BCL1					
BTR1	Reticulon 1	NSP-C	Y2H, co-ip, functional	Apopt.	Tagami et al. [2000]
PGAM5	Phosphoglycerate mutase family member 5	BXLBV68	Co-ip	n.d.	Lo and Flamenk [2006]
IKZF3	IKAROS family zinc finger 3	Aiolos, ZNFN1A3	Co-ip	Apopt.	Reboilo et al. [2001]
PSEN2	Presenilin 2	ADA, PS2, STM2	Y2H, co-IP, co-local	Apopt.	Passer et al. [1999]
APAF1 [Moriishi et al., 1999]	Apoptotic peptidase activating factor 1	APAF-1, CED4	Co-ip	Apopt.	Hu et al. [1998]
MYO5A	Myosin VA (heavy chain 12, myosin)	MYH12, MYOS, MYR12	Co-ip	n.d.	Du et al. [2007]
PLK1	polo-like kinase 1	PLK, STPK13	Co-local, functional	n.d.	Tamura et al. [2009]
CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase	APAF3	Co-ip	Apopt.	Hu et al. [1998]
OLFMT1	Olfactomedin 1	pancortin 1, AMY, NOE1	Co-ip, functional	Anti-apopt.	Cheng et al. [2007]
RTN4	Reticulon 4	RTN-x	Y2H, co-ip, co-local, func.	Apopt.	Tagami et al. [2000]
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1	Cdk2	Co-ip, co-local, functional	Prolif.	Schmitt et al. [2007]
RAD9A	RAD9 homolog A	Rad9	Y2H, co-IP, functional	Apopt.	Komatsu et al. [2000]
PPP1CA	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha	PP-1A, PPP1A	Co-ip	Apopt.	Ayllón et al. [2002]
VDAC1	Voltage-dependent anion channel 1	FORIN, FORIN-31-HL	Co-ip, functional	Apopt.	Shimizu et al. [2000]
SPNS1	SPINSTER homologue 1	Hspn1	Co-ip, co-local, functional	Autophagy	Yanagisawa et al. [2003]
PSEN1	Presenilin 1	AD3, FAD, PS1	Y2H, functional	Apopt.	Yamamoto et al. [1999]
FKBP8	FK506 binding protein B, 38 kDa	FKBP38	Y2H, co-ip, co-local, func.	Anti-apopt.	Tagami et al. [2000]
CAPN2	Calpain 2	CANP2, CANPL2, m-calpain	Cleavage assay	Apopt.	Nakagawa and Yuan [2000]
AVEN	Tois, caspase activation inhibitor	PDCD12	Y2H, co-ip, co-local	Anti-apopt.	Chau et al. [2000]
BCAP31	B-cell receptor-associated protein 31	Bap31, p28	Co-ip	Apopt.	Ng et al. [1997]
TP53	Tumor protein p53	p53, TRP53	Co-ip, functional	Apopt.	Mihara et al. [2003]

(Continued)

Figure 105 : Liste des protéines non canoniques interagissant avec les protéines de la famille Bcl-2 (Beverly et al., 2012). Les fonctions des protéines non canoniques dans l'apoptose ainsi que la technique utilisée pour mettre en évidence ces interactions sont décrites dans le tableau.

TABLE I. (Continued)

Symbol	Name	Alternative names	Interaction identified	Function	References
IRS1	Insulin receptor substrate 1	HIRS-1	Co-ip	Anti-apop.	Ueno et al. [2000]
NLRP1	NLR family, pyrin domain containing 1	Card7, NALP1	Co-ip, functional	A.poop.	Bruey et al. [2007]
TPT1	Tumor protein, translationally-controlled 1	TCTP, HRF	Co-ip, co-local, functional	Anti-apop.	Liu et al. [2005]
BFA1	Bifunctional apoptosis inhibitor	BAR, RNF47	Y2h, co-ip, functional	Anti-apop.	Zhang et al. [2000]
MCL1					
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	MGC8367	Y2h, co-ip, functional	Prolif.	Fujise et al. [2000]
DAD1	Defender against cell death 1	OST2	Y2h, co-ip, co-local	n.d.	Makishima et al. [2000]
TNKS	Tankyrase	PARP5A, PARPL, TINF1	Y2h, co-ip, functional	A.poop.	Bae et al. [2003]
HUWE1	HECT, UBA and WWE domain containing 1	MULE, ARF-BP1	Co-ip, functional	A.poop.	Zhong et al. [2005]
MAPK10	Mitogen-activated protein kinase 10	JNK3	Co-ip, functional	A.poop.	Li et al. [2007]
USP9X	Ubiquitin-specific peptidase 9, X-linked	DIFERX, FAF, FAM	Co-ip, functional	Anti-apop.	Schwickart et al. [2010]
IER3	Immediate early response 3	DIF2, GLY96, IEX1, PRG1	Y2h, co-ip	A.poop.	Yoon et al. [2009]
TPT1	Tumor protein, translationally-controlled 1	TCTP, HRF	Co-ip, co-local, functional	Anti-apop.	Yang et al. [2005]
VDAC1	Voltage-dependent anion channel 1	POB1N, PORIN-31-HL	Co-ip (with cleaved MCL1)	A.poop.	Weng et al. [2005]
PIN1	Peptidylprolyl cis/trans isomerase	DOO, UBLS	Co-ip, functional	Anti-apop.	Li et al. [2007]
CASP3	Caspase 3	CPP32, CPP32B	In vitro cleavage assay	A.poop.	Weng et al. [2005]
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1	Cdk2	Co-ip, kinase assay	A.poop.	Harley et al. [2010]
BCL2L1	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha	PP-1A, PPP1A	Co-ip	A.poop.	Ayllón et al. [2002]
BCL2					
NF4A1	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	Nur77, TR3	Co-ip, functional	A.poop.	Luciano et al. [2007]
TPT1	Tumor protein, translationally-controlled 1	TCTP, HRF	Y2h, co-ip, co-local	Anti-apop.	Gulliamin et al. [2009]
BFL1					
IRG1	Inhibitor of growth family, member 1	p33; p47; p47ING1a	Y2h, co-ip	A.poop.	Ha et al. [2002]
NR4A1	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	Nur77, TR3	Co-ip, functional	A.poop.	Luciano et al. [2007]

Figure 106 : Liste des protéines non canoniques interagissant avec les protéines de la famille Bcl-2 (Beverly et al., 2012) (suite). En rouge, nous reconnaissons TCTP (TPT1) qui interagit avec Bcl-b mais également avec Mcl-1 et Bcl-xl.

## Annexe 2 : Effets de la phosphorylation sur Mcl-1.

Résidus	Kinases	Effets de la phosphorylation
<b>Sérine 64</b>	CDs 1 et 2, JNK	Cycle dépendant /Pas d'effet sur la stabilité/ Nécessaire pour sa fonction anti-apoptotique et son hétérodimérisation avec les protéines pro-apoptotiques de la famille des Bcl-2.
<b>Thréonine 92</b>	ERK-1	Phosphorylation, faite conjointement avec Thréonine 163, stabilise Mcl-1/ Stabilité liée aussi à l'interaction avec Pin-1.
<b>Sérine 121</b>	JNK et p38	Phosphorylation faite conjointement avec Thréonine 163/ stabilise Mcl-1/protège les cellules de l'apoptose induite par TF/ Pas de phosphorylation sur les deux résidus ->Mcl-1 inhibe davantage l'apoptose de cellules sous traitement H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .
<b>Sérine 155</b>	GSK-3	Phosphorylation faite conjointement avec Thréonine 163 et Sérine 159 -> déstabilise Mcl-1/seulement Sérine 155 non phosphorylée-> Mcl-1 inhibe davantage l'apoptose de cellules MCF-7 induites par 5-fluorouracil.
<b>Sérine 159</b>	GSK-3	Phosphorylation, faite après Thréonine 163 -> déstabilise Mcl-1 et empêche l'interaction entre Mcl-1 et Bim/ entrave la fonction apoptotique de Mcl-1/ Ubiquitination de Mcl-1 par β-TrCP réalisée après phosphorylation de Sérine 159.
<b>Thréonine 163</b>	ERK, GSK-3 et JNK	Résidu phosphorylé en tant que point d'amorçage pour les autres phosphorylations.

Tableau 16 : Résumé des effets de la phosphorylation sur Mcl-1 suivant les différents résidus (Thomas et al., 2010).

## Annexe 3: Protocoles pour les réactions BP et LR.

Réaction BP, volume final 5µL	Réaction LR, volume final 5µL
30 fmol du produit PCR	1µL pDEST (100 ng/µL)
100ng du vecteur donneur pDONR207	1µL pENTR (100 ng/µL)
1µL du tampon BP 5x	1µL du tampon LR 5x
1µL du mélange BP clonase	1µL TE pH=8 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA)
q.s.p 4 µL avec l'eau MQ	1µL du mélange LR clonase
Mélange incubé sur la nuit à température ambiante. Lendemain, arrêt de la réaction par ajout de 1.2µg de Protéinase K pendant 10 min à 37°C. Transformation dans DH5α.	Mélange incubé pendant 1 heure à température ambiante puis arrêt de la réaction par ajout de 1.2µg de protéinase K pendant 37°C 10min. Transformation dans DH5α.

Tableau 17 : Protocoles pour BP et LR.

#### Annexe 4: Plasmides générés pour une expression dans *E.Coli*.

Constructions	Nombre AA	Vecteur	Tag	Enzyme de clivage	Constructions	Nombre AA	Vecteur	Tag	Enzyme de clivage
Mcl-1	1-350	pnea-tH	His	thrombine	TCTP	1-172	pGex-6P-1	GST	P3C
Mcl-1	1-350	pGex	GST	thrombine	TCTP	1-172	pncs	Pas de tag	rien
Mcl-1	1-350	pncs	Pas de tag	rien	TCTP	1-172	pGGWA	GST	Tev
CMcl-1	171-326	pnea-tH	His	thrombine	Bcl-xl FL	1-233	pnea-tH	His	thrombine
CMcl-1	171-326	pGex-6p-1	GST	P3C	Bcl-xl FL	1-233	pGex	GST	thrombine
CMcl-1	171-326	pnea-vHM	His-MBP	tev	Bcl-xl FL	1-233	pnea-tHM	His-MBP	thrombine
CMcl-1	171-326	pnea-tHM	His-MBP	thrombine	Bcl-xl FL	1-233	pncs	Pas de tag	Rien
CMcl-1	171-326	pnea\tH	His en Cter	thrombine	Bcl-xl FL	1-233	pnea-vHM	His-MBP	Tev
CMcl-1	171-326	pncs	Pas de tag	rien	Bcl-xl FL	1-233	pnea\tH	His en Cter	thrombine
NMcl-1	1-164	pnea-tH	His	thrombine	Bcl-xl ΔTM	1-209	pnea-tH	His	thrombine
NMcl-1	1-164	pncs	Pas de tag	rien	Bcl-xl ΔTM	1-209	pgex	GST	thrombine
Mcl-1ΔNter	171-350	pnea-tH	His	thrombine	Bcl-xl ΔTM	1-209	pncs	Pas de tag	Rien
Mcl-1ΔNter	171-350	pncs	Pas de tag	rien	Bcl-xl ΔTM	1-209	pnea\tH	His en Cter	thrombine
Mcl-1ΔTM	1-326	pnea-tH	His	thrombine	Bcl-xl Δ45-84ΔTM	1-44 ; 85-209	pnea-tH	His	thrombine
Mcl-1ΔTM	1-326	pncs	Pas de tag	rien	Bcl-xl Δ45-84ΔTM	1-44 ; 85-209	pgex	GST	thrombine
TCTPΔ1-10	11-172	pnea-tH	His	thrombine	Bcl-xl Δ45-84ΔTM	1-44 ; 85-209	pncs	Pas de tag	Rien
TCTPΔ1-10	11-172	pGex	GST	thrombine	Bcl-xl Δ27-81ΔTM	1-26 ; 82-209	pnea-tH	His	thrombine
TCTPΔ1-10	11-172	pncs	Pas de tag	rien	Bcl-xl Δ27-81ΔTM	1-26 ; 82-209	pgex	GST	thrombine
TCTPΔloop	1-36 ;68-173	pGex	GST	thrombine	Bcl-xl Δ27-81ΔTM	1-26 ; 82-209	pncs	Pas de tag	Rien
TCTP	1-172	pnea-tH	His	thrombine	Bcl-xl Δ27-81ΔTM	1-26 ; 82-209	pnea\tH	His en Cter	thrombine
TCTP	1-172	pnea\tH	His en Cter	thrombine	Bcl-xlΔ12	1-221	pnea-tH	His	thrombine

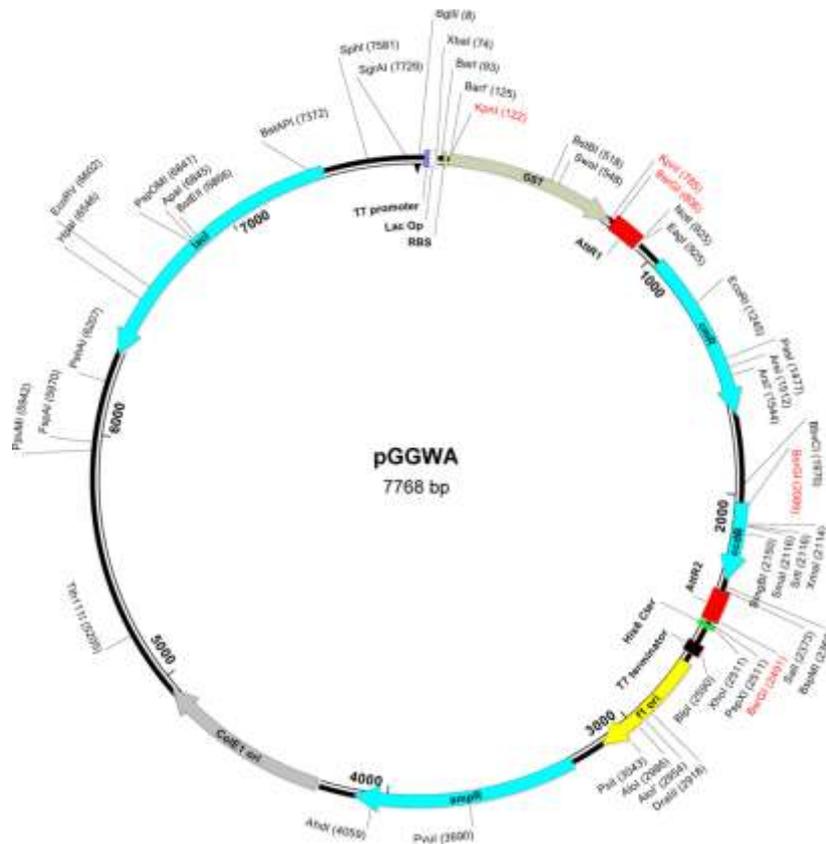
Tableau 18 : Ensemble des plasmides générés pour les minitests de co-expression.

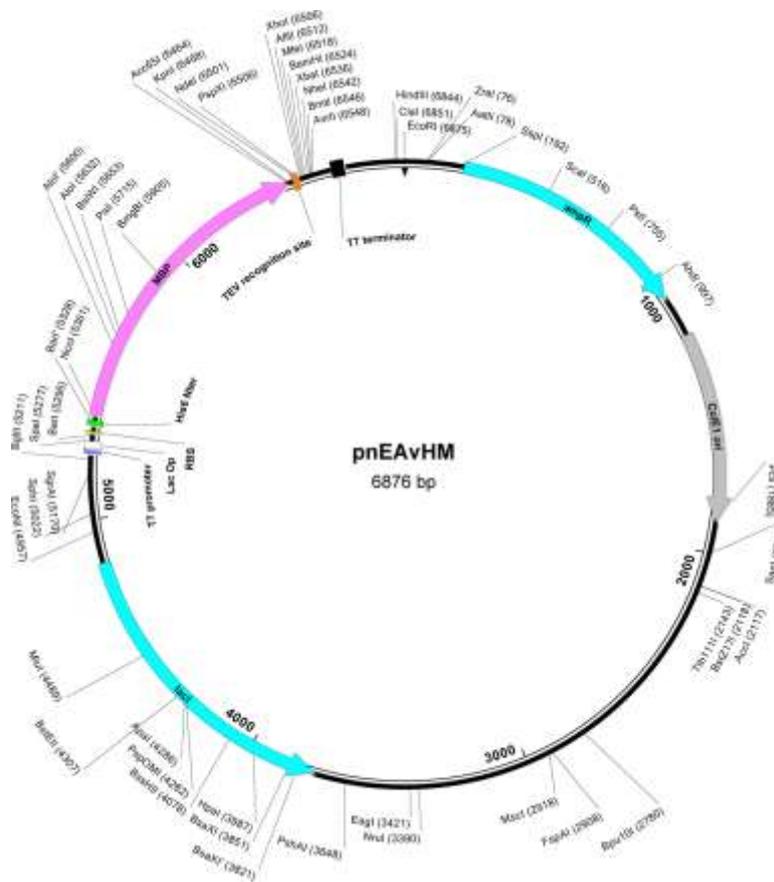
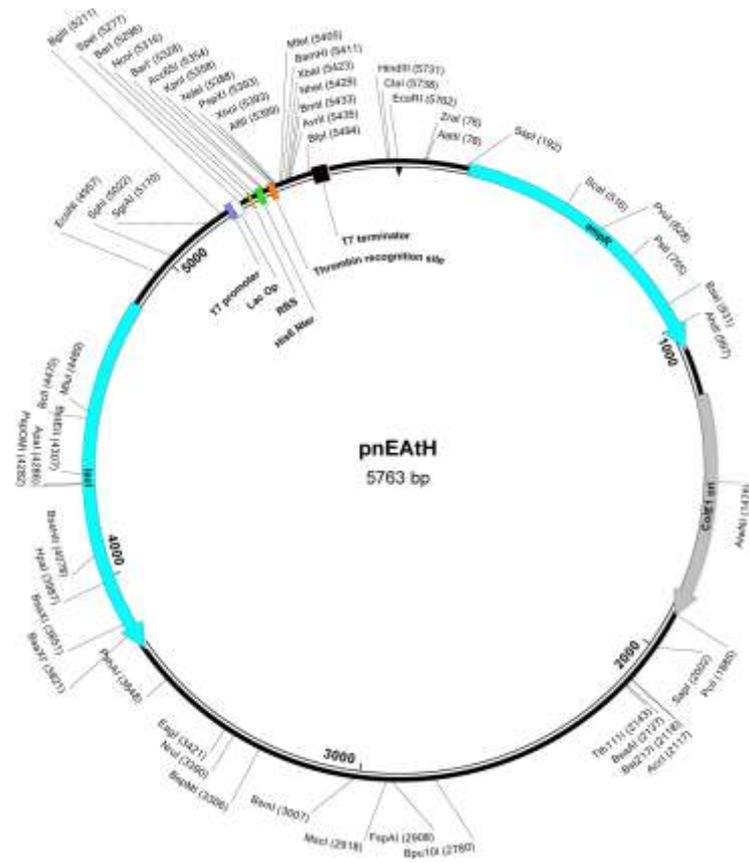
**Annexe 5 : Plasmides générés pour une expression dans cellules d'insectes.**

Constructions	Nombre AA	Vecteur	Tag
TCTP	1-172	pDEST20	GST
TCTP	1-172	pBacHGW	His
TCTP	1-172	PBac0GW	Pas de tag
Mcl-1	1-350	pBacHGW	His
Mcl-1	1-350	PBac0GW	Pas de tag
Bcl-xl	1-233	pBacHGW	His
Bcl-xl	1-233	PBac0GW	Pas de tag

**Tableau 19 : Ensemble des plasmides générés pour les minitests dans les cellules d'insectes.**

**Annexe 6 : Cartes des vecteurs des plasmides les plus fréquemment exprimés.**





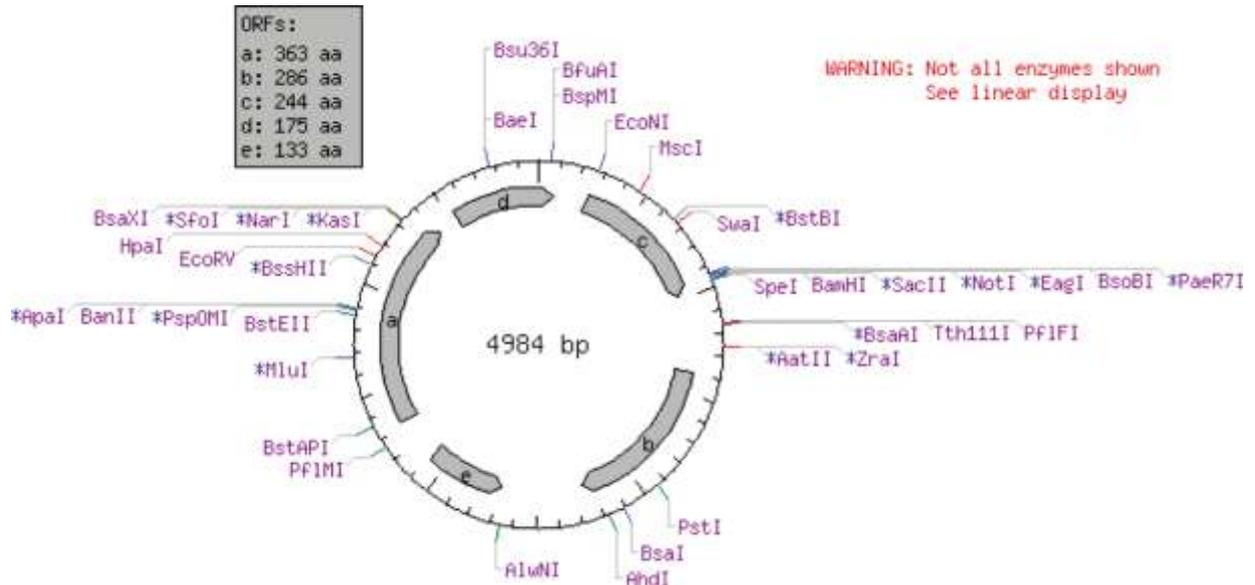


Figure 107 : Cartes des vecteurs pGGWA, pnea-tH, pnea-vHM et pGex.

## **Annexe 7 : Protocole de purification de His-MBP-CMcl-1.**

Un volume de 48 $\mu$ L bactéries BL21 (DE3, pRARE2) est transformé avec 0,7 $\mu$ L du plasmide His-MBP-CMcl-1. La préculture est réalisée sur une grande boîte de pétri qui sert à inoculer un litre de culture. La purification utilise 3L de bactéries donc 3 boîtes de pétris de précultures sont nécessaires. Les bactéries sont cultivées à 37°C dans un milieu 2LB et lorsque la densité optique (DO) à 600nm est proche de 1, la température d'incubation est baissée à 25°C. Quand la DO atteint 1,7, l'induction de l'expression de la protéine His-MBP-CMcl-1 est déclenchée par l'ajout de 600 $\mu$ L d'IPTG à 1M. Les cellules sont récupérées après une nuit d'incubation à 25°C en centrifugeant à 4000 rpm pendant 20 min.

Le tampon stock, dégazé au préalable pendant 10 minutes dans un sonicateur, est composé de 50mM NaCl et de 10mM Tris pH=8. Le tampon de lyse est constitué du tampon stock complété avec du PIC (Proteases Inhibitor Cocktail, 1 pastille pour 50mL de tampon), 10mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol (le stock est à 14.3M) et 1mM PMSF (dissous à 0.1M dans de l'éthanol). Pour chaque litre de culture, le culot est repris dans environ 80mL de tampon de lyse, le volume d'extrait total est proche de 300mL. L'extrait total des cellules est lysé par sonication dans de la glace pendant quatre fois une minute à 45% d'amplitude, avec un pulse à 0,5 seconde. Chaque minute de sonication est espacée d'une minute de repos. Le lysat cellulaire est centrifugé pendant 45 min voire 1 heure à 15 000 rpm à 4°C.

Pour 1 Litre de culture, nous utilisons 4 mL de billes Ni-NTA liquide (Qiagen), pour la purification de 3L de cultures, 12 mL de résine sont nécessaires. Les billes sont préalablement équilibrées avec le tampon de lyse. Le lysat cellulaire est réparti dans 6 falcons de 50 mL et incubé avec la résine en ajoutant 20mM d'imidazole. Les falcons sont placés en chambre froide sur un plateau tournant pendant 2h00. Ensuite, les falcons sont centrifugés pendant 10 min à 1000 rpm à 4°C puis les billes sont placées dans 3 colonnes (colonne polypropylène Qiagen) où elles sont lavées avec trois volumes de colonne de tampon de lyse et deux volumes de colonnes de tampon de lyse complété de 20mM d'imidazole. Le tampon d'élution est constitué du tampon stock agrémenté de 250mM d'imidazole. Pour chaque élution, la résine est incubée, dans la colonne, avec 4 mL de tampon d'élution pendant 10min à 4°C sur une plaque tournante. L'élution est récupérée et l'expérience est renouvelée avec deux fois 3mL et une fois 2mL de tampon d'élution. A la fin, nous récupérons environ 36mL de protéines, la quantité de His-MBP-CMcl-1 obtenue tourne autour de 40mg (allant de 35 à 58 mg). Pour enlever l'imidazole du tampon, une dialyse sur la nuit est réalisée dans 1L de tampon stock complété de 1mM de DTT, à 4°C avec une membrane d'un diamètre de 20.4mm et d'un cut-off de 12Kda (Spectra/Por).

Le lendemain, l'échantillon de 36mL est chargé sur une échangeuse d'anions (QHP 5mL) pour se débarrasser des contaminants. Un gradient est effectué sur 20 CV (volume de colonne) : 20% tampon B sur 13CV et 100% tampon B sur 7CV, où le tampon B est constitué de 1M NaCl, 10mM Tris pH=8 et 1mM DTT et le tampon A de 50mM NaCl, 10mM Tris pH=8 et 1mM DTT. Les fractions comportant le moins de contaminant, c'est-à-dire le pic principal (voir figure 63.1), sont récupérées puis incubées avec 200 $\mu$ L de Tev (50% glycérol et DO=1,2) et placées dans une membrane à dialyse avec un diamètre de 24mm et d'un petit cut-off de 1Kda (Spectra/Por), sur la nuit à 4°C dans 1L de tampon stock avec 0,5mM EDTA et 1mM DTT. Cette dialyse permet de diminuer la teneur en sel et de couper l'étiquette His-MBP de la protéine. En parallèle, la colonne S 200 sans protéases est nettoyée avec 0,5M de NaOH puis de l'eau puis du tampon avec 1mM de DTT.

L'échantillon est ensuite chargé sur une échangeuse d'anions (QHP 5mL GE Healthcare) pour récupérer uniquement CMcl-1 sans étiquette. En effet, le tag His-MBP se lie à l'échangeuse d'anion alors que CMcl-1 n'est pas retenue sur la colonne et se retrouve dans le flow through (voir figure 63).

Le gradient effectué est : 40% tampon B sur 13CV et 100% tampon B sur 7CV. La protéine est récupérée dans le flow through et les lavages de la colonne. Cette protéine est concentrée avec un amicon avec un cut off de 3 Kda (Millipore), préalablement nettoyé avec le tampon stock, jusqu'à obtenir un volume entre 1 et 5 ml afin de pouvoir l'injecter dans une colonne d'exclusion de taille de type Superdex S 200 16/60, équilibrée au préalable dans du tampon stock avec 1mM DTT.

CMcl-1 est éluée aux alentours de 18mL, les fractions sont regroupées et centrifugées dans un amicon de 3Kda (Millipore), si la protéine fraîche est utilisée juste après, la concentration doit être à 2,7 mg/ml sinon elle est conservée à 0,8 mg/ml à 4°C. Mais dans ce tampon la protéine est instable, elle commence à précipiter à partir d'une nuit à 4°C.

## **Annexe 8 : Protocole de purification de GST-TCTP (pGGWA).**

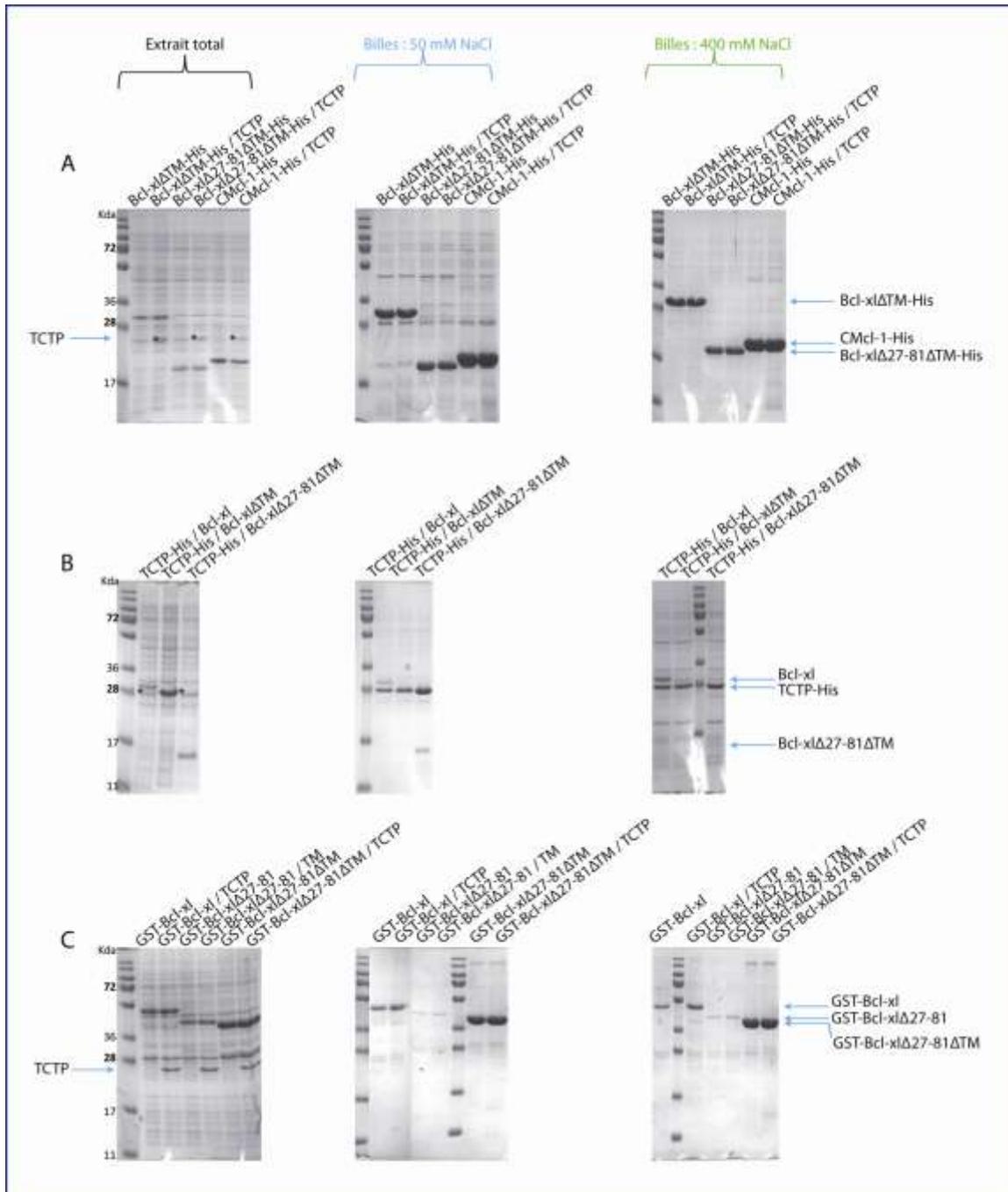
Un volume de 48 $\mu$ L bactéries BL21 (DE3, pRARE2) est transformé avec 0,7 $\mu$ L du plasmide GST-TCTP (pGGWA). La préculture est réalisée sur une grande boîte de pétri qui sert à inoculer un litre de culture. La purification utilise 3L de bactéries donc 3 boîtes de pétris de précultures sont nécessaires. Les bactéries sont cultivées à 37°C dans un milieu 2LB et lorsque la densité optique (DO) à 600nm est proche de 1, la température d'incubation est baissée à 25°C. Quand la DO atteint 1,8, l'induction de l'expression de la protéine His-MBP-CMcl-1 est déclenchée par l'ajout de 600 $\mu$ L d'IPTG à 1M. Les cellules sont récupérées après une nuit d'incubation à 25°C en centrifugeant à 4000 rpm pendant 20 min.

Le tampon stock, dégazé au préalable pendant 10 minutes dans un sonicateur, est composé de 50mM NaCl et de 10mM Tris pH=8. Le tampon de lyse est constitué du tampon stock complété avec du PIC (Proteases Inhibitor Cocktail, 1 pastille pour 50mL de tampon), 10mM de  $\beta$ -mercaptoéthanol (le stock est à 14.3M) et 1mM PMSF (dissous à 0.1M dans de l'éthanol). Pour chaque litre de culture, le culot est repris dans environ 80mL de tampon de lyse, le volume d'extrait total est proche de 300mL. L'extrait total des cellules est lysé par sonication dans de la glace pendant quatre fois une minute à 45% d'amplitude, avec un pulse à 0,5 seconde. Chaque minute de sonication est espacée d'une minute de repos. Le lysat cellulaire est centrifugé pendant 45 min voire 1 heure à 15 000 rpm à 4°C.

L'extrait soluble est récupéré et incubé avec 9mL de billes glutathion-sepharose liquide, préalablement lavées avec le tampon de lyse, pendant 2h00 sous agitation à 4°C dans des falcons 50mL. A la fin de l'incubation, les falcons sont centrifugés pendant 10 min à 1000 rpm à 4°C. Les billes sont récupérées et placées dans trois colonnes avec tamis (colonne polypropylène Qiagen), puis elles sont lavées avec 2 volumes de colonnes (env. 2x10mL) de tampon 2M NaCl, 10mM Tris pH=8 afin de se débarrasser de l'ADN et 2 volumes de colonnes de tampon de lyse. Les protéines sont éluées des billes avec le tampon stock complété de 10mM de glutathion (le pH étant ajusté préalablement à 8). Une élution de 4mL et quatre éluions 3mL sont effectuées en agitant 10 min à 4°C pour chaque colonne à tamis. Le volume total récupéré est environ de 48 mL.

Ensuite, l'étiquette GST est coupée sur la nuit à 30°C (dans l'incubateur MP1 sous agitation) en dialysant avec 1L de tampon complété de 1mM DTT et de 0.5mM EDTA. La membrane de dialyse a un cut-off de 12 Kda env. et un diamètre de 20.4nm (Spectra/Por). Nous prenons 1/20 de tev par rapport à la quantité (en mg) de protéines. Pour les 3L de GST-(tev)-TCTP, 4.5mg de Tev sont rajoutés. La dialyse permet d'enlever le glycérol apporté par l'enzyme et le glutathion. Les billes GST utilisées sont lavées avec plusieurs volumes colonnes de tampon de lyse (30CV) pour se débarrasser du glutathion. Ensuite les billes sont incubées avec la protéine de dialyse pendant 2H à 4°C sous agitation, pour que les protéines GST et de GST-TCTP non coupé soient récupérées sur les billes et qu'uniquement TCTP reste en solution. Une fois la résine retirée, la solution est injectée dans une Q HP 5mL avec un gradient : 0 à 25% tampon B sur 13CV et 100% tampon B sur 7CV, où le tampon B=1M NaCl, 10mm tris pH=8 et 1mM DTT, tampon A est le même que le tampon stock plus 1mM DTT, le débit utilisé est de 3ml/min. Le deuxième pic du profil d'élution, qui comprend TCTP et les restes de GST-TCTP, (voir figure 45) est récupéré puis chargé sur une colonne d'exclusion de type S200 16/60 .TCTP seul est éluée dans le pic principal (voir figure 45), nous obtenons environ 20mg de protéine.

**Annexe 10 : Minitests de co-expression dans E.Coli.**



**Figure 108 : Minitests de co-expression.** En 108.A, minitests de co-expressions de *Bcl-xLΔTM-His/TCTP*, *Bcl-xLΔ27-81ΔTM-His/TCTP* et de *CMcl-1-His/TCTP* ainsi que minitests d'expression de *Bcl-xLΔTM-His*, *Bcl-xLΔ27-81ΔTM-His* et de *CMcl-1-His*. En 108.B, minitests de co-expressions de *TCTP-His/Bcl-xL*, *TCTP-His/Bcl-xLΔTM* et *TCTP-His/Bcl-xLΔ27-81ΔTM*. En 108.C, minitests de co-expressions de *GST-Bcl-xL/TCTP*, *GST-Bcl-xLΔ27-81/TCTP* et de *GST-Bcl-xLΔ27-81ΔTM/TCTP* ainsi que minitests d'expression de *GST-Bcl-xL*, *GST-Bcl-xLΔ27-81* et de *GST-Bcl-xLΔ27-81ΔTM*.

**Annexe 11 : Profils d'élution du complexe His-TCTP/Bcl-xl co-exprimé.**

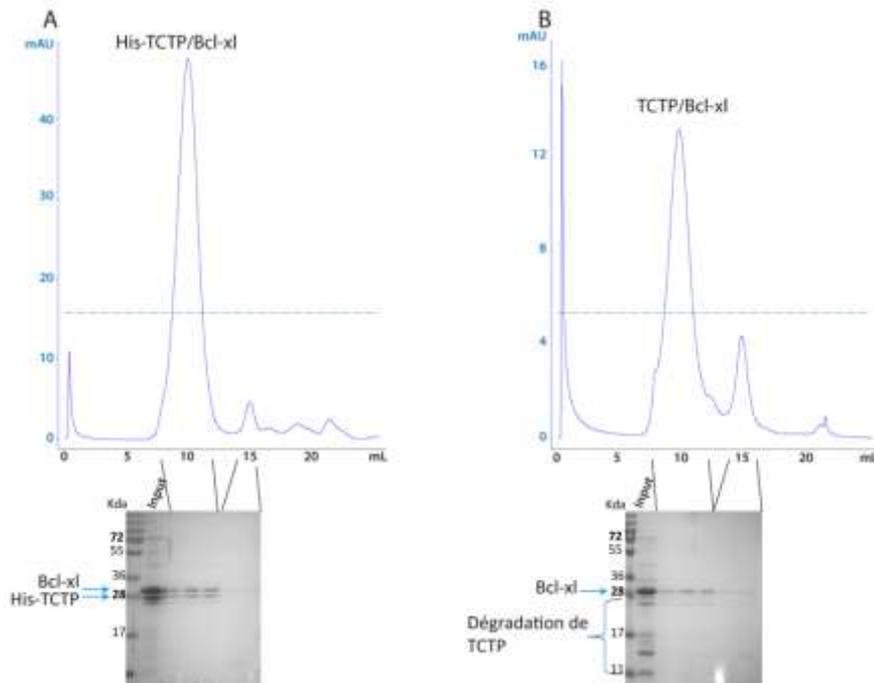


Figure 109 : Profils d'élutions de colonne d'exclusion de His-TCTP/Bcl-xl élué à l'imidazole et de His-TCTP/Bcl-xl élué à l'imidazole puis coupé à la thrombine.

**Annexe 12 : Profils d'élution des complexes His-TCTP/Bcl-xl, His-10glyTCTP/Bcl-xl et de GST-TCTP/Bcl-xl co-exprimés.**

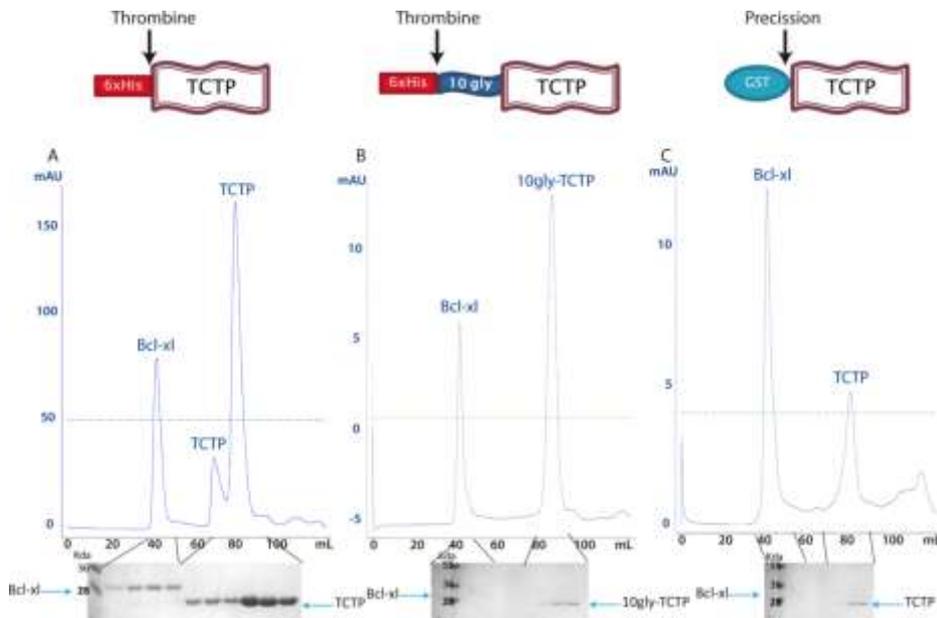
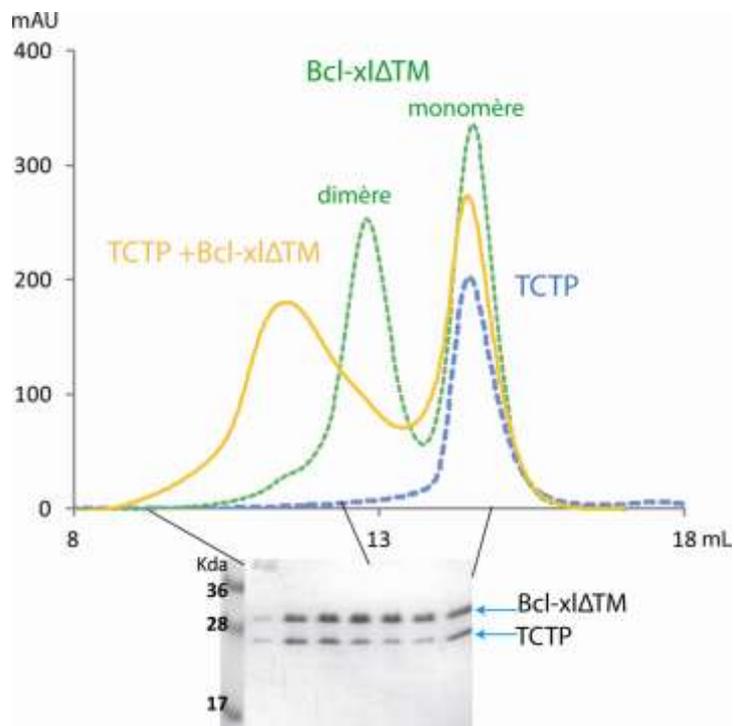


Figure 110 : Profils d'élutions de gel filtration des complexes His-TCTP/Bcl-xl, His-10glyTCTP/Bcl-xl et de GST-TCTP/Bcl-xl co-exprimés. Ces complexes ont été élués sur résine avec une enzyme de coupure.

**Annexe 13 : Profils d'élution du mélange équimolaire TCTP+Bcl-xIΔTM.**



**Figure 111 : Superposition de profils d'élution de colonne d'exclusion des protéines seules et du mélange TCTP+Bcl-xIΔTM.**

## **Annexe 14 : Publication en cours de préparation.**

### **Identification of heterotetrameric complexes between TCTP and Bcl-xL or Mcl-1.**

Stéphanie Thébault<sup>1</sup>\*, Morgane Agez<sup>2</sup>\*, Johann Stojko<sup>3</sup>, Isabelle Massobrio<sup>2</sup>, *Catherine Birk*<sup>2</sup>, Sarah Cianferani<sup>3</sup>, Robert Amson<sup>1</sup>, Adam Telerman<sup>1</sup> and Jean Cavarelli<sup>2</sup>

\* These authors have equally contributed

<sup>1</sup>CNRS-UMR 8113, LBPA, École Normale Supérieure, 61 avenue du Président Wilson, 94235 Cachan, France.

<sup>2</sup> Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), INSERM U964, CNRS UMR 7104, Université de Strasbourg, 1 rue Laurent Fries, BP 10142, F-67404 Illkirch, France.

<sup>3</sup>Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Université de Strasbourg, IPHC, 25, rue de Becquerel, 67087 Strasbourg, France

Corresponding author: Jean Cavarelli

Email: cava@igbmc.fr

## Abstract

Increasing evidence suggest that Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) is key in reprogramming cells, whether in the tumor reversion process or in acquiring pluripotency. Part of the reprogramming potential of TCTP relies upon its ability to function as a survival factor. Indeed, on one hand, TCTP is antagonizing the p53 tumor suppressor by promoting its degradation and on the other hand it increases the anti-apoptotic potential of Mcl-1 and Bcl-xL. Genetic experiments show that TCTP knockout mice are lethal at E 7.5 with increased apoptosis. Remarkably the heterozygous mice are viable and haplo-insufficient with increased sensitivity to apoptosis. Although previous experiments suggest an interaction between TCTP and Mcl-1 or Bcl-xL, there is no biophysical evidence substantiating stable complexes. In the present study TCTP:Bcl-xL and TCTP:Mcl-1 complexes were purified. Our data suggest that TCTP:Bcl-xL and TCTP:Mcl-1 undergo electrostatic interactions with conformational changes. Exclusion Chromatography coupled to Multi-Angle Laser Light Scattering (SEC-MALLS) and nondenaturing mass spectrometry studies disclosed the formation of heterotetrameric 2:2 complexes. All together, this data provide a model for the function of TCTP based upon the molecular characterization of its interaction with Bcl-xL and Mcl-1.

## Introduction

TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein) is a highly conserved protein in all eukaryotes. It is a multifunctional protein involved in many key biological pathways as cell growth and development [1] [2] [3] [4], DNA damage sensing and repair [5], tumor reversion and cancer [6] [7] [8], and was shown to be a histamine release factor [9] [10]. In recent years, TCTP has attracted most attention on account of its role in tumor reversion and as anti-apoptotic protein. It is a highly significant prognostic factor in breast cancer and regulates both the normal and cancer stem cell compartment. As a major target in cancer, its function was shown to be inhibited by several drugs among which Sertraline and Thioridazine. In the past several months a series of review papers have addressed the different roles of TCTP [11,12,13]. It was shown that TCTP is strongly overexpressed in a variety of tumors and its down-regulation decrease the viability of those cells [14]. TCTP also protects cell from serum deprivation or treatment with etoposide, taxol, or 5-fluorouracil [15] [16,17]. Altogether these results demonstrate that TCTP is a strong anti-apoptotic protein. Several mechanisms have been proposed to explain how TCTP protects cells from death. TCTP could directly reduce cellular stress acting as a calcium scavenger [15] [18] [19], antagonizing p53 [6] [7] [8], protecting against oxidative stress [20] [21] and/or acting directly on the Bcl-2 apoptosis pathway [22] [23] [15] [24]. In favor of the last hypothesis, it was described that TCTP specifically binds to Bcl-2 anti-apoptotic proteins, Mcl-1 and Bcl-xL [22] [16,23]. The physiological relevance of the TCTP:Mcl-1 interaction *in vivo* remain to be establish since TCTP and Mcl-1 are capable of functioning as antiapoptotic proteins independently of each other [15]. TCTP was also showed to inhibit Bax dimerization into the mitochondria membrane [24]. These results emphasize that the molecular mechanism underlying TCTP antiapoptotic activity through the Bcl-2 pathway need to be cleared.

Bcl-2 family members are key regulators of the mitochondrial apoptotic pathway. There are three classes of Bcl-2 proteins: the anti-apoptotic Bcl-2-like proteins (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL, Bcl-W, A1) containing three or four Bcl-2 Homology (BH) domains; the pro-apoptotic Bax-like proteins (Bak, Bax, BOK) containing BH1, BH2 and BH3 domains and pro-apoptotic BH3-only proteins (Bim, Bad, Bid, PUMA, and Noxa) containing only the BH3 domain. The fine tuning of the interaction between pro- and anti apoptotic Bcl-2 protein controls cell fate. A commonly accepted mechanism is that, upon activation, Bak and Bax oligomerized into the mitochondria outer membrane (MOM) and are responsible for MOM permeation (MOMP), release of cytochrome *c*, and subsequent activation of caspase leading to cell death. Bcl-xL, an anti-apoptotic Bcl-2 protein, is found both in the cytosol and attached to the mitochondria outer membrane (MOM) in healthy cells and tissues [25] [26] [27]. Recently it was showed that Bcl-xL, and probably other anti-apoptotic Bcl-2 protein, constantly re-translocate Bax from the mitochondrial membrane to the cytosol. This process might ensure that Bax does not chronically accumulate at the MOM to reach a critical level that could promote its auto-activation [28]. TCTP was shown to inhibit indirectly Bax dimerization into the mitochondrial membrane [24]. It was suggested that TCTP potentiates the function of Mcl-1 and Bcl-xL. However

these complexes were never isolated neither characterized. To further investigate this model we assessed the interaction between TCTP and Mcl-1 and/or Bcl-xL at a molecular level.

In the present study TCTP:Bcl-xL and TCTP:Mcl-1 complexes were purified, isolated and characterized by several biophysical approaches. Using Size Exclusion Chromatography coupled to Multi-Angle Laser Light Scattering (SEC-MALLS) and nondenaturing mass spectrometry we disclose the formation of hetero-tetrameric complexes. All together, these data provide a model for the function of TCTP based upon the first molecular characterization of its interaction with Bcl-xL and Mcl-1.

## Results

### Characterization of molecular complexes between TCTP and Bcl-xL

TCTP interaction with Bcl-xL and Mcl-1 were initially discovered by yeast two hybrid screening, GST-pulldown and overexpression/immunoprecipitation experiments [16] [23] [22] [29]. To gain further insight into these interactions we characterized the TCTP:Bcl-xL and TCTP:Mcl-1 complexes. Mcl-1 and Bcl-xL are similar helical proteins with 8 core alpha helices ( $\alpha 1$ -  $\alpha 8$ )—and one transmembrane helix ( $\alpha 9$ ).  $\alpha 2$ -  $\alpha 5$  and  $\alpha 8$  form a hydrophobic groove into which the BH3 domain of the pro-apoptotic proteins binds (Figure 1.A and 1.B). TCTP structure is unique and consists of three conserved domains through phylogeny: one  $\beta$ -sheet formed by 9  $\beta$ -strands including the short  $\alpha 1$  helix, a helical hairpin formed by two helices ( $\alpha 2$  and  $\alpha 3$ ) and a dynamic loop between the  $\beta 5$  and  $\beta 6$  strands (Figure 1.A).

In this study we used three constructs of Bcl-xL (Bcl-xL $^{\Delta CT}$ , Bcl-xL $^{\Delta 45-84\Delta CT}$  and Bcl-xL $^{\Delta 27-81\Delta CT}$ ) which conserve their BH3 binding properties. Each construct lacks the C-terminal  $\alpha 9$  transmembrane helix ( $\Delta CT$ ) and different lengths of the loop between helices  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  (Figure 1.B): Bcl-xL $^{\Delta CT}$ , Bcl-xL $^{\Delta 45-84\Delta CT}$  (Bcl-xL lacking amino-acids 45-84) and Bcl-xL $^{\Delta 27-81\Delta CT}$  (Bcl-xL lacking amino-acids 27-81). First, we tested the Bcl-xL $^{\Delta 27-81\Delta CT}$  recombinant protein. TCTP and Bcl-xL $^{\Delta 27-81\Delta CT}$  were incubated at 4°C in equimolar ratio and the formation of the complex was assessed by analytical gel filtration. Figure 2.A shows that elution profile of TCTP+Bcl-xL $^{\Delta 27-81\Delta CT}$  mainly superimpose to those of isolated proteins, which suggests that at 4°C no complex is formed. On the contrary, at 30°C, formation of a TCTP:Bcl-xL $^{\Delta 27-81\Delta CT}$  complex is easily detectable as depicted by the appearance of a new peak eluted at a significantly smaller elution volume than for both proteins separately (Figure 2.B). The different fractions loaded on SDS-PAGE disclosed the presence of a hetero-complex between TCTP and Bcl-xL $^{\Delta 27-81\Delta CT}$ . These experiments suggest that the loop between  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  of Bcl-xL is not necessary for its binding to TCTP and that this interaction is promoted at 30°C.

It can be noticed in Figure 2.B that the elution profile of the TCTP:Bcl-xL $^{\Delta 27-81\Delta CT}$  complex is broad and asymmetrical reflecting an heterogeneous composition. We then wondered whether the interaction between TCTP and other Bcl-xL constructs would be more homogenous. Unlike Bcl-xL $^{\Delta 27-81\Delta CT}$ , Bcl-xL $^{\Delta CT}$  can be purified as a mixture of monomer and dimer ([30] [31]). We incubated both partners in a 1:1 ratio at 4°C and 30°C and assessed the formation of a complex by analytical gel filtration. The chromatogram profiles displayed in Figure 2.C reveal similar results as for Bcl-xL $^{\Delta 27-81\Delta CT}$ . At 4°C the elution profile of TCTP + Bcl-xL $^{\Delta 45-84\Delta CT}$  mainly superimposes to those of the separated proteins, while a new peak at a smaller elution volume appears when the sample was incubated at 30°C. SDS-PAGE of the corresponding fractions shows that this new peak contains both proteins validating the

formation a complex between TCTP and Bcl-xL<sup>ΔCT</sup>. Here again heating the sample to 30°C was mandatory to form the complexes.

Compared to Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup>, a smaller portion of TCTP and Bcl-xL<sup>ΔCT</sup> are involved in complex formation. Thus we tested the effect of concentration and protein ratio. Figure 2.D shows the elution profile of TCTP + Bcl-xL<sup>ΔCT</sup> incubated at higher concentration (350μM compared to 100μM in the previous experiment) at 30°C in equimolar conditions. As expected, the elution peak corresponding to the complex TCTP:Bcl-xL<sup>ΔCT</sup> is more intense but a significant proportion of TCTP and Bcl-xL<sup>ΔCT</sup> is still unbound as confirmed by the SDS-PAGE of the corresponding fractions. Figure 4.C displays the elution profile of TCTP+Bcl-xL<sup>ΔCT</sup> incubated at 30°C in a 1:3 molar ratio (150μM TCTP:400μM Bcl-xL<sup>ΔCT</sup>). In those conditions only a small amount of TCTP is still unbound compared to the other experimental conditions. Thus, an excess of Bcl-xL<sup>ΔCT</sup> will have as consequence a shift of the binding equilibrium towards TCTP:Bcl-xL<sup>ΔCT</sup> complex formation. We finally tested the binding capacity of the third Bcl-xL<sup>Δ45-84ΔCT</sup> protein. By taking advantage of above results and incubated TCTP with 3 molar excess of Bcl-xL<sup>Δ45-84ΔCT</sup> at 30°C. Formation of complexes was verified by analytical gel filtration (Figure 2.F). The elution profile shows that compared to separated proteins a new population corresponding to TCTP:Bcl-xL<sup>Δ45-84ΔCT</sup> complex is present. As for Bcl-xL<sup>ΔCT</sup> the majority of TCTP is bound to Bcl-xL<sup>Δ45-84ΔCT</sup>. The same experiment at 4°C does not lead to significant formation of any complex (data not shown).

Several observations can be made from the binding experiments between TCTP and the different constructs of Bcl-xL. TCTP:Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> complex is easier to obtain but presents an heterogeneous population. Conversely TCTP:Bcl-xL<sup>Δ45-84ΔCT</sup> and TCTP:Bcl-xL<sup>ΔCT</sup> complexes require an excess of Bcl-xL but present a more homogeneous population as observed by a more symmetrical elution peak. It can be noticed that while most of the dimeric form of Bcl-xL<sup>ΔCT</sup> and Bcl-xL<sup>Δ45-84ΔCT</sup> disappeared after incubation with TCTP, the absorbance of the monomeric form barely decreases. Combine to the fact that recombinant Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> protein is purified as a dimer (Figure 4.B), this suggest that TCTP interacts preferentially with the dimeric form of Bcl-xL.

#### **TCTP:Bcl-xL complex is stabilized at low ionic strength and alkaline pH.**

To further characterize TCTP:Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> and TCTP:Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> complexes, we tested their dependency on pH and salt concentration. First, we analyzed the formation of each complex at pH 7, 8 and 9 by analytical gel filtration. Figure 3.A presents the elution profiles obtained for TCTP+Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> at different pH. The elution peak corresponding to TCTP:Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> complex decreases between pH9 and pH8 while those corresponding to the individual proteins increase. Almost no

complex is left at pH 7. These results suggest that TCTP:Bcl-xL complex is highly sensitive to pH and is formed at alkaline pH.

We then tested the formation of this complex with increasing amounts of NaCl (50mM and 200mM). Figure 7.B displays the elution profiles obtained for TCTP+ Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> at different ionic strength. At 200mM the elution peak corresponding to TCTP:Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> complex decreases drastically. Those results suggest that high salt concentrations are destabilizing TCTP:Bcl-xL complex.

### **TCTP forms hetero-tetrameric complexes with Bcl-xL.**

We performed Size Exclusion Chromatography coupled to Multi-Angle and Quasi-Elastic Light Scattering (SEC-MALS/QELS). and non-denaturing Mass Spectrometry (MS) on TCTP:Bcl-xL complex to determine their stoichiometry. The SEC-MALS/QELS profiles provide the differential refractive index with the corresponding calculated molecular mass. The SEC-MALS/QELS profile of TCTP+Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> incubated in an equimolar ratio at 30°C (Figure 4.A) shows four populations. Among them the 2 last ones eluted correspond to homo-dimers of Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> and TCTP as confirmed by SEC-MALS/QELS analysis of the individual proteins : homo-dimers of Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> elute with an apparent mass of 36.1 kDa ±0.4% at 13.8 mL and TCTP elutes at 14.1mL with an apparent molecular mass of 20.9kDa±2.9%. These results are in agreement with the expected mass molecular mass of 35.54kDa and 19.651kDa for the homo-dimers of Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> and for monomers of TCTP respectively. The first eluted population has a retention time of 11.5mL associated with an apparent mass of 73.5kDa ±0.1%. This population is consistent with a hetero-tetramer complex containing 2\*TCTP+2\*Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> with an expected molecular mass of 74.8kDa. The second eluted population exhibiting a molecular mass of 45kDa could not be attributed to any complex based on the molecular mass of both proteins.

To examine the composition of the described samples we performed nondenaturing mass spectrometry. Electro-spray ionization mass spectrometry (ESI-MS) is a powerful technique to study non-covalent interactions allying sensitivity to high resolution detection. The reactions were performed at 30°C in equimolar condition. Figure 4.B shows the ESI-MS obtained for TCTP (upper panel), Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> (middle panel) and TCTP+Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> (lower panel) under nondenaturing condition. On the ESI-MS of TCTP+Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> two populations of m/z peaks corresponding to multiple charged ions are observed in addition to the populations corresponding to monomers and homo-dimers. The main population has a calculated molecular mass of 74907 ±2 Da corresponding to the expected molecular mass of 2\*TCTP+2\*Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> (74846 Da) and corroborating SEC-MALS/QELS results. The other population is in minority and exhibit a molecular mass of 55252 ±2 Da in agreement with the expected molecular mass of 2\*TCTP+1\*Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> (55194 Da). This could correspond to the unidentified population of 45kDa obtained with SEC-MALS/QELS. For both series the additional mass of 61Da and 58Da respectively results from the presence of cobalt used during recombinant purification of Bcl-xL<sup>Δ27-84ΔCT</sup>.

Using non-denaturing mass-spectrometry we wondered whether Bcl-xL<sup>Δ45-84ΔCT</sup> and Bcl-xL<sup>Δ27-84ΔCT</sup> interaction with TCTP would exhibit the same stoichiometry within the same experimental conditions (equimolar, 100μM). Nondenaturing ESI mass spectrum of TCTP+Bcl-xL<sup>Δ45-84ΔCT</sup> shows the presence several populations (Figure 4.C). Majority of TCTP and Bcl-xL<sup>Δ45-84ΔCT</sup> are still unbound and are responsible for most of the signal. These results are coherent with the analytical gel filtration profile where in equimolar condition and at 100uM, most of proteins are still unbound. However three populations corresponding to hetero-complexes with molecular mass of 39229Da, 58881Da and 78461 ±1 Da are detected. Those results are consistent with 1\*TCTP+1\*Bcl-xL<sup>Δ45-84ΔCT</sup> (39229Da), 2\*TCTP+1\*Bcl-xL<sup>Δ45-84ΔCT</sup> (58881Da) and 2\*TCTP+2\*Bcl-xL<sup>Δ45-84ΔCT</sup> (78458Da) hetero-complexes respectively. Of interest, except for the 2\*TCTP+2\*Bcl-xL complexes, Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> and Bcl-xL<sup>Δ45-84ΔCT</sup> exhibit two additional stoichiometry with TCTP. 1\*TCTP+1\*Bcl-xL<sup>Δ45-84ΔCT</sup> and 2\*TCTP+1\*Bcl-xL<sup>Δ45-84ΔCT</sup> could be seen as intermediates whether in the assembly or the disassembly process of TCTP:Bcl-xL complex, reflecting a lower affinity of TCTP for Bcl-xL<sup>Δ45-84ΔCT</sup> than for Bcl-xL<sup>Δ27-84ΔCT</sup>. As the main difference between Bcl-xL<sup>Δ45-84ΔCT</sup> and Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> is that Bcl-xL<sup>Δ27-84ΔCT</sup> is in majority a dimer and Bcl-xL<sup>Δ45-84ΔCT</sup> a monomer, one can suggest that TCTP preferably interact with dimers.

All together, analyzes of TCTP:Bcl-xL complexes indicate the formation of hetero-tetramers.

### Determination of the binding interface between TCTP and Bcl-xL

We then focus in determining the binding interface between TCTP and Bcl-xL. Based on the high efficiency of the formation of TCTP:Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> complex, we used the construction of Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup>. We tested the binding capacity of two mutants previously described in the literature, one mutant of TCTP (TCTP-R21A) and another one of Bcl-xL (Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup>-Y101K). TCTP-R21A mutation was previously shown to specifically abrogate the interaction between TCTP and Mcl-1 [23]. We wonder if that mutation could equally affect the binding between TCTP and Bcl-xL. TCTP-R21A was incubated with Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> in an equimolar ratio at 30°C and formations of hetero-complexes were checked by non-denaturing mass-spectrometry. As shown in the Figure 5, third panel, m/z population corresponding to hetero-complexes completely disappear. As for Mcl-1, the residue R21 of TCTP is essential for its interaction with Bcl-xL confirming the N-terminal part of TCTP is involved in the binding interface.

Except for its interaction with p53, Bcl-xL interacts with its partners through its BH3 groove. To test whether the BH3-groove of Bcl-xL is involved in the interaction between TCTP and Bcl-xL, we used Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup>-Y101K mutant. Residue Y101 is located in the BH3-groove of Bcl-xL, at the C-terminus of α2 helix; its mutation into lysine does not alter the folding of Bcl-xL but specifically abrogates its

interaction with BH3 domains [32]. We incubated Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup>-Y101K and TCTP in an equimolar ratio at 30°C and analysed it by nondenaturing mass spectrometry. Here again, no hetero-complexes were detected (Figure 5, second panel), strongly supporting that Bcl-xL BH3-groove is implicated in the formation of hetero-tetramers with TCTP. To comfort this result we thought to observe if ABT-737 would compete with TCTP:Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> interaction. ABT-737 is a BH3-mimetic that induces apoptosis by inhibiting pro-survival Bcl-2 proteins and is used as a novel anticancer drug. ABT-737 specifically targets the BH3-groove of Bcl-2, Bcl-xL and Bcl-W with high affinity but is unable to engage Mcl-1 [33] [34]. Thus we followed by nondenaturing mass spectrometry the effect of increasing amount of ABT-737 on TCTP:Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> complexes. As it can be observed on Figures 5 (lower panel), the presence of ABT-737 (0μM, 5μM, 50μM) correlates with the decreasing of m/z peaks corresponding to hetero-complexes between TCTP and Bcl-xL and the apparition of m/z series corresponding to Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup>-ABT-737 complexes. A 10 excess of ABT-737 completely abrogate TCTP:Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> complexes meaning TCTP and ABT-737 compete for interacting with Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup>. This result and the fact that the mutation Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup>-Y101K, located in the BH3-groove of Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup>, does not bind to TCTP converge toward a binding of TCTP with the BH3-groove of Bcl-xL.

### Characterization of molecular complexes between TCTP and Mcl-1

TCTP was also shown to interact with Mcl-1 [22,23]. As Bcl-xL, Mcl-1 is an anti-apoptotic member of the Bcl-2 family. Although Mcl-1 and Bcl-xL share similar structure and function, differences can be underlined. One major feature is the differential targeting by their BH3-Only ligands [35] which can be explained by subtle differences in the sequence and structure of their BH3-groove [35 ,36 ,37 ,38]. We wondered if TCTP would interact with Mcl-1 with the same biochemical characteristic and stoichiometry than with Bcl-xL.

We used a similar approach as for TCTP:Bcl-xL complex to first isolate and then characterize a complex between TCTP and Mcl-1. We used a recombinant Mcl-1 protein lacking both, the unfolded N-terminal part and the C-terminal transmembrane helix (Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup>) (Figure 1.B). This protein is commonly used in structural studies of Mcl-1. TCTP and Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> were incubated in equimolar amounts (40μM) at 4°C and 30°C and further analyzed by analytical gel filtration. At 4°C, unlike Bcl-xL, a small but significant elution peak appears at a smaller elution volume than isolated proteins TCTP and Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> (Figure 6.A). At 30°C however the intensity of this peak was significantly higher (Figures 7.A and 7.B). The corresponding fractions loaded on SDS-PAGE contain both proteins TCTP and Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> corroborating the formation of a TCTP: Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> hetero-complexes. These results confirm a direct interaction between TCTP and Mcl-1.

We then wanted to determine if TCTP:Mcl-1 complex is also sensitive to pH and ionic strength. TCTP+Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> was incubated at 30°C in equimolar ratio at pH 7, 8 and 9 and formation of TCTP: Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> were analyzed by analytical gel filtration. As show on Figure 7.C, elution profiles do not change significantly between pH 9 and 8 as most of TCTP and Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> are bound to each other. At pH 7 however, only a small fraction contains TCTP:Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> complex, most of TCTP and Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> eluting as separated proteins. We tested the formation of TCTP:Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> complex at 200mM NaCl (Figure 7.D). Elution profiles corresponding to TCTP+Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> at 50mM NaCl clearly show a complex TCTP:Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> while at 200mM most of TCTP and Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> elute as isolated proteins. As TCTP:Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup>, TCTP:Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> complex is not stable at physiological pH and high ionic strength.

In light of the result obtain for TCTP:Bcl-xL complexes we performed SEC-MALLS to establish TCTP:Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> complex stoichiometry. TCTP+ Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> were incubated at 30°C in equimolar ratio before analysis. The differential refractive index profile of the complex shown in Figure 7.E reveals the presence of one homogeneous and preponderant population eluting at 11.5mL with an apparent mass of 71kDa. Considering that neither TCTP nor Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> elute at 11.5mL, this mass is coherent with a 2\*TCTP + 2\*Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> hetero-complex of an expected molecular mass of 75.369kDa.

However to obtain relevant signal corresponding to the complex TCTP:Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup>, sample had to be concentrated at 250μM (instead of 40μM) and lower ionic strength (25mM NaCl). When analyzed with nondenaturing mass spectrometry, dilution of the sample to a final concentration of 5μM for analysis led to the dissociation of the majority of the complex. Thus 3 populations of hetero-complexes could be detected with molecular weight of 37686Da, 57339 ± 1Da and 75435±1Da corresponding to 1\*TCTP+1\*Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> (37684.5Da), a 2\*TCTP+1\*Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> (57335.5Da) and a 2\*TCTP+2\*Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> (75369Da) complexes respectively. It can be noticed a high similarity between TCTP:Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> and TCTP:Bcl-xL<sup>Δ45-84ΔCT</sup> complexes. In both case complex formation can be increased or stabilized with higher concentration and intermediates toward the assembly or dissociation of a hetero-tetramer complexes could be detected by non-denaturing mass-spectrometry. These results might also reflect a lower affinity between TCTP and monomeric form of Bcl-2 proteins.

To conclude we showed that TCTP form hetero-tetramers with Bcl-xL and that this interaction involved the N-terminal part of TCTP and the BH3-groove of Bcl-xL. This interaction requires passing an energetic barrier to be stable and observed by gel filtration, it involves electrostatic interactions and is favored at alkaline pH. Very close conditions were observed for the formation of hetero-tetramers between TCTP and Mcl-1.

## Discussion

TCTP is highly conserved through the eukaryotic kingdom and it was studied in diverse organisms ranging from yeast, plants, *Drosophila*, mice and humans. TCTP is interacting with a wide variety of proteins implicated in different biological processes. It was most extensively studied in its secreted form, in allergic disease, where it functions as a Histamine Releasing Factor (HRF). In its intracellular function TCTP was found to be implicated in different aspects of phenotypic reprogramming; initially discovered in tumor reversion and more recently, in development and pluripotency. TCTP interacts with a series of oncogenic pathways, developmentally regulated genes and tumor suppressor genes. Indeed, TCTP was shown to interact with components of the mTOR pathway, the p53-MDM2-Numb axis, oct4 and nanog and the Bcl-2 anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-xL. Although some of these interactions have been validated by genetic studies in *Drosophila* or mice (such as the mTOR pathway and the p53 pathway) and were shown to be of high relevance in patients with breast cancer and in regulating the normal and cancer stem cell compartment, we still do not understand how TCTP functions at the molecular level. Up to now there is no structural or biophysical data available for TCTP in complex with other proteins and such data could be potentially interesting in providing better insight into the function of TCTP.

In this study we focus on deciphering TCTP interaction the Bcl-2 anti-apoptotic proteins with Mcl-1 and Bcl-xL in order to bring insight on the molecular mechanism by which TCTP is involved in apoptosis. Bcl-2 proteins family is well known to regulate apoptosis through their own network of interactions, however increasing numbers of interactions between Bcl-2 proteins and non-Bcl2 proteins have been reported (Reviewed in [39]). For example biophysical and structural analysis were provided for Bcl-xL with beclin, cytochrome c, p53 and VDAC. Mcl-1 was also found to interact with PCNA and MULE, an E3 ubiquitine ligase [40] [41] [42] [43] [44] [45]. Considering these findings, and the fact that TCTP is an anti-apoptotic protein, its binding with anti-apoptotic Bcl-2 family proteins Mcl-1 and Bcl-xL could be biologically relevant [22] [16] [23]. In this study we provide the first biochemical and biophysical analysis of TCTP in complex with Bcl-xL and Mcl-1.

Interestingly, using SEC-MALS/QELS and non-denaturing mass spectrometry we demonstrated that TCTP forms hetero-tetramers with Bcl-xL or Mcl-1. Six models of heterotetramers can be suggested and are illustrated on Figure 7.A: two monomers of Bcl-xL or Mcl-1 binding to a dimer of TCTP (models a and b), 2 hetero-dimers binding to each other (models c and d), two monomers of TCTP binding to a dimer of Bcl-xL or Mcl-1 (models e and f). One way to discriminate would be to take in account the other forms of hetero-complexes detected by non-denaturing mass-spectrometry as they could be seen as intermediates in the assembly or disassembly of hetero-tetramers. With monomeric Bcl-xL (Bcl-xL<sup>Δ45-84ΔCT</sup>) and Mcl1 (Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup>), intermediates as heterodimer and heterotrimers consisting of 2 molecules of TCTP plus one molecule of Mcl-1 or Bcl-xL were detected in agreement with the formation of the models a, b, c, d e. However, with dimers of Bcl-xL (Bcl-xL<sup>Δ27-</sup>

<sup>81ΔCT</sup>) trimers formed by 2 molecules of Bcl-xL and one molecule of TCTP were observed in agreement with models d, f, g. Another way to discriminate would be to consider *in vivo* data. The fact that Bcl-xL is found as a homodimer in the cytosol is compatible with model c, e and f. On the other hand TCTP can also form dimers and it was found that the dimerization of TCTP was necessary for its implication in allergy as a cytokine is favoring model a, b and c [10] [46]. Furthermore if we consider that Mcl-1 was never seen as homo-dimers model a, b and d would fit better.

Models c, d, e and f would require 2 distinct binding sites on Mcl-1 and Bcl-xL molecules, one for homo-dimerization and another one for hetero-dimerization. Bcl-2 proteins display a second binding interface. For instance P53 interacts with a different binding site of Bcl-xL. It is therefore important to assess whether the BH3 groove is involved in TCTP:Bcl-xL and TCTP:Mcl-1 complexes. Here we observed that the mutant Y101K of Bcl-xL does not interact with TCTP. This residue, located at the end of the  $\alpha 2$  helix (Figure 7.B, middle panel), is part of the BH3 groove and was previously shown to abrogate the interaction with BH3 peptides [32]. This and the fact that the BH3 mimetic ABT-737 competes with TCTP in the binding with Bcl-xL lead to the conclusion that TCTP bind the hydrophobic BH3-groove of Bcl-xL (Figure 7.B, right panel). It should be noticed that our study also indicates that there is an electrostatic interaction for both complexes, TCTP:Bcl-xL and TCTP:Mcl-1 which is quite weak at physiological ionic strength. A similar situation has been previously described between Bcl-xL and Bak with P53 and between Bcl-xL and cytochrome c [42] [45].

Since complex formation is temperature dependent, this indicates the need to overcome an energetic barrier potentially rendering the proteins more flexible in reorganizing their conformation. Conformational changes might involve either the anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-xL and/or TCTP. Structural reorganization in the Bcl-2 family of proteins was extensively studied. Bcl-xL was shown to form a swapped dimer under high alkaline pH or after heating at temperature above 50°C [31], within close condition to those observed in the present study to promote their binding with TCTP. The structure of this dimer showed an elongated dimer presenting a swap of the core helices  $\alpha 5$ - $\alpha 6$  while preserving the two hydrophobic BH3-groove binding sites (Figure 7.C) [30] [31]. Hence, TCTP could interact with a swapped-dimer of Bcl-xL. Unlike Bcl-xL, no homo-dimerisation or protein swapping of Mcl-1 has been reported. However, it becomes clear from recent studies that swapping and/or conformational changes in the Bcl-2 family protein are common. Other examples of conformational changes in the Bcl2 family are Bax reorganization upon BH3 binding and Bcl-w dimer  $\alpha 3$ - $\alpha 4$  swap [47] [48] [49]. Regarding TCTP, previous studies identified its N-terminal part interacting with Bcl-xL and Mcl-1. More specifically it was found that the mutation R21A of TCTP abrogates the interaction with Mcl-1 and the first 20 to 27 amino acids of TCTP are critical for its interaction with Bcl-xL. In the present work we also observed that TCTP-R21A mutant does not bind to Mcl-1. Based on the structure of TCTP (Figure 7.B, left panel), this would implicate a complete restructuring of its hydrophobic core. The temperature and alkaline pH might allow such structural modulation to promote TCTP binding to its partner proteins. 3D resolution structure will be necessary to bring new insight on structural change within these complexes.

*In vivo*, change in structural conformation can be initiated via membrane association or implication in higher complex structures. One can imagine that TCTP interaction with anti-apoptotic proteins are membrane associated as it was shown that TCTP impede Bax oligomerization into membrane although without direct binding [24]. However the precise localization where TCTP interact with anti-apoptotic protein is still unclear. Yeast orthologue of TCTP, Mmi1, was shown to translocate to the mitochondria upon induction of apoptosis [50]. On the contrary, localization of TCTP in normal and cancer cell is mainly cytoplasmic and nuclear and partial co-localization of TCTP and Mcl-1 was observed in the cytosol [51] [52] [17,22]. Further investigation concerning the role of mitochondria membrane and lipid on TCTP binding to Bcl-xL and Mcl-1 would be an asset. Protein association can also lead to conformational changes as observed in the case of Bid binding to Bax[49]. Interestingly, p53 binds to Bcl-xL and TCTP, it would be of interest to test whether a complex involving those three proteins exist and if it includes conformational changes.

Gaidist et al. showed TCTP and Mcl-1 can independently protect U2O2S cells from 5-fluorouracil-induced cytotoxicity [29]. The authors suggest the biological significance of TCTP interaction with Mcl-1 may be it increases cellular resistance to apoptosis. This hypothesis could be extended to the TCTP Bcl-xL interaction. One interesting point of our study is that Bcl-xL and Mcl-1 interaction with TCTP are favored in alkaline pH. During apoptosis, early and transient alkalinization up to pH 8 precede acidification of the cytosol [53] [54] [55]. In the same line than Gaidist et al. it might be that TCTP interaction with Bcl-xL and Mcl-1 are tighter during this early physiological change to avoid inappropriate apoptosis, meaning TCTP would act as a safeguard. The fact that cancer cells present a “reverse pH gradient” supports this hypothesis (review in [56]). Putting together that cancer cells intracellular pH is higher than normal cell with  $\text{pH} \geq 7.4$  and that TCTP is overexpressed in numerous cancer cell lines and silencing of the gene decrease their viability [17] [14] [7] one can guess that TCTP interaction with Bcl-xL and/or Mcl-1 are maintained in tumoral cells and these interactions impede apoptosis. All together these data bring a new molecular mechanism of action of TCTP as an anti-apoptotic protein. TCTP is already a used as a target in cancer therapy, this new mechanism point out the interest of having more molecular information on these interactions and particularly an atomic resolution to design new series of potentiate anti-tumor molecules.

## Materials and methods

*Expression construct and Mutagenesis.* The cDNA of human Bcl-xL, target gene bank number BC019307, was ordered from PlasmID (DANA-FARBER/HARVARD CANCER CENTER). For expression as a GST-fusion protein TCTP was cloned into a pHGGWA plasmid [57] using the Gateway™ Technology (Invitrogen and amplified by PCR with primers 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCATGATTATCTACCGGGACCTC-3'

and 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAACATTTTCCATTCTAAACCATCC-3' and cloned into a pDONR207 plasmid by BP reaction then subcloned into pHGGWA plasmid by LR reaction as described in [57]. The point mutation in TCTP -R21A was introduced by PCR using the following primers 5'-ATCTACAAGATCGCTGAGATCGCG-3' and 5'-CGCGATCTCAGCGATCTTGATAGAT-3' and cloned into a pNEA-TH plasmid using *NdeI* and *BamHI* restriction sites for expression of an N-terminal 6His fusion protein [58]. Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> (deletion of the N-terminal 170 residues and the C-terminal 24 residues) was amplified using primers 5'-GGATATCCATATGGACGAGTTGTACCGGCAGTC-3' and 5'-CGCGGATCCCTAACCTTCTAGGTCCTCTACATG-3' and cloned into pNEA-VHM plasmid [58] for expression as a N-Terminal 6His-MBP fusion protein. Bcl-xL<sup>ΔCT</sup> (deletion of the C-terminal 24 residues) and Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup> (deletion of the residues 27-81 and C-terminal 24 residues) were cloned in the pNEA-TH [58] plasmid for expression as N-terminal 6His fusion proteins. Primers used for Bcl-xL<sup>ΔCT</sup> are 5'-GGATATCCATATGTCTCAGAGCAACCGGG-3' and 5'-GGATATCTTCATTTCCGACTGAAGAGTGAG-3', and include a *NdeI* and a *BglII* restriction sites respectively. Deletion of the residues 27 to 81 were obtained by annealing two PCR fragments one containing the fragment 1-26 and the other the fragment 81-209. Additional primers were used, 5'-CTGCTGCCATCTGACTCCAG-3' and 5'-CTGGAGTCAGATGGCAGCAG-3', as a junction between amino-acids 26 and 81. The point mutant of Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup>-Y101K was introduced by PCR using the primers 5'-CGACGAATTTGAACTGCGGAAACGGCGGGCATTTCAGTGAC-3' and 5'-GTCACTGAATGCCCGCCGTTTCCGCAGTTCAAATTCGTCCG-3'.

*Protein expression and Purification.* Each construct was expressed in *Escherichia Coli* strain BL21 (DE3) pRARE. For protein production 1L of 2LB (Luria Bertani) medium were inoculated at OD<sub>600</sub> of 0.1 by overnight pre-culture at 37°C and culture were grown until the OD<sub>600</sub> was between 0.6-0.8. The soluble fraction of proteins (TCTP -R21A, Bcl-xL<sup>DCT</sup>, Bcl-xL<sup>D27-81DCT</sup> and Bcl-xL<sup>D27-81DCT</sup>-Y101K) was passed in a TALON His-Tag affinity column (Clontech). Beads were washed with lysis buffer, and the targeted protein was cleaved from the column using thrombin. Bcl-xL was further purified using ion exchange (HiTrap Q-HP, GE Healthcare) and size exclusion (HiLoad Superdex S200, GE Healthcare) chromatography. TCTP -R21A was purified using only size exclusion (HiLoad Superdex S200, GE Healthcare) chromatography. The soluble fraction of GST-TCTP was affinity purified on glutathione-agarose (Thermo Scientific Pierce), washed with lysis buffer containing 2M NaCl then equilibrated with lysis buffer. Intact GST fusion protein was eluted from the affinity resin using 10mM reduced glutathione then cleaved by TEV protease overnight at 30°C. Cleaved GST was removed by incubation with glutathione-agarose (Thermo Scientific Pierce) affinity column and the flowthrough containing

TCTP was further purified using ion exchange (HiTrap Q-HP, GE Healthcare) and size exclusion (HiLoad Superdex S200, GE Healthcare) chromatography. The soluble fraction of 6His-MBP-Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> was supplemented with 20mM imidazole and passed in a nickel-sepharose ( )??? affinity column. Intact protein was eluted with 250mM imidazole and further purified on a using ion exchange (HiTrap Q-HP, GE Healthcare) column before digestion with TEV protease overnight at 4°C. TEV protease was removed by an ion exchange (HiTrap Q-HP, GE Healthcare), the flowthrough were collected and charged on size exclusion (HiLoad Superdex S200, GE Healthcare) chromatography. The quality of the purified proteins was assessed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. The purified proteins were dialyzed against 10mM Tris-HCl, pH 8, 50mM NaCl, 1mM DTT, flash frozen and stored at -20°C.

*Interaction experiments:* When not specified, proteins tested for binding experiments were mixed at 100mM, dialyzed against 10mM CHES, pH 9, 50mM NaCl, 1mM DTT or TCEP depending of the analysis and heated overnight at 30°C.

*Gel filtration.* For binding experiment, 100μL to 200μL of protein mixture were loaded on analytical gel filtration (S200, GE Healthcare) column and elution profiles were measured by UV absorption at 280nm.

Size-Exclusion Chromatography coupled to Multi-Angle and Quasi-Elastic Light Scattering (SEC-MALS/QELS). SEC-MALS/QELS experiments were performed on a multi-angle light scattering detector (miniDAWN TREOS, Wyatt Technologies) coupled in-line with SEC and an interferometric refractometer (Optilab T-rEX, Wyatt Technologies). A Superdex S200 10/300 GL column (total volume 24 mL, GE Healthcare) with a flow rate of 0.5 mL/min were used to separate the sample before performing the MALS/QELS measurement. Experiments were done with 90 μL protein sample at concentrations 100μM in 10 mM CHES pH 9, 50 mM NaCl or 250μM in 10 mM Tris pH 8, 25 mM NaCl for Bcl-xL<sup>Δ27-81ΔCT</sup>+TCTP and Mcl-1<sup>ΔNTΔCT</sup> + TCTP respectively. For the MALS experiments, the molar mass was determined by construction of Debye plot using Zimm formalism (plot of  $K*c/R(\theta)$  as a function of  $\sin^2(\theta/2)$ ) at 0.5 and 1 sec data interval, for Agilent Bio-SEC-3 and Superdex S200 column, respectively. The analysis of the data was performed using the ASTRA 5.3.4 software (Wyatt Technologies).

## References

1. Hsu YC, Chern JJ, Cai Y, Liu M, Choi KW (2007) *Drosophila* TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. *Nature* 445: 785-788.
2. Chen Z, Zhang H, Yang H, Huang X, Zhang X, et al. (2007) The expression of AmphiTCTP, a TCTP orthologous gene in amphioxus related to the development of notochord and somites. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 147: 460-465.
3. Kubiak JZ, Bazile F, Pascal A, Richard-Parpaillon L, Polanski Z, et al. (2008) Temporal regulation of embryonic M-phases. *Folia Histochem Cytobiol* 46: 5-9.
4. Brioude F, Thierry AM, Chambrier P, Mollereau B, Bendahmane M (2010) Translationally controlled tumor protein is a conserved mitotic growth integrator in animals and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 16384-16389.
5. Zhang J, de Toledo SM, Pandey BN, Guo G, Pain D, et al. (2012)  
) Role of the translationally controlled tumor protein in DNA damage sensing and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E926-933.
6. Rho SB, Lee JH, Park MS, Byun H-J, Kang S, et al. (2011) Anti-apoptotic protein TCTP controls the stability of the tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 585: 29-35.
7. Tuynder M, Fiucci G, Prieur S, Lespagnol A, Géant A, et al. (2004) Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15364-15369.
8. Amson R, Pece S, Lespagnol A, Vyas R, Mazarrol G, et al. (2012) Reciprocal repression between P53 and TCTP. *Nat Med* 18: 91-99.
9. MacDonald SM, Rafnar T, Langdon J, Lichtenstein LM (1995) Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science* 269: 688-690.
10. Kim M, Maeng J, Lee K (2012) Dimerization of TCTP and its clinical implications for allergy. *Biochimie*.
11. Macdonald SM (2012) Potential role of histamine releasing factor (HRF) as a therapeutic target for treating asthma and allergy. *J Asthma Allergy* 5: 51-59.
12. Koziol MJ, Gurdon JB (2012) TCTP in development and cancer. *Biochem Res Int* 2012: 105203.
13. Amson R, Pece S, Marine JC, Di Fiore PP, Telerman A (2012) TPT1/ TCTP-regulated pathways in phenotypic reprogramming. *Trends Cell Biol* 23: 37-46.
14. Tuynder M, Susini L, Prieur S, Besse S, Fiucci G, et al. (2002) Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14976-14981.

15. Graidist P, Yazawa M, Tonganunt M, Nakatomi A, Lin CC, et al. (2007) Fortilin binds Ca<sup>2+</sup> and blocks Ca<sup>2+</sup>-dependent apoptosis in vivo. *Biochem J* 408: 181-191.
16. Yang Y, Yang F, Xiong Z, Yan Y, Wang X, et al. (2005) An N-terminal region of translationally controlled tumor protein is required for its antiapoptotic activity. *Oncogene* 24: 4778-4788.
17. Li F, Zhang D, Fujise K (2001) Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. *J Biol Chem* 276: 47542-47549.
18. Sanchez JC, Schaller D, Ravier F, Golaz O, Jaccoud S, et al. (1997) Translationally controlled tumor protein: a protein identified in several nontumoral cells including erythrocytes. *Electrophoresis* 18: 150-155.
19. Haghighat NG, Ruben L (1992) Purification of novel calcium binding proteins from *Trypanosoma brucei*: properties of 22-, 24- and 38-kilodalton proteins. *Mol Biochem Parasitol* 51: 99-110.
20. Lucibello M, Gambacurta A, Zonfrillo M, Pierimarchi P, Serafino A, et al. (2011) TCTP is a critical survival factor that protects cancer cells from oxidative stress-induced cell-death. *Exp Cell Res* 317: 2479-2489.
21. Nagano-Ito M, Banba A, Ichikawa S (2009) Functional cloning of genes that suppress oxidative stress-induced cell death: TCTP prevents hydrogen peroxide-induced cell death. *FEBS Lett* 583: 1363-1367.
22. Liu H, Peng HW, Cheng YS, Yuan HS, Yang-Yen HF (2005) Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. *Mol Cell Biol* 25: 3117-3126.
23. Zhang D, Li F, Weidner D, Mnjayan ZH, Fujise K (2002) Physical and functional interaction between myeloid cell leukemia 1 protein (MCL1) and Fortilin. The potential role of MCL1 as a fortilin chaperone. *J Biol Chem* 277: 37430-37438.
24. Susini L, Besse S, Duflaut D, Lespagnol A, Beekman C, et al. (2008) TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. *Cell Death Differ* 15: 1211-1220.
25. Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, et al. (2003) Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 17: 1475-1486.
26. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ (1997) Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3668-3672.
27. Hausmann G, O'Reilly LA, van Driel R, Beaumont JG, Strasser A, et al. (2000) Pro-apoptotic apoptosis protease-activating factor 1 (Apaf-1) has a cytoplasmic localization distinct from Bcl-2 or Bcl-x(L). *J Cell Biol* 149: 623-634.
28. Edlich F, Banerjee S, Suzuki M, Cleland MM, Arnoult D, et al. (2011) Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell* 145: 104-116.

29. Graidist P, Phongdara A, Fujise K (2004) Antiapoptotic protein partners fortilin and MCL1 independently protect cells from 5-fluorouracil-induced cytotoxicity. *J Biol Chem* 279: 40868-40875.
30. O'Neill JW, Manion MK, Maguire B, Hockenbery DM (2006) BCL-XL dimerization by three-dimensional domain swapping. *J Mol Biol* 356: 367-381.
31. Denisov AY, Sprules T, Fraser J, Kozlov G, Gehring K (2007) Heat-induced dimerization of BCL-xL through alpha-helix swapping. *Biochemistry* 46: 734-740.
32. Minn AJ, Kettlun CS, Liang H, Kelekar A, Vander Heiden MG, et al. (1999) Bcl-xL regulates apoptosis by heterodimerization-dependent and -independent mechanisms. *EMBO J* 18: 632-643.
33. Zhai D, Jin C, Satterthwait AC, Reed JC (2006) Comparison of chemical inhibitors of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cell Death Differ* 13: 1419-1421.
34. Lee EF, Czabotar PE, Smith BJ, Deshayes K, Zobel K, et al. (2007) Crystal structure of ABT-737 complexed with Bcl-xL: implications for selectivity of antagonists of the Bcl-2 family. *Cell Death Differ* 14: 1711-1713.
35. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, et al. (2005) Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 17: 393-403.
36. Day CL, Chen L, Richardson SJ, Harrison PJ, Huang DC, et al. (2005) Solution structure of prosurvival Mcl-1 and characterization of its binding by proapoptotic BH3-only ligands. *J Biol Chem* 280: 4738-4744.
37. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR (2010) The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 37: 299-310.
38. Fire E, Gulla SV, Grant RA, Keating AE (2010) Mcl-1-Bim complexes accommodate surprising point mutations via minor structural changes. *Protein Sci* 19: 507-519.
39. Beverly LJ (2012) Regulation of anti-apoptotic BCL2-proteins by non-canonical interactions: the next step forward or two steps back? *J Cell Biochem* 113: 3-12.
40. Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X (2005) Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* 121: 1085-1095.
41. Fujise K, Zhang D, Liu J, Yeh ET (2000) Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* 275: 39458-39465.
42. Sot B, Freund SM, Fersht AR (2007) Comparative biophysical characterization of p53 with the proapoptotic BAK and the anti-apoptotic BCL-xL. *J Biol Chem* 282: 29193-29200.

43. Oberstein A, Jeffrey PD, Shi Y (2007) Crystal structure of the Bcl-XL-Bcl-1 peptide complex: Bcl-1 is a novel BH3-only protein. *J Biol Chem* 282: 13123-13132.
44. Malia TJ, Wagner G (2007) NMR structural investigation of the mitochondrial outer membrane protein VDAC and its interaction with antiapoptotic Bcl-xL. *Biochemistry* 46: 514-525.
45. Yadaiah M, Rao PN, Harish P, Bhuyan AK (2007) High affinity binding of Bcl-xL to cytochrome c: possible relevance for interception of translocated cytochrome c in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1774: 1370-1379.
46. Kim M, Min HJ, Won HY, Park H, Lee JC, et al. (2009) Dimerization of translationally controlled tumor protein is essential for its cytokine-like activity. *PLoS One* 4: e6464.
47. Gavathiotis E, Reyna DE, Davis ML, Bird GH, Walensky LD BH3-triggered structural reorganization drives the activation of proapoptotic BAX. *Mol Cell* 40: 481-492.
48. Lee EF, Dewson G, Smith BJ, Evangelista M, Pettikiriachchi A, et al. Crystal structure of a BCL-W domain-swapped dimer: implications for the function of BCL-2 family proteins. *Structure* 19: 1467-1476.
49. Czabotar PE, Westphal D, Dewson G, Ma S, Hockings C, et al. (2013) Bax Crystal Structures Reveal How BH3 Domains Activate Bax and Nucleate Its Oligomerization to Induce Apoptosis. *Cell* 152: 519-531.
50. Rinnerthaler M, Jarolim S, Heeren G, Palle E, Perju S, et al. (2006) MMI1 (YKL056c, TMA19), the yeast orthologue of the translationally controlled tumor protein (TCTP) has apoptotic functions and interacts with both microtubules and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1757: 631-638.
51. Arcuri F, Papa S, Carducci A, Romagnoli R, Liberatori S, et al. (2004) Translationally controlled tumor protein (TCTP) in the human prostate and prostate cancer cells: expression, distribution, and calcium binding activity. *Prostate* 60: 130-140.
52. Ma YP, Zhu WL (2012) Cytoplasmic and nuclear localization of TCTP in normal and cancer cells. *Biochem Res Int* 2012: 871728.
53. Furlong IJ, Ascaso R, Lopez Rivas A, Collins MK (1997) Intracellular acidification induces apoptosis by stimulating ICE-like protease activity. *J Cell Sci* 110 ( Pt 5): 653-661.
54. Grenier AL, Abu-ihweij K, Zhang G, Ruppert SM, Boohaker R, et al. (2008) Apoptosis-induced alkalinization by the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1 is mediated through phosphorylation of amino acids Ser726 and Ser729. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C883-896.
55. Khaled AR, Kim K, Hofmeister R, Muegge K, Durum SK (1999) Withdrawal of IL-7 induces Bax translocation from cytosol to mitochondria through a rise in intracellular pH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14476-14481.

56. Webb BA, Chimenti M, Jacobson MP, Barber DL (2011) Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nat Rev Cancer* 11: 671-677.
57. Busso D, Delagoutte-Busso B, Moras D (2005) Construction of a set Gateway-based destination vectors for high-throughput cloning and expression screening in *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 343: 313-321.
58. Diebold ML, Fribourg S, Koch M, Metzger T, Romier C (2011) Deciphering correct strategies for multiprotein complex assembly by co-expression: application to complexes as large as the histone octamer. *J Struct Biol* 175: 178-188.

**Figure 1: Constructions of TCTP, Bcl-xL and Mcl1.** A) Cartoon representation of Bcl-xL (Left panel, PDB entry 1R2D), Mcl-1 (Middle panel, PDB entry 1WSX) and TCTP (Right panel, PDB entry 1YZ1). The BH3 groove binding to BH3-only Bcl-2 proteins, colored in orange, contains the C-terminal part of  $\alpha 2$ , helices  $\alpha 3$ - $\alpha 4$ , the N-terminal part of  $\alpha 5$  and the helix  $\alpha 8$ . B) Schematic representation of the Bcl-xL and Mcl-1 construction used in this study. Bcl-xL-WT is a 233 amino-acid protein consisting, of 9 helices ( $\alpha 1$ - $\alpha 9$ ), represented in cylinders, an Unfolded Domain (UD) and a Terminus Membrane Domain (TMD) formed by helix  $\alpha 9$ . Each construct lacks the TMD domain (residues 2010-233) and contain different length of the UD domain. Bcl-xL $\Delta$ ACT contain the full UD, Bcl-xL $\Delta$ 45-84- $\Delta$ ACT lacks the residues 45-84 in addition to the UMD, Bcl-xL $\Delta$ 27-82- $\Delta$ ACT lacks the residues 27-82 in addition to the UMD.

**Figure 2: Co-purification of the TCTP:Bcl-xL complex.** Isolation of a complex between TCTP and Bcl-xL $\Delta$ 27-82- $\Delta$ ACT: analytical gel filtration profiles of TCTP (magenta), Bcl-xL $\Delta$ 27-82- $\Delta$ ACT (grey) and TCTP + Bcl-xL $\Delta$ 27-82- $\Delta$ ACT (green curve) at 4°C (A) and 30°C with the corresponding 12% SDS-PAGE (B). Isolation of a complex between TCTP and Bcl-xL- $\Delta$ ACT: analytical gel filtration profiles of TCTP (magenta), Bcl-xL- $\Delta$ ACT (grey) and TCTP + Bcl-xL- $\Delta$ ACT (green) at 4°C (C-light green), 30°C (C-green), 30°C with 350 $\mu$ M TCTP and 350 $\mu$ M Bcl-xL- $\Delta$ ACT (D), 30°C with 150 $\mu$ M TCTP and 400 $\mu$ M Bcl-xL- $\Delta$ ACT (E) and the corresponding 12% SDS-PAGE. Isolation of a complex between TCTP and Bcl-xL $\Delta$ 45-84- $\Delta$ ACT: analytical gel filtration profiles of TCTP (magenta), Bcl-xL $\Delta$ 45-84- $\Delta$ ACT (grey) and TCTP + Bcl-xL $\Delta$ 45-84- $\Delta$ ACT (green curve at 30°C with 150 $\mu$ M TCTP and 400 $\mu$ M Bcl-xL $\Delta$ 45-84- $\Delta$ ACT with the corresponding 12% SDS-PAGE (B).

**Figure 3: Biochemical characteristic of the TCTP:Bcl-xL $\Delta$ 27-82- $\Delta$ ACT complex.** A) pH effect on TCTP:Bcl-xL $\Delta$ 27-82- $\Delta$ ACT complex: analytical gel filtration profiles of TCTP + Bcl-xL $\Delta$ 27-82- $\Delta$ ACT at pH 9 (green), pH 8 (light green) and pH 7 (dashed light green). B) Salt effect on TCTP:Bcl-xL $\Delta$ 27-82- $\Delta$ ACT complex: analytical gel filtration profiles of TCTP + Bcl-xL $\Delta$ 27-82- $\Delta$ ACT at 50mM NaCl (orange) and 200mM NaCl (dashed light orange).

**Figure 4: Determination of TCTP:Bcl-xL $\Delta$ 27-82- $\Delta$ ACT stoichiometry.** A) SEC-MALS/QELS analysis of TCTP+Bcl-xL $\Delta$ 27-82- $\Delta$ ACT (100 $\mu$ M) showing the dRI/dt profile with the calculated molecular mass indicated for each elution peak. B) Non-covalent mass spectrometry analysis: NanoESI mass spectra under non-denaturing condition for TCTP(5 $\mu$ M), Bcl-xL $\Delta$ 27-82- $\Delta$ ACT(5 $\mu$ M) and TCTP+Bcl-xL $\Delta$ 27-82- $\Delta$ ACT (5 $\mu$ M).

**Figure 5: Determination of the binding interface between TCTP and Bcl-xL $\Delta$ 27-82- $\Delta$ ACT by non-covalent mass spectrometry.** NanoESI mass spectra under non-denaturing condition for : First panel: TCTP+Bcl-xL $\Delta$ 27-82- $\Delta$ ACT(5 $\mu$ M); Second panel: TCTP-R21A+Bcl-xL $\Delta$ 27-82- $\Delta$ ACT(5 $\mu$ M); Third panel: TCTP+Bcl-xL $\Delta$ 27-82- $\Delta$ ACT-Y101K(5 $\mu$ M); fourth panel: TCTP+Bcl-xL $\Delta$ 27-82- $\Delta$ ACT(5 $\mu$ M)+ ABT737(50 $\mu$ M).

**Figure 6: Characterisation of a TCTP:Mcl-1 complex.** Co-purification of the TCTP:Mcl-1 complex: analytical gel filtration profiles of TCTP (magenta), Mcl-1 $\Delta$ ACT (blue) and TCTP + Mcl-1 $\Delta$ ACT (green curve) at 4°C (A) and 30°C (B) with the corresponding 12% SDS-PAGE. C) pH effect on TCTP:Mcl-1 $\Delta$ ACT complex: analytical gel filtration profiles of TCTP + Mcl-1 $\Delta$ ACT at pH 9 (green), pH 8 (light green) and pH 7 (dashed light green). B) Salt effect on TCTP:Mcl-1 $\Delta$ ACT complex: analytical gel

filtration profiles of TCTP + Bcl-xL $\Delta$ 27-82- $\Delta$ CT at 50mM NaCl (orange) and 200mM NaCl (dashed light orange). E) SEC-MALS/QELS analysis of TCTP+ Mcl-1 $\Delta$ CT (250 $\mu$ M) showing the dRI/dt profile with the calculated molecular mass indicated for each elution peak.

**Figure 7: Models for TCTP binding to either Mcl1 or Bcl-xL.** A) six models (a-f) can be suggested for TCTP binding to Bcl-xL (B) or Mcl1 (M); B) Cartoon representation of TCTP (Left panel, PDB entry 1YZ1), Bcl-xL (Middle panel, PDB entry 1R2D) and Bcl-xL in complex with ABT-737 (Left panel, PDB entry 2YXJ). The BH3 groove binding to BH3-only Bcl-2 proteins, colored in orange, contains the C-terminal part of  $\alpha$ 2, helices  $\alpha$ 3- $\alpha$ 4, the N-terminal part of  $\alpha$ 5 and the helix  $\alpha$ 8

Figure 1

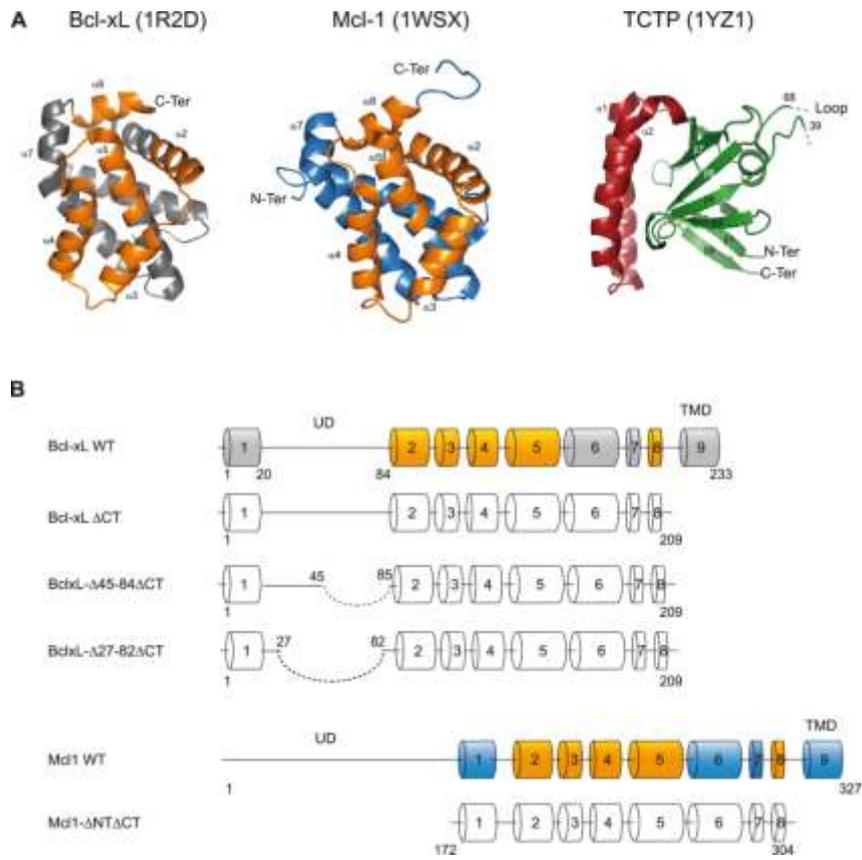


Figure 2

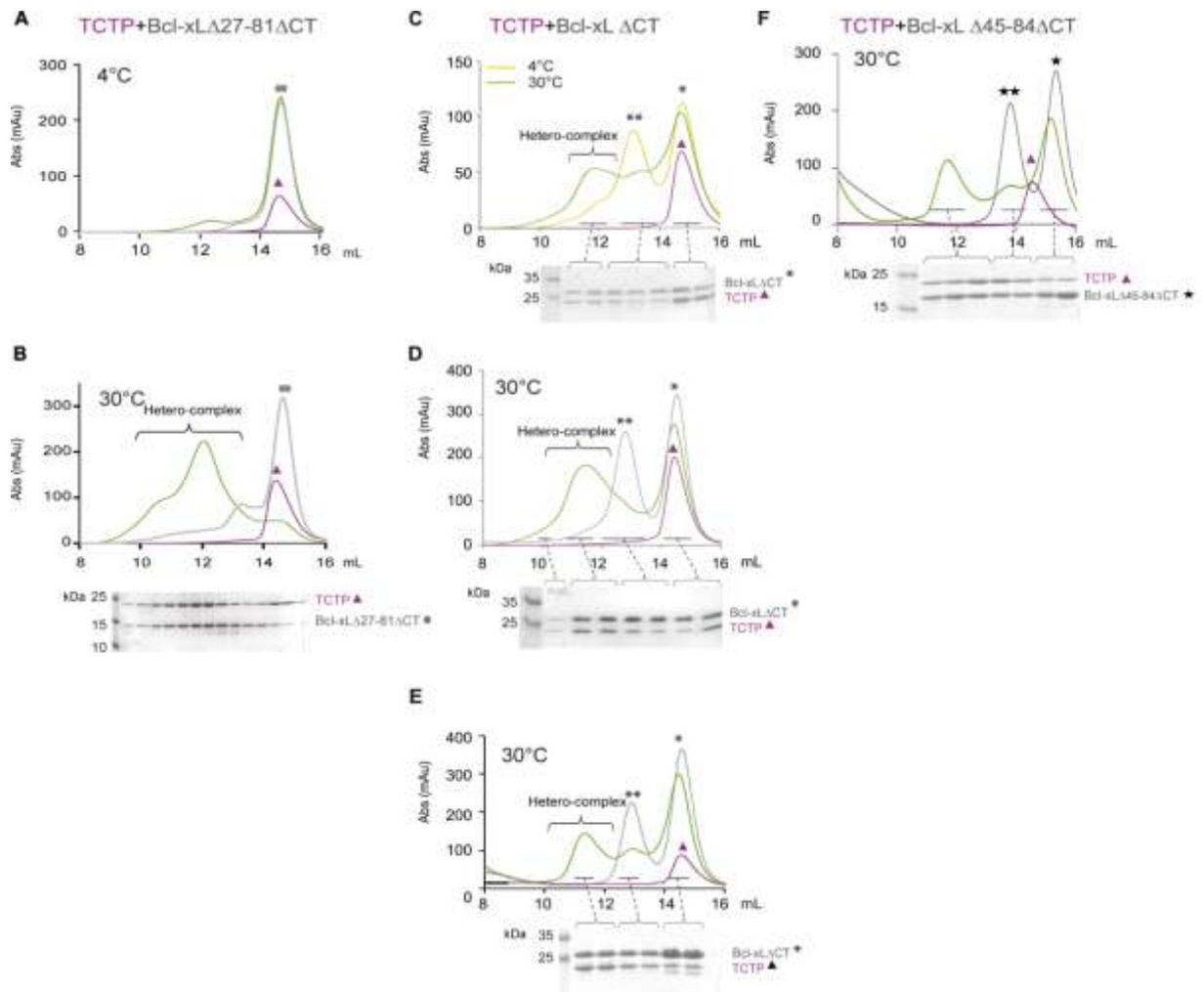


Figure 3

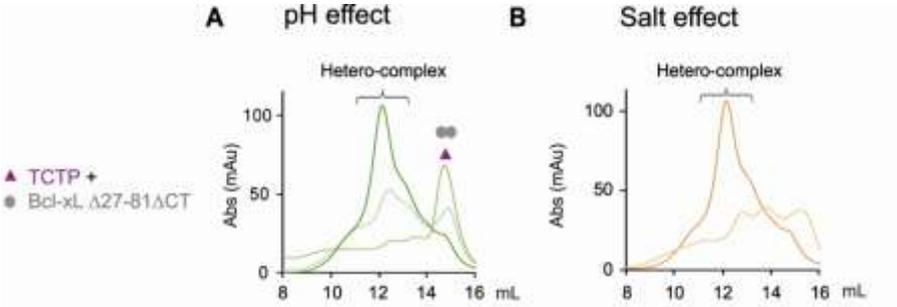


Figure 4

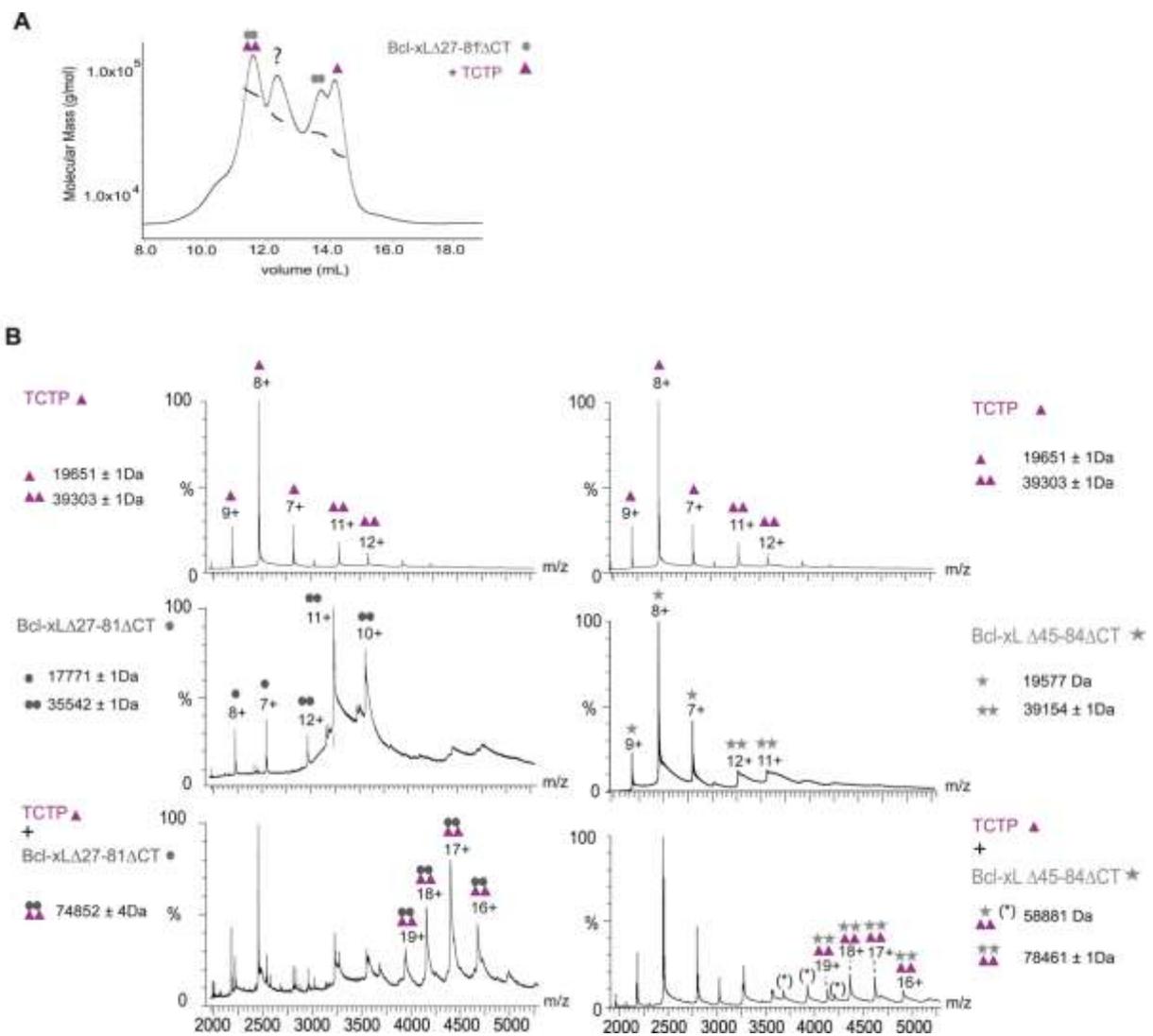


Figure 5

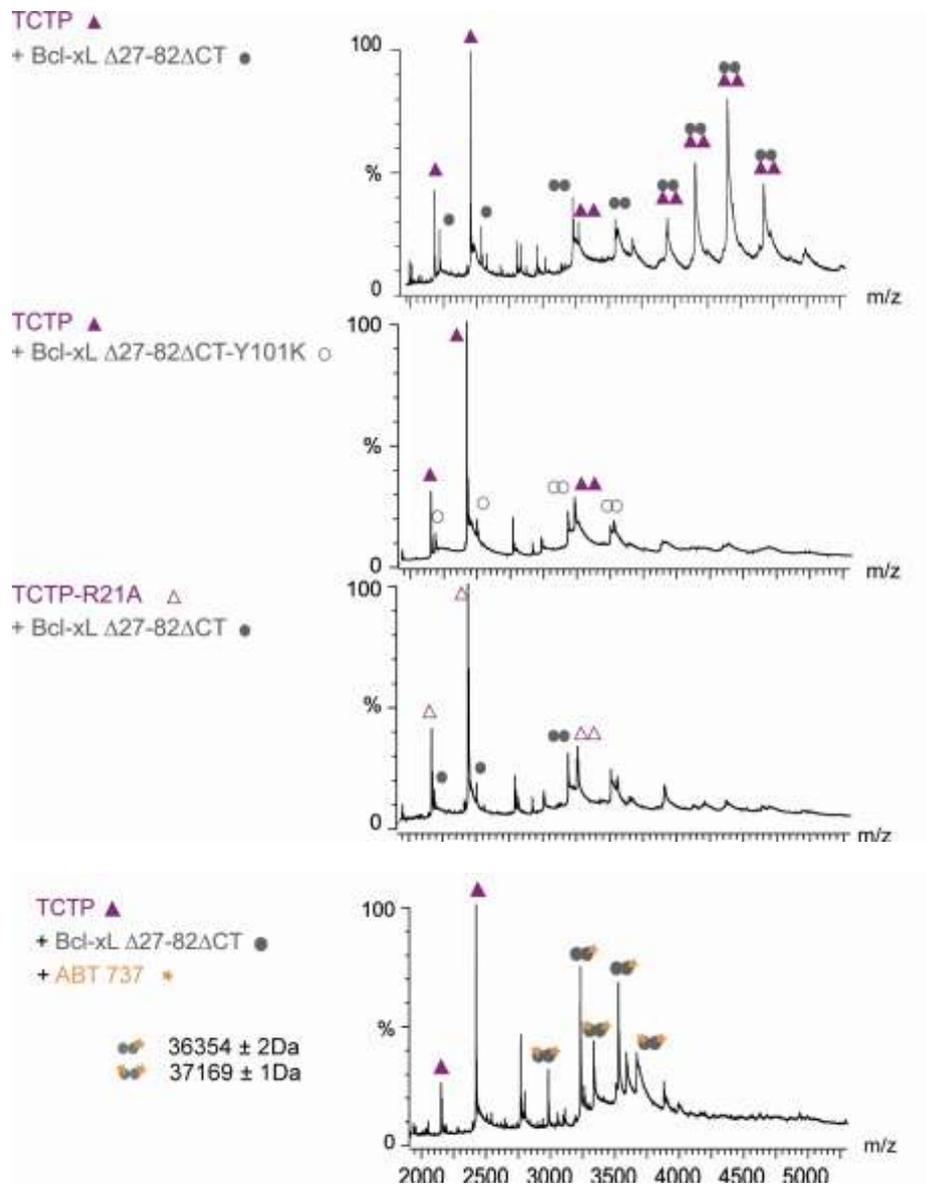
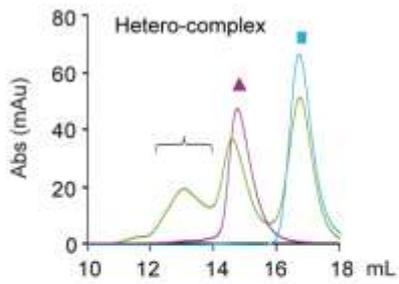
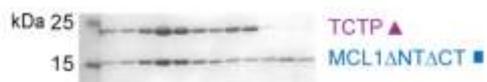
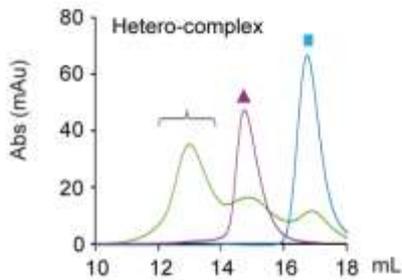


Figure 6

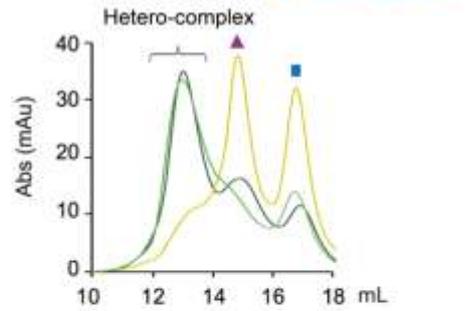
**A** 4°C



**B** 30°C



**C** pH effect



**D** Salt effect

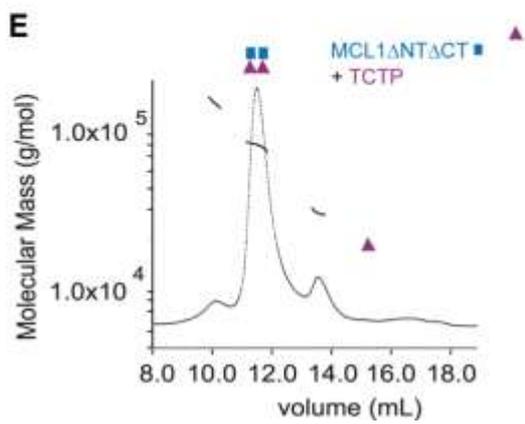
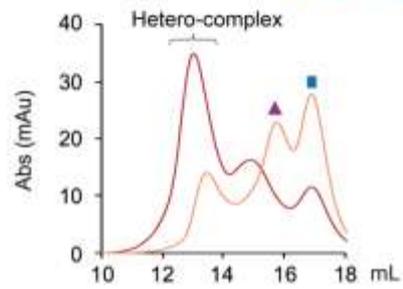
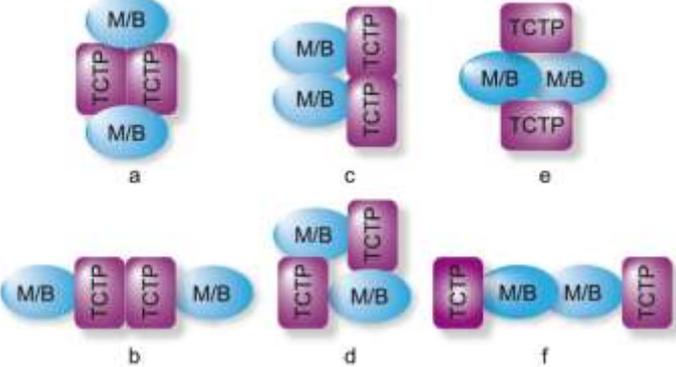
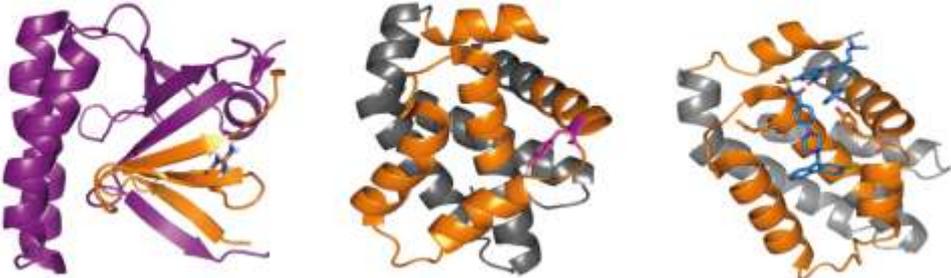


Figure 7

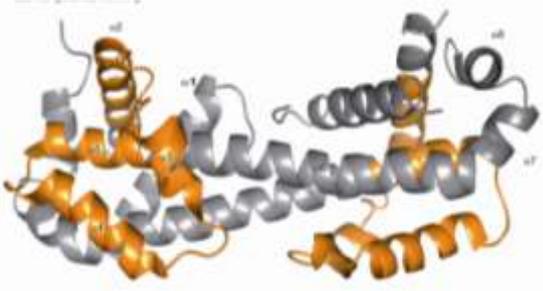
**A**



**B**



**C**





## VIII. Liste des figures

---

Figure 1 : Schéma des mécanismes de la voie intrinsèque .....	14
Figure 2: Protéines de la famille des Bcl-2.....	17
Figure 3 : Structure de Bcl-xl avec les domaines BH1, BH2, BH3 et BH4 (code PDB : 1R2D).....	18
Figure 4 : Schéma des interactions entre protéines pro et anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2. ....	21
Figure 5 : Hétérodimère entre un effecteur et une protéine anti-apoptotique (Westphal et al., 2011). ....	21
Figure 6 : Etapes d'oligomérisation de Bax et de Bak (Dewson et al., 2009). ....	22
Figure 7 : Alignement de séquences d'acides aminés entre protéines non canoniques (Beverly., 2012).....	24
Figure 8 : Schéma de la protéine Mcl-1 avec ses domaines PEST, BH1-2-3 et ses sites post-traductionnels.....	27
Figure 9 : Insertion des hélices $\alpha 5$ et $\alpha 6$ de Bcl-xl dans la membrane au cours de la formation des canaux ioniques.....	31
Figure 10 : Structures des différentes formes de Bcl-xl.....	33
Figure 11 : Comparaison de l'effet de Bim sur Bcl-xl et Mcl-1.....	36
Figure 12 : Structure de TCTP suivant deux angles de vue (code PDB : 2HR9).....	38
Figure 13 : Schéma indiquant les mécanismes dans lesquels est impliqué TCTP.....	42
Figure 14 : Structures de TCTP et de Bax, mettant en avant les hélices similaires en rouge (codes PDB : 2HR9 et 1F16). ....	43
Figure 15 : La réaction de recombinaison BP (Invitrogen).....	53
Figure 16 : La réaction de recombinaison LR (Invitrogen). ....	53
Figure 17 : Le système d'expression bactérien pET (Novagen).....	55
Figure 18 : Expression de protéines recombinantes en cellules d'insecte en utilisant la méthode Bac toBac®.....	57
Figure 19 : Les différentes étapes des tests de co-expression (adapté de Vijayachandran et al., 2011). ....	59
Figure 20 : Schéma explicatif des tests de co-expression.....	61
Figure 21: Principe de la DLS. ....	69
Figure 22 : Principe d'une expérience en thermofluor.....	71
Figure 23 : Organisation schématique d'une cuve de microcalorimètre et exemple de mesures obtenues en ITC. ....	73
Figure 24 : Principe de la spectrométrie de masse. ....	75
Figure 25 : Représentation schématique du dispositif SEC-MALLS-RI.....	77
Figure 26 : Schéma illustrant les équations de Laue. ....	80
Figure 27 : Diagramme de phase bidimensionnel d'une macromolécule biologique.....	83
Figure 28 : Comparaisons des techniques de cristallisation en goutte suspendue et assise.....	84
Figure 29 : Etat des spins nucléaires en absence et en présence d'un champ magnétique.....	86
Figure 30 : Mesure et exploitation du phénomène de relaxation.....	86
Figure 31 : Constructions de Bcl-xl et de TCTP mises au point pour les minitests.....	90
Figure 32 : Minitests de co-expression dans les bactéries 1.....	91
Figure 33 : Minitests de co-expression dans les bactéries 2.....	92
Figure 34 : Minitests de co-expression dans les bactéries 3.....	93
Figure 35 : Minitests de co-expression dans les cellules d'insectes 1. ....	94
Figure 36 : Purification de His-TCTP/Bcl-xl $\Delta$ TM. ....	96
Figure 37 : Gels dénaturants et tableau montrant les différents tests de cultures réalisés sur His-TCTP/Bcl-xl.....	97
Figure 38 : Etapes de purification de His-TCTP/Bcl-xl élué à l'imidazole (38.A) ou à la thrombine (38.B). ....	98
Figure 39 : Profils d'élution de colonne d'exclusion des purifications de His-TCTP/Bcl-xl élué à l'imidazole (39.A) ou à la thrombine (39.B). ....	99
Figure 40 : Gels dénaturants des étapes de purification de His-TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM élué à l'imidazole (40.A) ou à la thrombine (40.B). ....	100
Figure 41 : Profils d'élution de colonne d'exclusion des purifications de His-TCTP/Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM élué à l'imidazole (41.A) ou à la thrombine (41.B). ....	100
Figure 42 : Optimisation des lavages du complexe His-TCTP/Bcl-xl.....	102
Figure 43 : Etapes de purification de His-TCTP/Bcl-xl : 1) IMAC Ni <sup>2+</sup> , 2) QHP et 3) Superdex S200, 16/60. ....	103
Figure 44 : Impuretés liées à la purification de His-TCTP/Bcl-xl.....	104
Figure 45 : Etapes de la purification de GST-TCTP : 1) QHP 5mL, 2) Superdex S200 16/60. ....	105
Figure 46 : Gels natifs entre TCTP et Bcl-xl (46.A) et entre TCTP et Bcl-xl $\Delta$ 27-81 $\Delta$ TM (46.B).....	106

Figure 47 : SDS-PAGE des éluions à la thrombine des GST pull down de GST-Bcl-xlΔTM, GST-Bcl-xlΔ27-81ΔTM et GST incubés sans et avec TCTP.....	107
Figure 48 : Profils de gel filtration du mélange Bcl-xlΔ27-81ΔTM + TCTP (48.A), de Bcl-xlΔ27-81ΔTM seule (48.B) et de TCTP seule (48.C).....	108
Figure 49 : Profils d'éluion de gel filtration des purifications de Bcl-xlΔ45-84ΔTM (49.A) et de Bcl-xlΔTM (49.B).....	109
Figure 50 : Superposition de profils d'éluion de gel filtration : du mélange TCTP + Bcl-xlΔTM, de TCTP et de Bcl-xlΔTM (50.A), ainsi que du mélange TCTP + Bcl-xlΔ45-84ΔTM, de TCTP et de Bcl-xlΔ45-84ΔTM (50.B).....	110
Figure 51 : Profils d'éluion de gel filtration des protéines Bcl-xlΔ45-84ΔTM et Bcl-xlΔTM testées à différentes températures et dans des types différents de tubes.....	111
Figure 52 : Profils de gel filtration du mélange TCTP+Bcl-xlΔTM, de TCTP et de Bcl-xlΔTM (52.A) ainsi que du mélange de TCTP+Bcl-xlΔ45-84ΔTM, de TCTP et de Bcl-xlΔ45-84ΔTM (52.B).....	112
Figure 53 : Constructions de Mcl-1 et de TCTP.....	114
Figure 54 : Minitests de co-expression 4.....	115
Figure 55 : Minitests de co-expression 5.....	116
Figure 56 : Minitests de co-expression 6.....	117
Figure 57: SDS-PAGE des tests d'expression de His-TCTPΔ1-10 et de GST-TCTPΔ1-10.....	118
Figure 58 : Minitests de co-expression dans les cellules d'insectes 2.....	119
Figure 59 : Gel dénaturant indiquant les étapes de purification de GST-CMcl-1/TCTP et profil d'éluion de gel filtration du complexe TCTP/CMcl-1.....	120
Figure 60 : Gels dénaturants des trois constructions retenues sur billes suivant le temps d'incubation des bactéries à 25°C et le type de milieu.....	122
Figure 61 : Les différentes étapes de la purification de GST-CMcl-1.....	123
Figure 62 : Gels SDS-PAGE de CMcl-1 avant et après 4 jours à 4°C.....	124
Figure 63 : Les différentes étapes de la purification de His-MBP-CMcl-1.....	124
Figure 64 : Gels natifs entre TCTP et CMcl-1 : sans glycérol (64.A) et avec glycérol (64.B).....	125
Figure 65 : Profils de gel filtration du mélange de TCTP + CMcl-1 (65.A), de CMcl-1 (65.B) et de TCTP (65.C).....	127
Figure 66 : Profils d'éluion de gel filtration (66.A) et (66.B) des mélanges TCTP+CMcl-1.....	128
Figure 67 : Superposition des profils de gel filtration de Bcl-xlΔ27-81ΔTM, de TCTP et du mélange des deux protéines à 30°C et à 4°C.....	129
Figure 68 : Superposition des profils de gel filtration du mélange TCTP+Bcl-xlΔTM, de TCTP et de Bcl-xlΔTM (68.A) à 30°C et (68.B) à 4°C, ainsi que du mélange de TCTP+Bcl-xlΔ45-84ΔTM, de TCTP et de Bcl-xlΔ45-84ΔTM (68.C) à 30°C et (68.D) à 4°C.....	130
Figure 69 : Superposition de profils de gel filtration de CMcl-1, de TCTP et du mélange des deux protéines à 30°C et à 4°C.....	131
Figure 70 : Superposition de profils de gel filtration du mélange TCTP + Bcl-xlΔ27-81ΔTM dans différentes conditions de pH (70.A) et de concentrations en NaCl (70.B).....	132
Figure 71 : Superposition de profils de gel filtration du mélange TCTP + Bcl-xlΔTM à pH=7 et à pH=9, avec les gels dénaturants de leurs profils d'éluions.....	133
Figure 72 : Superposition de profils de gel filtration du mélange TCTP + CMcl-1 dans différentes conditions de pH (72.A) et de concentrations en NaCl (72.B).....	134
Figure 73 : Superposition des spectres HSQC <sup>15</sup> N-H de TCTP produit au laboratoire et de celui issu de l'article.....	135
Figure 74 : Les trois spectres HSQC <sup>13</sup> C-H de TCTP <sup>13</sup> C seule, et des mélanges TCTP <sup>13</sup> C +CMcl-1 et TCTP <sup>13</sup> C +Bcl-xlΔ27-81ΔTM superposés à celui de TCTP <sup>13</sup> C seule.....	137
Figure 75 : Résumé des étapes d'optimisation des petits cristaux.....	139
Figure 76 : Résumé des étapes d'optimisation des sphérulites.....	140
Figure 77 : Profils de sédimentation de TCTP (77.A), Bcl-xlΔ27-81ΔTM (77.B) et du mélange (77.C).....	141
Figure 78 : Superposition des profils de sédimentation de TCTP, de Bcl-xlΔ27-81ΔTM et du mélange.....	142
Figure 79 : Alignement des profils de SEC-Mals de TCTP, de Bcl-xlΔ27-81ΔTM et du mélange des deux protéines.....	143
Figure 80 : Spectre en ESI-TOF en condition native du mélange TCTP+Bcl-xlΔ27-81ΔTM.....	144
Figure 81 : Spectre en ESI-TOF en condition native du mélange TCTP+Bcl-xlΔ45-84ΔTM.....	145
Figure 82 : Profils de fluorescence de TCTP, CMcl-1 et du mélange.....	146
Figure 83 : Les trois figures représentent le profil de sédimentation par UCA de (84.A) TCTP, (84.B) CMcl-1 et (84.C) du complexe.....	147

Figure 84 : Superposition de profils de sédimentation du complexe avec différents ratios en protéines.....	148
Figure 85 : Profil de sédimentation du complexe TCTP/CMcl-1 (ratio 1 : 1) mesuré en interférences.....	149
Figure 86 : Alignement de trois profils de SEC-Mals de TCTP, de CMcl-1 et du mélange des deux protéines, et du gel dénaturant associé au mélange.....	150
Figure 87 : Spectre en ESI-TOF en condition native du mélange TCTP+CMcl-1.....	152
Figure 88 : Profils d'élution de gel filtration et gels dénaturants des mélanges de TCTPΔloop en présence de CMcl-1 (88.A), de Bcl-xlΔ27-81ΔTM (88.B), de Bcl-xlΔ45-84ΔTM (88.C) et de Bcl-xlΔTM (88.D).....	153
Figure 89 : Profils d'élution de gel filtration et gels dénaturants des mélanges TCTP(R21A)+CMcl-1 (90.A) et TCTP(R21A)+Bcl-xlΔ27-81ΔTM (89.B).....	154
Figure 90 : Alignement de spectres en conditions natives de TCTP, CMcl-1, CMcl-1+TCTP et CMcl-1+TCTP(R21A).....	155
Figure 91 : Alignement de spectres de masse, en condition native, des mélanges : Bcl-xlΔ27-81ΔTM+TCTP et Bcl-xlΔ27-81ΔTM+TCTP(R21A).....	156
Figure 92 : Gel dénaturant et profil d'élution de gel filtration du mélange TCTP+Bcl-xlΔ27-81ΔTM,Y101K.....	157
Figure 93 : Alignement de spectres de masse, en condition native, de TCTP, Bcl-xlΔ27-81ΔTM, Bcl-xlΔ27-81ΔTM +TCTP et Bcl-xlΔ27-81ΔTM,Y101K+TCTP.....	158
Figure 94 : Alignement de spectres de masse, en condition native, des mélanges Bcl-xlΔ27-81ΔTM+TCTP et Bcl-xlΔ27-81ΔTM+TCTP+ABT737.....	159
Figure 95 : Structure de Bcl-xl avec le ligand ABT-737 et la tyrosine 101 en magenta.....	159
Figure 96 : Profils d'élutions de colonne d'exclusion de taille des complexes avec la partie N terminale de TCTP et de TCTPΔloop.....	160
Figure 97 : Structure cristallographique de TCTP (1YZ1) colorée suivant les deux parties coupées par la thrombine.....	161
Figure 98 : Spectre de masse en ESI-TOF, en condition non dénaturante, du mélange TCTP+Bcl-xlΔ27-81ΔTM incubé avec de la thrombine.....	162
Figure 99 : Alignements de séquence de : TCTP (1-60) avec les domaines BH3 de Puma et Bim (99.A) et de (99.B) TCTPΔloop avec les mêmes domaines.....	163
Figure 100 : Superposition de profils de gel filtration des mélanges : TCTP+Bcl-xlΔ27-81ΔTM+CMcl-1, TCTP+Bcl-xlΔ27-81ΔTM et TCTP+CMcl-1, et gel dénaturant des fractions du profil d'élution du mélange des trois protéines.....	164
Figure 101 : Modes d'assemblages des différents complexes.....	165
Figure 102 : Schéma des équilibres entre TCTP et ses partenaires anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2 (Bcl-2f = Bcl-xlΔ45-84ΔTM ou CMcl-1).....	169
Figure 103 : Schéma des équilibres entre TCTP et CMcl-1.....	170
Figure 104 : Modèle d'interaction entre TCTP, Mcl-1, Bcl-xl et Bax, d'après Susini et al., 2008.....	173
Figure 105 : Liste des protéines non canoniques interagissant avec les protéines de la famille Bcl-2 (Beverly et al., 2012).....	176
Figure 106 : Liste des protéines non canoniques interagissant avec les protéines de la famille Bcl-2 (Beverly et al., 2012) (suite).....	177
Figure 107 : Cartes des vecteurs pGGWA, pnea-tH, pnea-vHM et pGex.....	182
Figure 108 : Minitests de co-expression.....	186
Figure 109 : Profils d'élutions de colonne d'exclusion de His-TCTP/Bcl-xl élué à l'imidazole et de His-TCTP/Bcl-xl élué à l'imidazole puis coupé à la thrombine.....	187
Figure 110 : Profils d'élutions de gel filtration des complexes His-TCTP/Bcl-xl, His-10glyTCTP/Bcl-xl et de GST-TCTP/Bcl-xl co-exprimés.....	187
Figure 111 : Superposition de profils d'élution de colonne d'exclusion des protéines seules et du mélange TCTP+Bcl-xlΔTM.....	188



# Bibliographie

---

- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D.G., Heuser, J.E., Wang, X., and Akey, C.W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9, 423-432.
- Akgul, C., Moulding, D.A., White, M.R., and Edwards, S.W. (2000). In vivo localisation and stability of human Mcl-1 using green fluorescent protein (GFP) fusion proteins. *FEBS Lett* 478, 72-76.
- Amson, R., Karp, J.E., and Telerman, A. (2013a). Lessons from tumor reversion for cancer treatment. *Curr Opin Oncol* 25, 59-65.
- Amson, R., Pece, S., Lespagnol, A., Vyas, R., Mazzarol, G., Tosoni, D., Colaluca, I., Viale, G., Rodrigues-Ferreira, S., Wynendaele, J., *et al.* (2011). Reciprocal repression between P53 and TCTP. *Nat Med* 18, 91-99.
- Amson, R., Pece, S., Marine, J.C., Di Fiore, P.P., and Telerman, A. (2013b). TPT1/ TCTP-regulated pathways in phenotypic reprogramming. *Trends Cell Biol* 23, 37-46.
- Amson, R.B., Nemani, M., Roperch, J.P., Israeli, D., Bougueleret, L., Le Gall, I., Medhioub, M., Linares-Cruz, G., Lethrosne, F., Pasturaud, P., *et al.* (1996). Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in p53-induced apoptosis: activation of the vertebrate homologue of the drosophila seven in absentia gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3953-3957.
- Aouacheria, A., Brunet, F., and Gouy, M. (2005). Phylogenomics of life-or-death switches in multicellular animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip families of apoptotic regulators. *Mol Biol Evol* 22, 2395-2416.
- Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2, 420-430.
- Baggstrom, M.Q., Qi, Y., Koczywas, M., Argiris, A., Johnson, E.A., Millward, M.J., Murphy, S.C., Erlichman, C., Rudin, C.M., and Govindan, R. (2011). A phase II study of AT-101 (Gossypol) in chemotherapy-sensitive recurrent extensive-stage small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 6, 1757-1760.
- Beroukhim, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J.S., Dobson, J., Urashima, M., *et al.* (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 463, 899-905.
- Beverly, L.J. (2012). Regulation of anti-apoptotic BCL2-proteins by non-canonical interactions: the next step forward or two steps back? *J Cell Biochem* 113, 3-12.
- Bjelic, S., and Jelesarov, I. (2008). A survey of the year 2007 literature on applications of isothermal titration calorimetry. *J Mol Recognit* 21, 289-312.
- Bohm, H., Benndorf, R., Gaestel, M., Gross, B., Nurnberg, P., Kraft, R., Otto, A., and Bielka, H. (1989). The growth-related protein P23 of the Ehrlich ascites tumor: translational control, cloning and primary structure. *Biochem Int* 19, 277-286.
- Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G., and Thompson, C.B. (1993). bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74, 597-608.
- Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M.A., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (1995). CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 3, 87-98.
- Bommer, U.A., Borovjagin, A.V., Greagg, M.A., Jeffrey, I.W., Russell, P., Laing, K.G., Lee, M., and Clemens, M.J. (2002). The mRNA of the translationally controlled tumor protein P23/TCTP is a highly structured RNA, which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR. *RNA* 8, 478-496.
- Bommer, U.A., and Thiele, B.J. (2004). The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int J Biochem Cell Biol* 36, 379-385.

- Bonnet, C., Perret, E., Dumont, X., Picard, A., Caput, D., and Lenaers, G. (2000). Identification and transcription control of fission yeast genes repressed by an ammonium starvation growth arrest. *Yeast* *16*, 23-33.
- Cans, C., Passer, B.J., Shalak, V., Nancy-Portebois, V., Crible, V., Amzallag, N., Allanic, D., Tufino, R., Argentini, M., Moras, D., *et al.* (2003). Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 13892-13897.
- Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S.A., and Letai, A. (2006). Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* *9*, 351-365.
- Chang, B.S., Minn, A.J., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., and Thompson, C.B. (1997). Identification of a novel regulatory domain in Bcl-X(L) and Bcl-2. *EMBO J* *16*, 968-977.
- Chen, L.Q., Wei, J.S., Lei, Z.N., Zhang, L.M., Liu, Y., and Sun, F.Y. (2005). Induction of Bcl-2 and Bax was related to hyperphosphorylation of tau and neuronal death induced by okadaic acid in rat brain. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* *287*, 1236-1245.
- Chenal, A., Vendrely, C., Vitrac, H., Karst, J.C., Gonneaud, A., Blanchet, C.E., Pichard, S., Garcia, E., Salin, B., Catty, P., *et al.* (2012). Amyloid fibrils formed by the programmed cell death regulator Bcl-xL. *J Mol Biol* *415*, 584-599.
- Cheng, E.H., Levine, B., Boise, L.H., Thompson, C.B., and Hardwick, J.M. (1996). Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. *Nature* *379*, 554-556.
- Chipuk, J.E., Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Droin, N.M., Newmeyer, D.D., Schuler, M., and Green, D.R. (2004). Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* *303*, 1010-1014.
- Chipuk, J.E., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M.J., and Green, D.R. (2010). The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* *37*, 299-310.
- Chitpatima, S.T., and Brawerman, G. (1988). Shifts in configuration of the 5'-noncoding region of a mouse messenger RNA under translational control. *J Biol Chem* *263*, 7164-7169.
- Chitpatima, S.T., Makrides, S., Bandyopadhyay, R., and Brawerman, G. (1988). Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucleic Acids Res* *16*, 2350.
- Christenson, E., Merlin, S., Saito, M., and Schlesinger, P. (2008). Cholesterol effects on BAX pore activation. *J Mol Biol* *381*, 1168-1183.
- Cucchi, U., Gianellini, L.M., De Ponti, A., Sola, F., Alzani, R., Patton, V., Pezzoni, A., Troiani, S., Saccardo, M.B., Rizzi, S., *et al.* (2010). Phosphorylation of TCTP as a marker for polo-like kinase-1 activity in vivo. *Anticancer Res* *30*, 4973-4985.
- Czabotar, P.E., Lee, E.F., Thompson, G.V., Wardak, A.Z., Fairlie, W.D., and Colman, P.M. (2011). Mutation to Bax beyond the BH3 domain disrupts interactions with pro-survival proteins and promotes apoptosis. *J Biol Chem* *286*, 7123-7131.
- Czabotar, P.E., Lee, E.F., van Delft, M.F., Day, C.L., Smith, B.J., Huang, D.C., Fairlie, W.D., Hinds, M.G., and Colman, P.M. (2007). Structural insights into the degradation of Mcl-1 induced by BH3 domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 6217-6222.
- Czabotar, P.E., Westphal, D., Dewson, G., Ma, S., Hockings, C., Fairlie, W.D., Lee, E.F., Yao, S., Robin, A.Y., Smith, B.J., *et al.* (2013). Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. *Cell* *152*, 519-531.
- Day, C.L., Smits, C., Fan, F.C., Lee, E.F., Fairlie, W.D., and Hinds, M.G. (2008). Structure of the BH3 domains from the p53-inducible BH3-only proteins Noxa and Puma in complex with Mcl-1. *J Mol Biol* *380*, 958-971.
- DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* *7*, 11-20.

- Denisov, A.Y., Sprules, T., Fraser, J., Kozlov, G., and Gehring, K. (2007). Heat-induced dimerization of BCL-xL through alpha-helix swapping. *Biochemistry* 46, 734-740.
- Ding, Q., He, X., Hsu, J.M., Xia, W., Chen, C.T., Li, L.Y., Lee, D.F., Liu, J.C., Zhong, Q., Wang, X., *et al.* (2007). Degradation of Mcl-1 by beta-TrCP mediates glycogen synthase kinase 3-induced tumor suppression and chemosensitization. *Mol Cell Biol* 27, 4006-4017.
- Ericsson, U.B., Hallberg, B.M., Detitta, G.T., Dekker, N., and Nordlund, P. (2006). Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal Biochem* 357, 289-298.
- Erllich, S., Mizrachy, L., Segev, O., Lindenboim, L., Zmira, O., Adi-Harel, S., Hirsch, J.A., Stein, R., and Pinkas-Kramarski, R. (2007). Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members. *Autophagy* 3, 561-568.
- Feng, Y., Liu, D., Yao, H., and Wang, J. (2007). Solution structure and mapping of a very weak calcium-binding site of human translationally controlled tumor protein by NMR. *Arch Biochem Biophys* 467, 48-57.
- Gachet, Y., Lee, M., Sawitzki, B., Tournier, S., Poulton, T., and Bommer, U.A. (1997). Intracellular colocalisation of the translationally controlled protein P23 with cytoskeletal structures. *Biochem Soc Trans* 25, 269S.
- Germain, M., and Duronio, V. (2007). The N terminus of the anti-apoptotic BCL-2 homologue MCL-1 regulates its localization and function. *J Biol Chem* 282, 32233-32242.
- Gnanasekar, M., Dakshinamoorthy, G., and Ramaswamy, K. (2009). Translationally controlled tumor protein is a novel heat shock protein with chaperone-like activity. *Biochem Biophys Res Commun* 386, 333-337.
- Graidist, P., Yazawa, M., Tonganunt, M., Nakatomi, A., Lin, C.C., Chang, J.Y., Phongdara, A., and Fujise, K. (2007). Fortilin binds Ca<sup>2+</sup> and blocks Ca<sup>2+</sup>-dependent apoptosis in vivo. *Biochem J* 408, 181-191.
- Grillot, D.A., Merino, R., Pena, J.C., Fanslow, W.C., Finkelman, F.D., Thompson, C.B., and Nunez, G. (1996). bcl-x exhibits regulated expression during B cell development and activation and modulates lymphocyte survival in transgenic mice. *J Exp Med* 183, 381-391.
- Herrant, M., Jacquet, A., Marchetti, S., Belhacene, N., Colosetti, P., Luciano, F., and Auburger, P. (2004). Cleavage of Mcl-1 by caspases impaired its ability to counteract Bim-induced apoptosis. *Oncogene* 23, 7863-7873.
- Hinds, M.G., Smits, C., Fredericks-Short, R., Risk, J.M., Bailey, M., Huang, D.C., and Day, C.L. (2007). Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death Differ* 14, 128-136.
- Hsu, Y.T., and Youle, R.J. (1997). Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J Biol Chem* 272, 13829-13834.
- Hu, Y., Benedict, M.A., Wu, D., Inohara, N., and Nunez, G. (1998). Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4386-4391.
- Inuzuka, H., Fukushima, H., Shaik, S., Liu, P., Lau, A.W., and Wei, W. (2011). Mcl-1 ubiquitination and destruction. *Oncotarget* 2, 239-244.
- Jamil, S., Sobouti, R., Hojabrpour, P., Raj, M., Kast, J., and Duronio, V. (2005). A proteolytic fragment of Mcl-1 exhibits nuclear localization and regulates cell growth by interaction with Cdk1. *Biochem J* 387, 659-667.
- Jancarik, J., Pufan, R., Hong, C., Kim, S.H., and Kim, R. (2004). Optimum solubility (OS) screening: an efficient method to optimize buffer conditions for homogeneity and crystallization of proteins. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 1670-1673.
- Jung, J., Kim, M., Kim, M.J., Kim, J., Moon, J., Lim, J.S., and Lee, K. (2004). Translationally controlled tumor protein interacts with the third cytoplasmic domain of Na,K-ATPase alpha subunit and inhibits the pump activity in HeLa cells. *J Biol Chem* 279, 49868-49875.
- Kang, M.H., and Reynolds, C.P. (2009). Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 15, 1126-1132.

Karsan, A., Yee, E., and Harlan, J.M. (1996a). Endothelial cell death induced by tumor necrosis factor-alpha is inhibited by the Bcl-2 family member, A1. *J Biol Chem* 271, 27201-27204.

Karsan, A., Yee, E., Kaushansky, K., and Harlan, J.M. (1996b). Cloning of human Bcl-2 homologue: inflammatory cytokines induce human A1 in cultured endothelial cells. *Blood* 87, 3089-3096.

Kim, H., Tu, H.C., Ren, D., Takeuchi, O., Jeffers, J.R., Zambetti, G.P., Hsieh, J.J., and Cheng, E.H. (2009). Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 36, 487-499.

Kim, H.Y., Kim, S., Youn, H., Chung, J.K., Shin, D.H., and Lee, K. (2011). The cell penetrating ability of the proapoptotic peptide, KLAKLAKKLAKLAK fused to the N-terminal protein transduction domain of translationally controlled tumor protein, MIIYRDLISH. *Biomaterials* 32, 5262-5268.

Kim, R., Emi, M., and Tanabe, K. (2006). Role of mitochondria as the gardens of cell death. *Cancer Chemother Pharmacol* 57, 545-553.

Klasa, R.J., Gillum, A.M., Klem, R.E., and Frankel, S.R. (2002). Oblimersen Bcl-2 antisense: facilitating apoptosis in anticancer treatment. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 12, 193-213.

Komatsu, K., Miyashita, T., Hang, H., Hopkins, K.M., Zheng, W., Cuddeback, S., Yamada, M., Lieberman, H.B., and Wang, H.G. (2000). Human homologue of *S. pombe* Rad9 interacts with BCL-2/BCL-xL and promotes apoptosis. *Nat Cell Biol* 2, 1-6.

Konopleva, M., Contractor, R., Tsao, T., Samudio, I., Ruvolo, P.P., Kitada, S., Deng, X., Zhai, D., Shi, Y.X., Sneed, T., *et al.* (2006). Mechanisms of apoptosis sensitivity and resistance to the BH3 mimetic ABT-737 in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* 10, 375-388.

Kozopas, K.M., Yang, T., Buchan, H.L., Zhou, P., and Craig, R.W. (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3516-3520.

Kvansakul, M., Yang, H., Fairlie, W.D., Czabotar, P.E., Fischer, S.F., Perugini, M.A., Huang, D.C., and Colman, P.M. (2008). Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ* 15, 1564-1571.

Langdon, J.M., Vonakis, B.M., and MacDonald, S.M. (2004). Identification of the interaction between the human recombinant histamine releasing factor/translationally controlled tumor protein and elongation factor-1 delta (also known as eElongation factor-1B beta). *Biochim Biophys Acta* 1688, 232-236.

Letai, A., Bassik, M.C., Walensky, L.D., Sorcinelli, M.D., Weiler, S., and Korsmeyer, S.J. (2002). Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2, 183-192.

Leuenroth, S.J., Grutkoski, P.S., Ayala, A., and Simms, H.H. (2000). The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leukocytes promotes apoptosis. *J Leukoc Biol* 68, 158-166.

Li, F., Zhang, D., and Fujise, K. (2001). Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. *J Biol Chem* 276, 47542-47549.

Lian, J., Karnak, D., and Xu, L. (2010). The Bcl-2-Bcl-1 interaction in (-)-gossypol-induced autophagy versus apoptosis in prostate cancer cells. *Autophagy* 6, 1201-1203.

Liu, H., Peng, H.W., Cheng, Y.S., Yuan, H.S., and Yang-Yen, H.F. (2005). Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. *Mol Cell Biol* 25, 3117-3126.

Liu, H., Perlman, H., Pagliari, L.J., and Pope, R.M. (2001). Constitutively activated Akt-1 is vital for the survival of human monocyte-differentiated macrophages. Role of Mcl-1, independent of nuclear factor (NF)-kappaB, Bad, or caspase activation. *J Exp Med* 194, 113-126.

Liu, Q., Moldoveanu, T., Sprules, T., Matta-Camacho, E., Mansur-Azzam, N., and Gehring, K. (2010). Apoptotic regulation by MCL-1 through heterodimerization. *J Biol Chem* 285, 19615-19624.

Losonczi, J.A., Olejniczak, E.T., Betz, S.F., Harlan, J.E., Mack, J., and Fesik, S.W. (2000). NMR studies of the anti-apoptotic protein Bcl-xL in micelles. *Biochemistry* 39, 11024-11033.

- Lucken-Ardjomande, S., Montessuit, S., and Martinou, J.C. (2008). Contributions to Bax insertion and oligomerization of lipids of the mitochondrial outer membrane. *Cell Death Differ* 15, 929-937.
- MacDonald-Jankowski, D.S., Lawinski, C.P., and Payne, M. (1995). The effect of thin K-edge filters on the image quality of D- and E-speed dental film. *Dentomaxillofac Radiol* 24, 23-29.
- MacDonald, S.M., Bhisutthibhan, J., Shapiro, T.A., Rogerson, S.J., Taylor, T.E., Tembo, M., Langdon, J.M., and Meshnick, S.R. (2001). Immune mimicry in malaria: Plasmodium falciparum secretes a functional histamine-releasing factor homolog in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10829-10832.
- MacDonald, S.M., Paznekas, W.A., and Jabs, E.W. (1999). Chromosomal localization of tumor protein, translationally-controlled 1 (TPT1) encoding the human histamine releasing factor (HRF) to 13q12-->q14. *Cytogenet Cell Genet* 84, 128-129.
- MacDonald, S.M., Rafnar, T., Langdon, J., and Lichtenstein, L.M. (1995). Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science* 269, 688-690.
- Maiuri, M.C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., *et al.* (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* 26, 2527-2539.
- Marrack, P., and Kappler, J. (1994). Subversion of the immune system by pathogens. *Cell* 76, 323-332.
- McPherson, A., and DeLucas, L. (1999). Crystal-growing in space. *Science* 283, 1459.
- Minn, A.J., Kettlun, C.S., Liang, H., Kelekar, A., Vander Heiden, M.G., Chang, B.S., Fesik, S.W., Fill, M., and Thompson, C.B. (1999). Bcl-xL regulates apoptosis by heterodimerization-dependent and -independent mechanisms. *EMBO J* 18, 632-643.
- Motoyama, N., Wang, F., Roth, K.A., Sawa, H., Nakayama, K., Negishi, I., Senju, S., Zhang, Q., Fujii, S., and *et al.* (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science* 267, 1506-1510.
- Moulding, D.A., Quayle, J.A., Hart, C.A., and Edwards, S.W. (1998). Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood* 92, 2495-2502.
- Nemani, M., Linares-Cruz, G., Bruzzoni-Giovanelli, H., Roperch, J.P., Tuynder, M., Bougueleret, L., Cherif, D., Medhioub, M., Pasturaud, P., Alvaro, V., *et al.* (1996). Activation of the human homologue of the Drosophila sina gene in apoptosis and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9039-9042.
- O'Neill, J.W., Manion, M.K., Maguire, B., and Hockenbery, D.M. (2006). BCL-XL dimerization by three-dimensional domain swapping. *J Mol Biol* 356, 367-381.
- Oakes, S.A., Scorrano, L., Opferman, J.T., Bassik, M.C., Nishino, M., Pozzan, T., and Korsmeyer, S.J. (2005). Proapoptotic BAX and BAK regulate the type 1 inositol trisphosphate receptor and calcium leak from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 105-110.
- Opferman, J.T., Letai, A., Beard, C., Sorcinelli, M.D., Ong, C.C., and Korsmeyer, S.J. (2003). Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* 426, 671-676.
- Pagliari, L.J., Kuwana, T., Bonzon, C., Newmeyer, D.D., Tu, S., Beere, H.M., and Green, D.R. (2005). The multidomain proapoptotic molecules Bax and Bak are directly activated by heat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17975-17980.
- Pantoliano, M.W., Petrella, E.C., Kwasnoski, J.D., Lobanov, V.S., Myslik, J., Graf, E., Carver, T., Asel, E., Springer, B.A., Lane, P., *et al.* (2001). High-density miniaturized thermal shift assays as a general strategy for drug discovery. *J Biomol Screen* 6, 429-440.
- Perciavalle, R.M., Stewart, D.P., Koss, B., Lynch, J., Milasta, S., Bathina, M., Temirov, J., Cleland, M.M., Pelletier, S., Schuetz, J.D., *et al.* (2013). Anti-apoptotic MCL-1 localizes to the mitochondrial matrix and couples mitochondrial fusion to respiration. *Nat Cell Biol* 14, 575-583.
- Poulaki, V., Mitsiades, N., Romero, M.E., and Tsokos, M. (2001). Fas-mediated apoptosis in neuroblastoma requires mitochondrial activation and is inhibited by FLICE inhibitor protein and Bcl-2. *Cancer Res* 61, 4864-4872.

Reynolds, J.E., Yang, T., Qian, L., Jenkinson, J.D., Zhou, P., Eastman, A., and Craig, R.W. (1994). Mcl-1, a member of the Bcl-2 family, delays apoptosis induced by c-Myc overexpression in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res* 54, 6348-6352.

Riedl, S.J., Li, W., Chao, Y., Schwarzenbacher, R., and Shi, Y. (2005). Structure of the apoptotic protease-activating factor 1 bound to ADP. *Nature* 434, 926-933.

Rinkenberger, J.L., Horning, S., Klocke, B., Roth, K., and Korsmeyer, S.J. (2000). Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev* 14, 23-27.

Rinnerthaler, M., Jarolim, S., Heeren, G., Palle, E., Perju, S., Klinger, H., Bogengruber, E., Madeo, F., Braun, R.J., Breitenbach-Koller, L., *et al.* (2006). MMI1 (YKL056c, TMA19), the yeast orthologue of the translationally controlled tumor protein (TCTP) has apoptotic functions and interacts with both microtubules and mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1757, 631-638.

Romier, C., Ben Jelloul, M., Albeck, S., Buchwald, G., Busso, D., Celie, P.H., Christodoulou, E., De Marco, V., van Gerwen, S., Knipscheer, P., *et al.* (2006). Co-expression of protein complexes in prokaryotic and eukaryotic hosts: experimental procedures, database tracking and case studies. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 62, 1232-1242.

Rong, Y.P., Bultynck, G., Aromolaran, A.S., Zhong, F., Parys, J.B., De Smedt, H., Mignery, G.A., Roderick, H.L., Bootman, M.D., and Distelhorst, C.W. (2009). The BH4 domain of Bcl-2 inhibits ER calcium release and apoptosis by binding the regulatory and coupling domain of the IP3 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14397-14402.

Roperch, J.P., Alvaro, V., Prieur, S., Tuynder, M., Nemani, M., Lethrosne, F., Piouffre, L., Gendron, M.C., Israeli, D., Dausset, J., *et al.* (1998). Inhibition of presenilin 1 expression is promoted by p53 and p21WAF-1 and results in apoptosis and tumor suppression. *Nat Med* 4, 835-838.

Salvesen, G.S., and Duckett, C.S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 401-410.

Schmidt, I., Fahling, M., Nafz, B., Skalweit, A., and Thiele, B.J. (2007). Induction of translationally controlled tumor protein (TCTP) by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *FEBS J* 274, 5416-5424.

Schroeder, J.T., Lichtenstein, L.M., and MacDonald, S.M. (1996). An immunoglobulin E-dependent recombinant histamine-releasing factor induces interleukin-4 secretion from human basophils. *J Exp Med* 183, 1265-1270.

Schwickart, M., Huang, X., Lill, J.R., Liu, J., Ferrando, R., French, D.M., Maecker, H., O'Rourke, K., Bazan, F., Eastham-Anderson, J., *et al.* (2010). Deubiquitinase USP9X stabilizes MCL1 and promotes tumour cell survival. *Nature* 463, 103-107.

Shimazu, T., Degenhardt, K., Nur, E.K.A., Zhang, J., Yoshida, T., Zhang, Y., Mathew, R., White, E., and Inouye, M. (2007). NBK/BIK antagonizes MCL-1 and BCL-XL and activates BAK-mediated apoptosis in response to protein synthesis inhibition. *Genes Dev* 21, 929-941.

Shindler, K.S., Latham, C.B., and Roth, K.A. (1997). Bax deficiency prevents the increased cell death of immature neurons in bcl-x-deficient mice. *J Neurosci* 17, 3112-3119.

Silverman, J.A., Mindell, J.A., Finkelstein, A., Shen, W.H., and Collier, R.J. (1994). Mutational analysis of the helical hairpin region of diphtheria toxin transmembrane domain. *J Biol Chem* 269, 22524-22532.

Sirois, I., Raymond, M.A., Brassard, N., Cailhier, J.F., Fedjaev, M., Hamelin, K., Londono, I., Bendayan, M., Pshezhetsky, A.V., and Hebert, M.J. (2011). Caspase-3-dependent export of TCTP: a novel pathway for antiapoptotic intercellular communication. *Cell Death Differ* 18, 549-562.

Strasser, A., Harris, A.W., Bath, M.L., and Cory, S. (1990). Novel primitive lymphoid tumours induced in transgenic mice by cooperation between myc and bcl-2. *Nature* 348, 331-333.

Susini, L., Besse, S., Duflaut, D., Lespagnol, A., Beekman, C., Fiucci, G., Atkinson, A.R., Busso, D., Poussin, P., Marine, J.C., *et al.* (2008). TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. *Cell Death Differ* 15, 1211-1220.

- Tagami, S., Eguchi, Y., Kinoshita, M., Takeda, M., and Tsujimoto, Y. (2000). A novel protein, RTN-XS, interacts with both Bcl-XL and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity. *Oncogene* *19*, 5736-5746.
- Telerman, A., and Amson, R. (2009). The molecular programme of tumour reversion: the steps beyond malignant transformation. *Nat Rev Cancer* *9*, 206-216.
- Telerman, A., Tuynder, M., Dupressoir, T., Robaye, B., Sigaux, F., Shaulian, E., Oren, M., Rommelaere, J., and Amson, R. (1993). A model for tumor suppression using H-1 parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 8702-8706.
- Thiele, H., Berger, M., Skalweit, A., and Thiele, B.J. (2000). Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled tumour protein (TCTP). *Eur J Biochem* *267*, 5473-5481.
- Thomas, G., and Luther, H. (1981). Transcriptional and translational control of cytoplasmic proteins after serum stimulation of quiescent Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *78*, 5712-5716.
- Thomas, L.W., Lam, C., and Edwards, S.W. (2010). Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett* *584*, 2981-2989.
- Trump, B.F., and Berezsky, I.K. (1996). The role of altered  $[Ca^{2+}]_i$  regulation in apoptosis, oncosis, and necrosis. *Biochim Biophys Acta* *1313*, 173-178.
- Tsujimoto, Y., Yunis, J., Onorato-Showe, L., Erikson, J., Nowell, P.C., and Croce, C.M. (1984). Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* *224*, 1403-1406.
- Tuynder, M., Fiucci, G., Prieur, S., Lespagnol, A., Geant, A., Beaucourt, S., Duflaut, D., Besse, S., Susini, L., Cavarelli, J., *et al.* (2004). Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 15364-15369.
- Tuynder, M., Susini, L., Prieur, S., Besse, S., Fiucci, G., Amson, R., and Telerman, A. (2002). Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 14976-14981.
- van Delft, M.F., Wei, A.H., Mason, K.D., Vandenberg, C.J., Chen, L., Czabotar, P.E., Willis, S.N., Scott, C.L., Day, C.L., Cory, S., *et al.* (2006). The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* *10*, 389-399.
- Vogler, M., Weber, K., Dinsdale, D., Schmitz, I., Schulze-Osthoff, K., Dyer, M.J., and Cohen, G.M. (2009). Different forms of cell death induced by putative BCL2 inhibitors. *Cell Death Differ* *16*, 1030-1039.
- Wei, J., Kitada, S., Rega, M.F., Emdadi, A., Yuan, H., Cellitti, J., Stebbins, J.L., Zhai, D., Sun, J., Yang, L., *et al.* (2009). Apogossypol derivatives as antagonists of antiapoptotic Bcl-2 family proteins. *Mol Cancer Ther* *8*, 904-913.
- Wei, Y., Sinha, S., and Levine, B. (2008). Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy* *4*, 949-951.
- Wertz, I.E., Kusam, S., Lam, C., Okamoto, T., Sandoval, W., Anderson, D.J., Helgason, E., Ernst, J.A., Eby, M., Liu, J., *et al.* (2011). Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature* *471*, 110-114.
- Westphal, D., Dewson, G., Czabotar, P.E., and Kluck, R.M. (2010). Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochim Biophys Acta* *1813*, 521-531.
- Weyhenmeyer, B., Murphy, A.C., Prehn, J.H., and Murphy, B.M. (2012). Targeting the anti-apoptotic Bcl-2 family members for the treatment of cancer. *Exp Oncol* *34*, 192-199.
- Willis, S.N., and Adams, J.M. (2005). Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* *17*, 617-625.
- Yan, L., Fei, K., Bridge, D., and Sarras, M.P., Jr. (2000). A cnidarian homologue of translationally controlled tumor protein (P23/TCTP). *Dev Genes Evol* *210*, 507-511.

- Yang, Y., Yang, F., Xiong, Z., Yan, Y., Wang, X., Nishino, M., Mirkovic, D., Nguyen, J., Wang, H., and Yang, X.F. (2005). An N-terminal region of translationally controlled tumor protein is required for its antiapoptotic activity. *Oncogene* 24, 4778-4788.
- Yarm, F.R. (2002). Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Mol Cell Biol* 22, 6209-6221.
- Yenofsky, R., Bergmann, I., and Brawerman, G. (1982). Messenger RNA species partially in a repressed state in mouse sarcoma ascites cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 5876-5880.
- Yenofsky, R., Cereghini, S., Krowczynska, A., and Brawerman, G. (1983). Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide. *Mol Cell Biol* 3, 1197-1203.
- Youle, R.J., and Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47-59.
- Zalckvar, E., Berissi, H., Mizrachy, L., Idelchuk, Y., Koren, I., Eisenstein, M., Sabanay, H., Pinkas-Kramarski, R., and Kimchi, A. (2009). DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep* 10, 285-292.
- Zamzami, N., and Kroemer, G. (2001). The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 67-71.
- Zhai, D., Jin, C., Satterthwait, A.C., and Reed, J.C. (2006). Comparison of chemical inhibitors of antiapoptotic Bcl-2-family proteins. *Cell Death Differ* 13, 1419-1421.
- Zhang, D., Li, F., Weidner, D., Mnjoyan, Z.H., and Fujise, K. (2002). Physical and functional interaction between myeloid cell leukemia 1 protein (MCL1) and Fortilin. The potential role of MCL1 as a fortilin chaperone. *J Biol Chem* 277, 37430-37438.
- Zhong, Q., Gao, W., Du, F., and Wang, X. (2005). Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* 121, 1085-1095.
- Zhou, P., Qian, L., Kozopas, K.M., and Craig, R.W. (1997). Mcl-1, a Bcl-2 family member, delays the death of hematopoietic cells under a variety of apoptosis-inducing conditions. *Blood* 89, 630-643.

La thématique du laboratoire de l'équipe d'Adam Telerman porte sur la réversion tumorale, un processus rare au cours duquel les cellules cancéreuses perdent leur phénotype malin, et deviennent des cellules dites révertantes. Plusieurs protéines clefs impliquées dans cette transformation ont été mises en évidence, dont TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein). La protéine TCTP est également impliquée dans la régulation de l'apoptose en interagissant et en renforçant l'activité anti-apoptotique de Mcl-1 et de Bcl-xl, deux protéines appartenant à la famille des Bcl-2. Ce projet s'attache à comprendre en termes moléculaires le mode d'action de TCTP au cours de l'apoptose. Dans cet objectif nous nous sommes focalisés sur les modes de reconnaissances entre TCTP et ces deux protéines, Mcl-1 et Bcl-xL. Dans ce contexte nous avons développé une collaboration avec l'équipe de Jean Cavarelli du département de biologie structurale intégrative de l'IGBMC. Notre objectif a consisté à isoler et à caractériser de façon biochimique, biophysique et structurale les complexes TCTP/Mcl-1 et TCTP/Bcl-xl. Nous avons, après optimisation, déterminé les conditions de formation des complexes TCTP/Mcl-1 et TCTP/Bcl-xl. De façon intéressante, ces complexes sont stables à pH basique, faible concentration ionique et favorisés par chauffage. Grâce à une analyse combinée par ultracentrifugation analytique, SEC-MALS et spectrométrie de masse en condition native, nous avons pu déterminer la formation d'hétérotétramères de TCTP/Mcl-1 et de TCTP/Bcl-xl. Nous avons également pu identifier les domaines d'interaction de ces complexes par mutagénèse dirigée, et montrer que la partie N terminale de TCTP et le sillon hydrophobe de Bcl-xl sont impliqués dans ces interactions. Il s'agit de la première caractérisation biochimique et biophysique de complexes impliquant TCTP. Ces données fournissent les premières bases pour l'étude structurale de complexes avec TCTP.

Adam Telerman's team research focuses on tumor reversion, a rare process in which cancer cells lose their malignant phenotype, and therefore become revertant. Many key proteins were showed to be involved in this transformation, including TCTP (translationally Controlled Tumor Protein). TCTP protein is also involved in apoptosis regulation by interacting and strengthening the anti-apoptotic activity of Mcl-1 and Bcl-xl, two proteins from Bcl-2 family. This work is dedicated to understand the molecular mechanism underlying TCTP action in apoptosis. Here, we focus on TCTP/Mcl-1 and TCTP/Bcl-xl complexes. Within a collaboration with the team of Jean Cavarelli from the department of integrative structural biology at IGBMC we managed to isolate and determine the biochemical properties of these complexes. We showed that TCTP:Mcl1 and TCTP:Bcl-xL have the particularity to be sensitive to pH, ionic strength and temperature. Using analytical ultracentrifugation, SEC-MALS and native mass-spectrometry we were able to characterize both complexes and localize their binding interface. TCTP:Mcl1 and TCTP:Bcl-xL can form heterotetramers, involving the N-terminal part of TCTP and the BH3-groove of Bcl-xL. This work provides the first biophysical and biochemical study of complexes involving TCTP and can be used as a basis for further structural studies on TCTP complexes.

