



**HAL**  
open science

# Etudes moléculaires et fonctionnelles des gènes TSAP6 et TCTP

Dominique Duflaut

► **To cite this version:**

Dominique Duflaut. Etudes moléculaires et fonctionnelles des gènes TSAP6 et TCTP. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris Sud - Paris XI, 2008. Français. NNT : . tel-00293914

**HAL Id: tel-00293914**

**<https://theses.hal.science/tel-00293914>**

Submitted on 8 Jul 2008

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

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

**Université PARIS XI**  
**Faculté de Médecine Paris Sud**

Année 2008

N° attribué par la bibliothèque

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI**

Champ disciplinaire : Médecine

Ecole Doctorale de rattachement: **CANCEROLOGIE**

Présentée et soutenue publiquement par

**Dominique DUFLAUT**

Le 15 avril 2008

**Etudes moléculaires et fonctionnelles des gènes TSAP6 (Tumor Suppressor  
Activated Pathway 6) et TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein) :**  
**Cibles pharmacologiques anti-tumorales**

Directeur de thèse : Adam TELERMAN

Jury composé de :

Pr. Christian AUCLAIR.....ENS, Cachan.....Président  
Pr. Adam TELERMAN.....ENS, Cachan.....Direct. de thèse  
Pr. Bruno GOUD.....Institut Curie, Paris .....Rapporteur  
Pr. Franck STURTZ.....Université de Limoges.....Rapporteur  
Pr. Anita LEWIT-BENTLEY.....ENS, Cachan.....Examinatrice

# **SOMMAIRE**

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>5</b>
<b>ABBREVIATIONS .....</b>	<b>6</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>7</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>9</b>
<b>ETUDES MOLECULAIRES ET FONCTIONNELLES DES GENES TSAP6 ET TCTP, CIBLES PHARMACOLOGIQUES ANTI-CANCEREUSES.....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>11</b>
<b>A - MECANISMES MOLECULAIRES DE LA TRANSFORMATION : BIOLOGIE DU CANCER .....</b>	<b>14</b>
<b>A - I - Les oncogènes .....</b>	<b>16</b>
A - I - 1 . Généralités .....	16
A - I - 2 . Mécanismes d'activation des proto-oncogènes .....	17
A-I-2-1. Mutations ponctuelles.....	17
A-I-2-2. Amplification génique .....	18
A-I-2-3. Translocations chromosomiques. ....	18
<b>A - II - Les gènes suppresseurs de tumeurs.....</b>	<b>19</b>
A - II - 1 . Généralités .....	19
A - II - 2 . PTEN : Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten.....	21
A-II-2-1. L'implication de PTEN dans les cancers.....	21
A-II-2-2. PTEN dans la voie de signalisation mTOR (mammalian target of rapamycin).....	22
A - II - 3 . P53 : gène suppresseur de tumeurs .....	25
A-II-3-1. P53 et le cancer .....	25
A-II-3-2. P53 est un facteur de transcription .....	26
A-II-3-3. L'autorégulation par Mdm2 .....	27
A-II-3-4. P53 et le cycle cellulaire .....	28
A - II - 4 . Les facteurs épigénétiques .....	31
<b>A - III - L'instabilité génomique .....</b>	<b>31</b>
<b>B - REVERSION TUMORALE .....</b>	<b>33</b>
<b>B - I - Principe : suppression versus réversion .....</b>	<b>33</b>
B - I - 1 . La suppression du phénotype tumoral .....	33
B - I - 2 . La réversion tumorale.....	33
<b>B - II - Modèle cellulaire M1/LTR6 : identification TSIP et TSAP.....</b>	<b>35</b>
<b>B - III - Modèles des révertants cellulaires.....</b>	<b>35</b>
B - III - 1 . Isolement des cellules révertantes.....	36
B - III - 2 . Identification des gènes majeurs de la réversion tumorale.....	37
<b>C - DEVELOPPEMENT DE DROGUES POUR LE TRAITEMENT DES CANCERS .....</b>	<b>38</b>

C - I -	<i>Exemples de nouvelles thérapeutiques du cancer</i> .....	39
C - I - 1 .	Herceptin : Anticorps anti-récepteur EGF (Epidermal Growth Factor).....	39
C - I - 2 .	Glivec ® (imatinib mesylate), Inhibiteurs de tyrosine kinase : Traitement de la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) à celui des cancers bronchiques à petites cellules .....	41
C - I - 3 .	Les protéines anti-apoptotiques comme cibles thérapeutiques, exemple de la molécule Obatoclast (GX15-070).....	44
C - I - 4 .	Induction de l'apoptose par des inhibiteurs d'interaction protéine-protéine : exemple des nutlins .....	45
<b>REVUES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....		<b>47</b>
D -	<i>TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOR PROTEIN : TCTP</i> .....	47
D - I -	<i>Présentation de la protéine</i> .....	47
D - I - 1 .	Caractéristiques moléculaires de TCTP .....	47
D - I - 2 .	Activités extracellulaires de TCTP.....	49
D - I - 3 .	Interactions moléculaires .....	50
D - II -	<i>Principaux travaux réalisés sur la protéine TCTP au sein de notre laboratoire</i> .....	55
D - III -	<i>Voie de signalisation de l'apoptose au niveau des mitochondries</i> .....	57
D - III - 1 .	Bax et la famille Bcl-2.....	61
D-III-1-1.	Localisation cellulaire de Bax.....	62
D-III-1-2.	Activation de Bax .....	64
E -	TSAP6 (TUMOR SUPPRESSOR ACTIVATED PATHWAY 6) .....	65
E - I -	<i>Présentation de la protéine TSAP6</i> .....	65
E - II -	<i>Quelques notions d'hématologie</i> .....	68
E - II - 1 .	L'érythropoïèse .....	68
E - II - 2 .	L'anémie .....	69
E - II - 3 .	Le cycle du récepteur à la transferrine au cours de la maturation des réticulocytes .....	70
E - III -	<i>les voies de sécrétions</i> .....	73
E - III - 1 .	Les exosomes.....	73
E-III-1-1.	La biogenèse des exosomes.....	73
E-III-1-2.	Leurs fonctions biologiques .....	76
E - III - 2 .	La voie de sécrétion dite classique.....	77
E-III-2-1.	Quelques définitions :.....	77
E-III-2-2.	Le trafic intracellulaire des protéines .....	78
E-III-2-3.	Les mécanismes moléculaires .....	79
<b>RESULTATS</b> .....		<b>82</b>
F -	TSAP6 REGULE LA SECRETION D'EXOSOMES INDUITE PAR P53.....	82
F - I -	<i>Modèle murin TSAP6 knock out</i> .....	82
F - II -	<i>Article I : Exosome secretion, including the DNA-damage-induced p53 dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice</i> .....	87
G -	TCTP PROTEGE LES CELLULES DE L' APOPTOSE EN INHIBANT BAX AU NIVEAU DES MITOCHONDRIES: .....	88

<i>G - I - Homologie de structure entre les hélices H2-H3 de TCTP et les hélices H5-H6 de BAX :</i>	88
<i>G - II - Analyses de modèles murins pour le gène <i>tpt-1</i></i>	91
G - II - 1 . Genè, pseudogènes et régulation de <i>tpt-1</i>	91
G - II - 2 . Les souris ko TCTP présentent un phénotype de mort embryonnaire	92
<i>G - III - Article II : TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing Bax function,</i>	94
G-III-1-1. Figures et Tables supplémentaires	95
<b>H - TCTP, UNE NOUVELLE CIBLE THERAPEUTIQUE</b>	98
<i>H - I - Des antihistaminiques à la sertraline et la thioridazine</i>	98
H - I - 1 . Corrélation entre l'effet cytotoxique de molécules et l'expression de TCTP	98
H - I - 2 . Mécanisme d'action de la sertraline et de la thioridazine	99
<i>H - II - Article III: Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion. ...</i>	105
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>	<b>108</b>
I - DISCUSSION DU CONCEPT DE REVERSION TUMORALE	108
J - DISCUSSION DES RESULTATS	110
K - CONCLUSION ET PERSPECTIVES	119
<b>EPILOGUES</b>	<b>121</b>
<b>MATERIELS ET METHODES</b>	<b>123</b>
L - PRINCIPE DE REALISATION DE SOURIS KNOCK-OUT (KO)	123
L - I - 1 . Mutagenèses ciblées	124
L - I - 2 . Recombinaison homologue	124
L - I - 3 . Knock-out et knock-in de gène	124
L - I - 4 . Knock-out de gène conditionnel	124
L - I - 5 . Système Cre/loxP	125
M - METHODES DES FIGURES 26 ET 29	126
N - PRINCIPE DU BIACORE	128
<b>BIBLIOGRAPHIE PERSONNELLE</b>	<b>129</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>130</b>
<b>ANNEXE 1 : ARTICLE FIUCCI ET AL 2003</b>	<b>154</b>
<b>ANNEXE 2 : ARTICLE FIUCCI ET AL. 2004</b>	<b>155</b>

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIG 1. REPRESENTATION DE LA CASCADE DE SIGNALISATION mTOR. ....	23
FIG 2. BOUCLE D' AUTO-REGULATION DE P53 PAR MDM2 .....	28
FIG 3. LA PROTEINE P53 EST ACTIVEE PAR UNE VARIETE DE STRESS ET PAR LES DOMMAGES AU NIVEAU DE L' ADN. .....	30
FIG 4. HISTORIQUE DE LA REVERSION Tumorale .....	34
FIG 5. TECHNIQUE D' ISOLEMENT DES CELLULES REVERTANTES A L' AIDE DU PARVOVIRUS-H1 .....	36
FIG 6. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES INTERACTIONS ET FONCTIONS DE TCTP DANS LA CELLULE : .....	53
FIG 7. TCTP SEQUENCE.....	54
FIG 8. LA CASCADE APOPTOTIQUE DES CASPASES .....	60
FIG 9. REPRESENTATION DE MEMBRES DE LA FAMILLE BCL-2 .....	61
FIG 10. ACIDES AMINES CRUCIAUX ET DOMAINES DE BAX IMPLIQUES DANS SES FONCTIONS APOPTOTIQUES ET/OU LE CIBLAGE DES MITOCHONDRIES. ....	63
FIG 11. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE DE TSAP6.....	66
FIG 12. DIAGRAMME REPRÉSENTANT L' HÉMATOPOÏÈSE. ....	69
FIG 13. VOIE DU TfR AU COURS DE LA MATURATION DES RETICULOCYTES. ....	71
FIG 14. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU TfR.....	72
FIG 15. LE CYCLE DE LA TRANSFERRINE. ....	72
FIG 16. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA FORMATION DES MVBS ET DES EXOSOMES DANS LA PRESENTATION ANTIGENIQUE.....	74
FIG 17. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES PROTEINES DANS LE GOLGI .....	79
FIG 18. TRANSPORT DES PROTEINES A TRAVERS LE SYSTEME RETICULUM/GOLGI.....	81
FIG 19. TSAP6 EST UNE PROTEINE GLYCOSYLEE. ....	82
FIG 20. LOCALISATIONS INTRACELLULAIRES DE LA PROTEINE TSAP6 ENDOGENE .....	83
FIG 21. REDUCTION DU BLOCAGE DE LA PHASE G2/M DU CYCLE DANS LES MEFs TSAP6 KNOCK-OUT.....	84
FIG 22. PHENOTYPE DES SOURIS TSAP6 PM.....	86
FIG 23. REPRESENTATION DE LA STRUCTURE 3D DE TCTP.....	89
A-D REPRESENTE LES FEUILLETS $\beta$ . H1-H3 REPRESENTE LES HELICES $\alpha$ . LA STRUCTURE EN EPINGLE A CHEVEUX FORMEE PAR H2-H3 PRESENTE UNE FORTE HOMOLOGIE DE STRUCTURE AVEC LES HELICES $\alpha 5$ — $\alpha 6$ DE BAX ..	89
FIG 24. LOCALISATION DE LA PROTEINE CHIMERE BTB (BAX-TCTP-BAX).....	91
FIG 25. ANALYSES PROTEIQUES PAR WESTERN BLOT DES MEFs ISSUS D' EMBRYONS SAUVAGES ET HETEROZYGOTES POUR TPT1. ....	92
FIG 26. LIAISON DIRECTE ENTRE LES DROGUES, THIORIDAZINE ET SERTRALINE, SUR TCTP.....	100
FIG 27. EFFET DES DROGUES SUR LA STRUCTURE DE TCTP. ....	101
FIG 28. SECRETION DE TCTP SOUS L' INFLUENCE DES DROGUES PAR LES CELLULES MEFs .....	103
FIG 29. EFFET DES DROGUES, SERTRALINE ET THIORIDAZINE, SUR L' INTERACTION TCTP-TSAP6.....	104
FIG 30. GENERATION DE KNOCK-OUT DE GENE CONDITIONNEL VERSUS CLASSIQUE .....	123

## ABBREVIATIONS

ADNc	Acide Desoxyribo Nucléique complémentaire
ARNm	Acide Ribo Nucléique messenger
Bcl	B-cell lymphomes
BH domaine	Bcl-2 homologie
kDa	kilo Dalton
ko	knock-out
Mdm2	Mouse double minute 2
MEFs	Mouse Embryo Fibroblasts
pb	paires de bases
TCTP	Translationally Controlled Tumor Protein
TSAP6	Tumor Suppressor Activated Pathway

Nomenclature : les gènes sont écrit en minuscule et en italique, les protéines sont écrits droit en majuscule ou en minuscule

## REMERCIEMENTS

Grâce à Adam Telerman et Robert Amson, j'ai pu réalisé mon doctorat dans un laboratoire d'avant-garde au sein d'une équipe de scientifiques remarquables, avec des collaborations externes de très haut niveau, le tout dans des conditions humaines très avantageuses. Je les remercie sincèrement de m'avoir toujours soutenue et accompagnée malgré des épisodes difficiles.

Je remercie le Pr. Auclair d'avoir toujours été compréhensif par rapport à mes différentes difficultés et de m'avoir fait l'honneur d'être le président de mon jury. Je souhaiterais remercier le Dr Bruno Goud et le Pr. Franck Sturtz d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit malgré le peu de temps qui leur était impartis. Merci également à Dr Anita Lewit-Bentley d'avoir accepté de participer à ma soutenance en tant qu'examinatrice.

Je remercie Muriel Nicoletti pour son aide précieuse et pour avoir toujours été à l'écoute et compréhensif en cas de difficultés.

Ce travail n'aurait pas été possible sans la coopération et le soutien de tout le laboratoire.

Je remercie du fond du cœur mon binôme Alexandra, ensemble nous avons surmonté des obstacles en tout genre et sans elle je n'aurais jamais pu finir cette thèse. Un énorme merci à Stéphanie et Laurent dont leur travail a beaucoup contribué à la réalisation de mon doctorat. Et je n'oublie pas Giusy, Séverine, Anne, Pamela, Marcel et Sylvie, avec qui j'ai étroitement travaillé et qui m'ont beaucoup appris. Je remercie aussi tous les autres collaborateurs de la société MEL, auprès de qui j'ai eu le plaisir de travailler.

Je tiens également à remercier les personnes qui ont fortement contribué à l'aboutissement de ces travaux : Pierre Chambon, Michel Vidal, Jean-Claude Martinou, Jean Cavarelli, Dino Moras, Jean-Christophe Marine et leur équipe respective.

J'ai une pensée particulière pour toutes les personnes que j'ai rencontré tout au long de mon parcours universitaire et professionnel, et qui m'ont toujours poussé à progresser. Ce message s'adresse à Alain Chapel (CEA), Pascal Poncet (Institut Pasteur), Patricia Soulard (Pfizer) et François Hamy (Aventis).



Je remercie ma cousine Valérie pour ses précieux conseils, ma tante Nicole et Christine, qui m'ont donné un sacré coup de pouce. Je remercie aussi toute ma famille pour sa confiance et son soutien permanent ; particulièrement, ma mère sans qui je n'aurais pu rédiger ce mémoire dans un délai aussi court, merci maman. Je remercie mes amis dont la présence fût un vrai bol d'air pur.

Une pensée particulière à mon futur époux, Sébastien, qui a fait preuve d'une patience incroyable et insoupçonnée. Et j'embrasse très fort mon fils Nahel, sa présence m'a donné la force d'aller jusqu'au bout pour qu'il soit plus tard fier de sa maman.

## RESUME

La réversion tumorale est un processus biologique de fréquence rare par lequel des cellules tumorales parviennent à quitter leur état malin pour retrouver un phénotype tumoral significativement atténué. L'objectif de notre équipe est de caractériser les voies moléculaires de la réversion tumorale et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques anti-cancéreuses. Une première approche a permis d'identifier des gènes dont l'expression est modifiée suite à l'activation de P53. Une seconde approche a mis en évidence les gènes régulés lors de la réversion tumorale. Nous avons ainsi identifiés de nombreux gènes d'intérêt parmi lesquels nous avons choisi d'étudier *tpt-1* et *tsap6*.

*Tpt1*, codant pour la protéine TCTP (Translationally Controlled Tumor Protein), est le gène le plus différentiellement exprimé lors du processus de réversion tumorale pour la majorité des modèles étudiés. Le fait que TCTP soit un gène régulateur de la croissance cellulaire, son implication dans l'apoptose et les expériences indiquant que TCTP pourrait être une cible thérapeutique pour le cancer, ont justifié sa cristallisation. Nos analyses structurales ont fait paraître une forte homologie entre les hélices H2 et H3 de TCTP humain et les hélices  $\alpha$  H5-H6 de Bax, protéine pro-apoptotique membre de la famille Bcl-2. Ces résultats soulèvent la question suivante : les hélices H2-H3 sont-elles porteuses de l'activité anti-apoptotique de TCTP? Des analyses fonctionnelles au niveau des mitochondries ont été réalisées afin d'étudier le rôle de TCTP par rapport à l'effet pro-apoptotique de Bax.

Pour mieux comprendre les fonctions de TCTP *in vivo*, l'élaboration d'une lignée de souris *knock-out* a été réalisée. Il a fallu au préalable définir le gène *tpt-1* fonctionnel dans la souris et faire les constructions permettant de désactiver ce dernier. Nos premières observations montrent que les souris TCTP *knock-out* ne sont pas viables et que TCTP est indispensable au développement embryonnaire.

En parallèle, TSAP6 (Tumor Suppressor Activated Pathway 6) a également été identifié comme étant un partenaire protéique de TCTP. TSAP6 est une protéine à 6 domaines transmembranaires activée par P53. La fonction de TSAP6 n'étant pas bien connue, nous avons entrepris de l'analyser dans des modèles murins. Le premier modèle est une lignée de souris dans laquelle le gène *tsap6* porte une mutation sur le codon Gln-395. Le phénotype

observé est une anémie microcytaire. Nous avons également établi une lignée murine *knock-out* (ko) pour *tsap6* présentant un phénotype ressemblant. Le rôle de TSAP6 dans la régulation de la maturation des réticulocytes a été étudié. Les réticulocytes des souris TSAP6 ko présentent un retard d'expulsion du récepteur à la transferrine par les exosomes. Ces résultats montrent que TSAP6 contrôle la sécrétion d'exosomes apportant ainsi une explication au phénotype de ces souris. L'utilisation de ce modèle animal, nous a également permis de mieux définir le rôle de TSAP6 dans la sécrétion non-classique de protéines, dépendante de P53.

En conclusion, ce travail a permis d'approcher de nouveaux mécanismes d'action pour TCTP et TSAP6 dans le cadre de la réversion tumorale.

# Etudes moléculaires et fonctionnelles des gènes TSAP6 et TCTP, cibles pharmacologiques anti-cancéreuses.

## Introduction générale

Avec 280 000 nouveaux cas et 150 000 morts par an, le cancer est la première cause de décès prématuré en France. Pour la première fois, en France, le cancer est la première cause de décès, d'après le Bulletin épidémiologique hebdomadaire (BEH) de l'Invs rendu public en septembre 2007.

Cependant, ces 25 dernières années ont permis de faire d'incroyables progrès dans la lutte contre le cancer. Les progrès des traitements et de la recherche donnent de bons résultats. Un adulte sur deux guérit du cancer et 70% environ des enfants guérissent du cancer. Plus de 60% des malades sont en rémission au bout de 5 ans. On obtient la guérison de plus de 95% pour le cancer du testicule. Et les taux de guérison ont augmenté pour les cancers du sein, les leucémies et les lymphomes.

Peu à peu, on comprend les mécanismes complexes de la maladie, une étape indispensable pour mieux la combattre. Les connaissances dans le domaine du cancer ont connu une explosion. On savait que les cancers étaient liés à un excès de prolifération cellulaire, aujourd'hui on connaît maintenant de nouveaux mécanismes :

- ✓ On intègre mieux l'implication de l'instabilité génomique dans la cancérisation ;
- ✓ Les cancers peuvent être dus à un défaut de mort cellulaire (apoptose) ;
- ✓ Les mécanismes qui permettent à une cellule de se répliquer (cycle cellulaire) ;
- ✓ On sait que certains gènes sont impliqués dans la transmission de signaux de prolifération des cellules cancéreuses (oncogènes) ;
- ✓ Les mécanismes qui permettent l'éclosion de certains cancers familiaux (gènes suppresseurs de tumeurs) ;
- ✓ On commence à comprendre comment la tumeur initie la formation de néovaisseaux nécessaires à son développement (angiogenèse) ;

✓ On cherche à inhiber la dissémination des tumeurs dans l'organisme (métastase).

Alors que les médicaments ne visaient qu'à limiter la prolifération des cellules cancéreuses, ils pourront demain avoir de nouvelles cibles en corrigeant un défaut de mort cellulaire, en inhibant le cycle cellulaire, la transmission de signaux de prolifération cellulaire ou la dissémination des tumeurs dans l'organisme. Sous ce modèle, de nouvelles molécules en développement sont appelées "smart drugs", ce sont des molécules intelligentes qui visent une cible spécifique au niveau cellulaire et permettent ainsi de diminuer les effets secondaires du traitement. Comme par exemples, deux molécules commercialisées en France qui bloquent les récepteurs de certains facteurs de croissance cellulaire et inhibent ainsi la transmission du signal de multiplication cellulaire :

- ✓ L'Herceptin<sup>TM</sup>, un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur Erb2 du facteur de croissance HER2, est administrée en complément de la chimiothérapie conventionnelle a un effet positif sur 20 % des cancers du sein
- ✓ Le Glivec<sup>TM</sup>, un inhibiteur "spécifique" de la tyrosine kinase BCRL-ABL, permet d'obtenir des rémissions de longue durée dans les leucémies myéloïdes chroniques.

Dans notre laboratoire, nous avons choisi d'étudier un phénomène original qui est la réversion tumorale et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques anti-cancéreuses en relation avec ce mécanisme. Ce processus biologique spontanée qui permet à une cellule cancéreuse d'acquérir un phénotype moins tumorale, c'est-à-dire un ralentissement de la croissance, un pouvoir tumorigène diminué, une inhibition de contact retrouvée pour la croissance cellulaire. Les cellules issues de ce phénomène sont appelées cellules révertantes. Nous avons mis au point une méthode de sélection pour développer des lignées de cellules révertantes à partir de différents types de tumeurs (Telerman et al. 1993, Tyunder et al. 2002, Tyunder et al. 2004). Grâce à ces modèles, 263 gènes ont été trouvé activés ou inhibés au cours de la réversion (Tuynder et al. 2002). Parmi eux, certains gènes ont montré qu'ils pouvaient par leur seule surexpression ou leur inhibition amorcer un processus de suppression tumorale. Ce sont les gènes présenilin-1, siah-1 (Seven In Absentia Homologue), tpt-1 codant pour la protéine TCTP (Translationally Controled Tumor Protein) et tsap6 (Tumor Suppressor

Activated Pathway) (Roperch et al., 1998, Tyunder et al. 2002, Tyunder et al. 2004, Susini et al. 2001, Passer et al. 2003).

Mon travail au cours de cette thèse a consisté à l'étude de trois de ces gènes, *siah-1*, *tpt-1* et *tsap6*, au niveau de leur régulation et de leur fonction biologique. La première étape a été de mettre en place une stratégie de production de souris *knock-out* (ko) pour ces trois gènes, cette étape nous a permis entre autre de définir le gène fonctionnel chez la souris pour *tpt-1* (Fiucci et al. 2003) et de montrer que le gène *siah-1b* est directement régulé par la protéine p53 (Fiucci et al. 2004), p53 étant un des gènes suppresseurs de tumeurs le mieux caractérisé, plus de la moitié des cancers humains présentent une ou plusieurs mutations de ce gène (Aylon and Oren, 2007, Voudsen and Lane, 2007) . En parallèle de l'élaboration de ces modèles murins en collaboration avec l'Institut Clinique de la Souris de Strasbourg, et suite à nos résultats antérieurs montrant que TCTP est une cible thérapeutique anti-cancéreuse à très fort potentiel (Tuynder et al. 2004), nous avons produit le cristal de TCTP en collaboration avec le Département de Biologie et Génomique Structurale de l'IGBMC de Strasbourg, afin de mieux comprendre son mode d'action au sein de la cellule, en mettant en relation la structure de la protéine et ses fonctions biologiques. Les analyses cristallographiques ont montré une forte homologie de structure entre TCTP et le *pore forming* domaine de la molécule Bax, protéine pro-apoptotique membre de la famille Bcl-2. Ces différentes expériences nous ont permis de définir le domaine responsable de l'activité anti-apoptotique de TCTP (Susini et al. 2008). De plus l'analyse des souris *knock-out* pour le gène *tpt-1* nous montre que TCTP est indispensable à l'embryogenèse et de ce fait il nous a été impossible d'obtenir des souris viables ko pour *tpt-1*, par une stratégie de désactivation totale du gène dans tout l'organisme. Par ailleurs, l'analyse des souris ko pour le gène *tsap6* confirme l'implication de la protéine TSAP6 dans l'apoptose et le cycle cellulaire et surtout nous permet de démontrer que TSAP6 est indispensable à la sécrétion d'exosomes induite par p53, vésicules de sécrétions permettant l'élimination de protéines intracellulaires et la communication intercellulaire.

Dans ce mémoire sont présentés les travaux réalisés sur la fonction biologique et la structure des protéines TCTP et TSAP6, appuyés sur l'analyse de leurs souris ko respectives.

## **A - Mécanismes moléculaires de la transformation : biologie du cancer**

Plusieurs changements génétiques sont nécessaires pour induire le développement d'un cancer. L'incidence de l'apparition d'un cancer chez l'homme augmente avec l'âge, typiquement, il faut 6 à 7 changements génétiques sur une durée de 20 à 40 ans pour induire la cancérisation. Cependant, dans certains cas rares, la probabilité de développer un cancer peut-être héréditaire, dans ce cas, un seul changement génétique est nécessaire mais pas suffisant pour induire la cancérisation. C'est alors l'accumulation de ces événements, hérités et/ou sporadiques qui va aboutir au développement du cancer. On peut distinguer, schématiquement, trois étapes dans la genèse d'un cancer : l'initiation, la promotion et la progression.

**L'initiation** correspond à une mutation d'une ou plusieurs bases de l'ADN, celle-ci peut être spontanée ou induite après l'exposition à un carcinogène (physique, chimique, viral). Les cellules initiées ne sont pas des cellules tumorales, elles n'ont pas encore acquis d'autonomie de croissance.

**La promotion** correspond à la prolifération clonale des cellules initiées. La plupart des agents initiateurs ne sont pas capables à eux seuls de provoquer un cancer. C'est l'accroissement du nombre de divisions cellulaires qui augmente le risque de mutations, mais aussi le risque de voir ces mutations transmises aux cellules filles, sans réparation de l'ADN ou sans mort cellulaire.

**La progression** correspond à l'acquisition des propriétés de multiplication non contrôlée, l'acquisition de l'indépendance vis à vis des facteurs de croissance et de l'ancrage, la perte de la différenciation, l'invasion locale et métastatique (c'est-à-dire à distance de la tumeur d'origine), la formation de néo-vaisseaux permettant l'irrigation de la tumeur (angiogénèse).

La transformation de cellules normales en cellules cancéreuses met en jeu plusieurs altérations génétiques successives. Les modifications de l'expression des gènes et de leurs produits peuvent résulter de modifications génétiques et épigénétiques. Ces altérations génétiques aboutissent à la sélection progressive de cellules anormales présentant des avantages sélectifs de prolifération et de survie, puis elles acquièrent des capacités de néoangiogénèse, d'invasion et de formation de métastases.

Ces avantages sélectifs caractéristiques des cellules cancéreuses sont essentiellement :

**Une capacité de croissance exagérée** : production autocrine de facteurs de croissance, suppression des récepteurs pour les facteurs de croissance, mutation et activation constitutives de ces récepteurs...

**Perte de contrôle de la prolifération** : inactivation des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire (Rb, p53, inhibiteurs des cdk...)

**Echappement à l'apoptose** : sécrétion autocrine de facteurs de survie (IGF1, IGF2, IL-3), hyper expression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl2...

**Capacités à se diviser de façon illimitée** : immortalisation par dérégulation du gène de la télomérase, activation de mécanismes alternatifs permettant la maintenance des télomères.

Capacités à induire une néo-angiogénèse.

Capacités d'invasion et de métastases.

Les altérations proprement génétiques observées au cours de la transformation maligne peuvent être des mutations, des translocations, divers réarrangements chromosomiques, des délétions, des amplifications géniques, des pertes ou des gains de chromosomes entiers. Les principales cibles de ces altérations sont des gènes impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation, la sénescence, l'apoptose et le contrôle du maintien de l'intégrité du génome (mécanisme de réparation de l'ADN, points de contrôle du cycle cellulaire ...). Les gènes ayant un rôle crucial dans la transformation maligne sont classés sous deux types : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs.

Les **proto-oncogènes** sont des gènes dont le rôle normal est de favoriser la division cellulaire. Lorsqu'ils subissent certaines mutations, ils deviennent des **oncogènes** qui produisent une protéine en plus grande quantité et/ou hyperactive (mutation "gain de fonction"), ce qui entraîne une prolifération anarchique des cellules.

Les **gènes suppresseurs** de tumeurs sont au contraire soit des molécules de surveillance de l'intégrité de la cellule qui sont chargées de détecter les anomalies de la cellule (mutation, lésion, changements de l'environnement...); soit des freins du cycle cellulaire qui sont activés en cas de défauts détectés dans la cellule; soit des molécules induisant la mort cellulaire programmée des cellules.



Lorsqu'ils sont mutés, les gènes suppresseurs perdent leur activité (mutation "perte de fonction"). S'ils ne sont pas réparés, il n'y a plus de frein à la prolifération, ni induction de l'apoptose, ce qui entraîne une croissance anarchique.

Ces mécanismes sont décrits dans le livre Weinberg RA, *the biology of cancer*, 2007 et dans les revues Cavenee and White, 1995; Vogelstein and Kinzler, 1993.

## **A - I - Les oncogènes**

### **A - I - 1 . Généralités**

Voir livre : Lewin B, *Genes VIII*, 2004.

La transformation maligne peut se produire de manière spontanée, induite par certains agents chimiques ou être la conséquence d'une infection par des virus inducteurs de tumeurs. Il existe plusieurs classes de virus tumoraux, comprenant des virus à ADN et à ARN. L'activité transformante de ces virus est liée à certains gènes présents dans le génome du virus. Ces gènes sont nommés oncogènes car ils sont capables d'induire la transformation des cellules infectées.

Les oncogènes viraux et leurs homologues cellulaires sont décrits en utilisant le préfixe *v* pour viral et *c* pour cellulaire. Le gène cellulaire normal n'est pas oncogénique, il est appelé **proto-oncogène**, ce n'est que lorsqu'il est activé qu'il devient oncogénique, il est alors appelé **oncogène**. Une mutation sur un seul des deux allèles est suffisante pour être oncogénique, cette mutation dominante induit l'activation du produit du gène muté, et donc correspond à un gain de fonction.

Les proto-oncogènes sont des gènes qui sont à l'origine cellulaire. Cependant, certains oncogènes ont été capturés par les virus, c'est pourquoi leur découverte a suivi celle de la virologie, notamment l'étude des rétrovirus, lorsque furent mis en évidence dans le génome viral des fragments du génome de la cellule infectée (Bishop et al., 1985). Les travaux de Rous menés dès 1910 ont permis la découverte des rétrovirus. Lors de ces travaux, Rous a montré que le sarcome et la leucémie pouvait être induit chez des animaux sains en leur injectant un extrait filtré, provenant d'un sarcome de poulet et ne contenant pas de cellules. Plus tard, dans les années 70, les travaux réalisés par Stehelin, Bishop, Varmus et Vogt ont permis de démontrer que l'oncogène viral du sarcome (*v-src*) avait une origine cellulaire (Stehelin et al., 1976). Ensuite, d'autres études ont permis de découvrir d'autres oncogènes et

de montrer qu'ils existaient un homologue cellulaire appelé proto-oncogène. Les proto-oncogènes sont des gènes cellulaires normaux qui sont impliqués dans la croissance cellulaire et la différenciation. Les oncogènes, codent pour des protéines, exerçant un effet positif sur la division cellulaire. L'étude précise des mécanismes d'action permet de distinguer plusieurs familles de proto-oncogènes, se basant sur le rôle physiologique de la protéine normale. Il peut s'agir notamment de facteurs de croissance et de leurs récepteurs, de protéines impliquées dans la transduction du signal, de facteurs de transcription, de protéines contrôlant le cycle cellulaire, qui sous la forme mutée aboutissent à une amplification de leur fonction.

### **A - I - 2 . Mécanismes d'activation des proto-oncogènes**

L'activation des proto-oncogènes peut être induite par une mutation ponctuelle, une amplification génique ou une translocation chromosomique.

#### **A-I-2-1. Mutations ponctuelles**

Les mutations ponctuelles sont souvent dues à des carcinogènes chimiques ou à des rayonnements. C'est par exemple le cas des gènes de la famille *RAS*. Les protéines *RAS* sont des protéines G qui interviennent dans la transduction du signal, elles existent sous deux formes : inactives quand elles sont liées aux molécules de GDP et activées quand elles sont liées aux molécules de GTP. La protéine *RAS* inactive sous forme GDP est activée sous forme GTP, lorsque par exemple le facteur de croissance EGF (Epidermal Growth Factor) se lie à son récepteur (EGF-R). Lorsque la protéine *RAS* est mutée (ex : Gly12Val pour H -ras), elle ne peut plus interagir avec la protéine GAP (GTPase activating protein), qui interagit avec *RAS* et permet l'hydrolyse du GTP en GDP, ce qui aboutit à l'inactivation de la protéine (Barbacid et al., 1987; Lowy and Willumsen, 1993; Stehelin et al., 1976). L'absence de la désactivation de *RAS* par GAP, induit une augmentation du signal notamment une augmentation de la croissance ou de la prolifération via une stimulation excessive des gènes de croissance.

Ceci est un exemple d'activation d'oncogène par mutation ponctuelle, de nombreux autres oncogènes peuvent être activés de cette manière. Ce type de mutation abolit la régulation de la transduction du signal et aboutit à une augmentation de l'amplitude du signal transmis.

### **A-I-2-2. Amplification génique**

Dans certains cancers, les oncogènes ne sont pas nécessairement mutés, mais peuvent être amplifiés. Ces régions d'amplification génique peuvent être observées sur les caryotypes, on peut distinguer deux types de régions :

Soit sous forme de régions hyper colorantes (homogeneously staining regions HSR ou abnormally banding regions ABR), pouvant se trouver dans un site autre que la localisation habituelle du gène transcrit.

Soit sous forme de gènes double minute (DM), petits points sombres de chromatine isolée, pouvant correspondre à la première phase d'amplification génique. Ils s'intégreraient au chromosome ensuite pour former des HSR.

L'analyse de ces régions par Southern blot a montré qu'elles étaient le siège d'une amplification de proto-oncogènes. Expérimentalement, la surexpression des protéines codées par les oncogènes génère le phénotype transformé. Les gènes fréquemment amplifiés dans les cancers humains sont les gènes membres de la famille *MYC* et *RAS*. D'autres proto-oncogènes, codant pour différentes protéines comme les récepteurs de facteurs de croissance telle que l'EGF (epidermal growth factor), des protéines anti-apoptotiques, et des gènes codant pour la cycline D et E sont souvent amplifiés dans les tumeurs humaines. C'est également le cas du gène *MYCN* qui est surexprimé dans 20 à 25% des neuroblastomes (Hogarty et al., 2003).

### **A-I-2-3. Translocations chromosomiques.**

Les translocations chromosomiques sont fréquemment rencontrées dans les cancers humains : l'exemple le plus typique est celui du chromosome Philadelphie (translocation 9 :22) dans la leucémie myéloïde chronique (Nowell and Hungerford, 1960; Rowley et al., 1973). Le proto-oncogène *abl* situé sur le chromosome 9 est transloqué sur le chromosome 22, dans une région contenant le gène *bcr*, et forme avec certains exons du gène *bcr* une nouvelle zone d'ADN activée en permanence pour la transcription d'une protéine tyrosine kinase très active, de poids moléculaire anormal. Le transfert du nouveau gène *bcr-abl* dans les cellules myéloïde de souris, puis l'injection chez l'animal, provoque le développement d'une leucémie myéloïde chronique et parfois après une période de latence, une leucémie aiguë (Bartram et al., 1983; Heisterkamp et al., 1983). Dans d'autres cas de translocation, l'effet produit n'est pas la fabrication d'une nouvelle protéine, mais l'activation non contrôlée

d'un gène codant pour une protéine du contrôle de la division cellulaire. Dans les lymphomes, les translocations observées rapprochent les régions régulatrices de l'expression d'immunoglobulines de l'oncogène *Myc*. Il en résulte une perte de la modulation normale du gène *myc* en réponse à des signaux physiologiques qui sous le contrôle des régions régulatrices d'immunoglobulines exprime une protéine Myc normale mais à des quantités anormalement élevées (Taub et al., 1982).

## **A - II - Les gènes suppresseurs de tumeurs**

### **A - II - 1 . Généralités**

Les produits des gènes suppresseurs de tumeurs ont une activité inhibitrice sur la croissance cellulaire. Dans le processus de transformation maligne, les gènes suppresseurs de tumeurs sont affectés par des mutations ou des délétions, aboutissant à une perte de fonction. Contrairement aux oncogènes, les deux allèles du gène suppresseur de tumeurs doivent être mutés pour aboutir à une perte de fonction. Le phénotype est ainsi récessif lorsqu'un seul des allèles est muté (Marshall et al., 1991). La production de cellules hybrides entre cellules normales et cancéreuses aboutit, le plus souvent, *in vitro* à la création de lignées cellulaires nouvelles, immortelles et phénotypiquement malignes. Cependant, l'injection de ces lignées chez l'animal n'aboutit que rarement à la formation de tumeurs. Ceci suggère que la perte d'un pouvoir tumorigène est différente de l'expression phénotypique *in vitro* (Harris et al., 1969).

De temps à autre, une lignée cellulaire hybride produit une tumeur. On observe alors une perte d'un ou plusieurs chromosomes originaires de la cellule normale. L'étude de ces cellules tumorigènes a permis d'identifier des régions chromosomiques porteurs de **gènes suppresseurs de tumeurs**, dont la perte était indispensable au développement tumoral. Des expériences sur la souris nude, utilisant des cellules humaines malignes et leur modèle normal, ont permis d'identifier chez l'homme, certaines de ces régions. Certaines tumeurs sont causées par ce type de mécanisme, la perte de deux allèles pour un locus est oncogénique. La probabilité de former ce type de tumeurs peut être héréditaire et/ou spontanée. L'étude de ce type de cancer a permis l'identification des gènes suppresseurs de tumeurs, c'est à dire des gènes dont les produits sont nécessaires aux fonctions cellulaires normales, mais dont la perte de fonction participe à la formation de tumeurs. Parmi les gènes suppresseurs de tumeurs, on peut distinguer des gènes codant pour :

- ✓ Des protéines de contrôle du cycle cellulaire, qui provoquent l'arrêt du cycle cellulaire lorsque l'ADN est endommagé ou lorsque les chromosomes sont anormaux.
- ✓ Des récepteurs pour des hormones dont leur fonction sont d'inhiber la prolifération cellulaire.
- ✓ Des protéines induisant l'apoptose.
- ✓ Des enzymes de réparation de l'ADN.

Au début des années 1970, Knudson a émis l'hypothèse qu'il existait un gène de susceptibilité au rétinoblastome (ou gène *Rb*). Il a proposé la théorie suivante : une mutation sur chacun des deux allèles dans le gène *Rb* est nécessaire pour que la transformation maligne puisse se réaliser (Knudson et al., 1971). Les patients atteints de la forme héréditaire du rétinoblastome sont hétérozygotes pour le gène *Rb*, ils ont hérité d'un allèle normal dominant et d'un muté récessif. Une deuxième mutation somatique sur le deuxième allèle est nécessaire pour inactiver le gène *Rb*, les deux allèles sont ainsi totalement inactivés, et la fonction du gène suppresseur est perdue. Dans le cas des patients atteints de la forme sporadique du rétinoblastome, les deux allèles du gène *Rb* sont normaux, il faut deux mutations successives, chacune sur un allèle, pour déclencher la cancérisation. La découverte de ce mécanisme a permis de différencier les formes héréditaires et sporadiques du cancer. La perte du second allèle, appelé *Loss of hétérozygosity* (LOH) est une étape commune dans l'initiation de la transformation. Webster Cavenee a défini un mécanisme chromosomique qui a permis de révéler des mutations récessives précédant le LOH. Son travail a contribué par la suite à la découverte et la caractérisation d'autres gènes suppresseurs de tumeurs (Cavenee et al. ,1983).

En exemple, je présenterais P53 et PTEN qui sont des gènes suppresseurs de tumeurs mutés dans une large variété de cancers à une fréquence comparable (Goberdhan and Wilson, 2003). Ces deux gènes sont impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire et la mort cellulaire. Les modifications de ces deux gènes par mutation ou délétion aboutissent à la perte de leur fonction biologique induisant ainsi la prolifération cellulaire non contrôlée et une réduction de la mort cellulaire.

## **A - II - 2 . PTEN : Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten.**

### **A-II-2-1. L'implication de PTEN dans les cancers**

Lorsque les tumeurs progressent dans des stades avancés, les cellules acquièrent un nombre croissant d'altérations génétiques. Li et ses collaborateurs. (Li et al., 1997) a identifié une altération qui est présente à une haute fréquence dans une large variété de tumeurs humaines, cette altération est une perte d'hétérozygotie (LOH) au locus 10q23. . Cette perte LOH au niveau 10q23 est détectée dans approximativement 70% des glioblastomes (la forme la plus avancée des tumeurs gliales) et dans environ 60% des cancers avancés de la prostate (Maehama et al., 2001). Cette répartition de LOH et la découverte que le chromosome 10 sauvage inhibe la tumorigénicité de cellules de glioblastomes dans des souris, suggèrent que le locus 10q23 porte un gène suppresseur de tumeur. Par cartographie des délétions homozygotes sur cette région, le gène candidat suppresseur de tumeur a été isolé et se nomme PTEN pour 'phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (Li et al., 1997, Steck et al., 1997, Li et al., 1997, Myers et al., 1997).

PTEN est muté dans une large variété de cancers, de plus les mutations germinales de PTEN sont associées à divers désordres de croissance dominants tels que la maladie de Cowden et le syndrome de Bannayan–Zonana (Liaw et al., 1997, Marsh et al., 1999, Nelen et al., 1997). Les bases moléculaires et cellulaires de ces dysfonctionnements ont été caractérisées en détail par des analyses génétiques *in vivo* en particulier dans des modèles murins et chez la drosophile. Ces études ont montré que les fonctions régulatrices de croissance de PTEN sont en premier portées par son activité lipidique phosphatase, qui réduit spécifiquement le niveau cellulaire de phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate (Goberdhan et al., 1999). Cette activité contre les effets de la PI3-kinase activée dans le contrôle nutritionnel de la voie du récepteur à l'insuline/mTOR, par ce moyen PTEN réduit la synthèse protéique et restreint la croissance des cellules et des organes, de même il régule d'autres processus biologiques tels que la fertilité et le vieillissement (Huang et al., 1999, Backman et al., 2002, Kishimoto et al., 2003). PTEN joue aussi un rôle de régulateur du cytosquelette, qui par exemple est impliqué dans le déplacement de cellules migratoires et peut être important dans les métastases (Vasquez et al., 2000). De plus, des souris knock-out conditionnelles ont révélé des fonctions de PTEN dans d'autres processus, tels que la spécification du type cellulaire et la contraction du muscle cardiaque (Shioi et al., 2000, Bodine et al., 2001). Des approches génétiques ont de plus montré une diversité surprenante des fonctions régulatrices

de PTEN globales et spécifiques du type cellulaire qui apparaissent être contrôlées par la modulation d'un unique phosphoinositide.

Des résultats d'études sur des cultures cellulaires proposent des liens entre PTEN et d'autres gènes régulateurs de la croissance tels que p53 (Freeman et al., 2003, Trotman et al., 2003, Sharpless et al., 2002, Mayo et al., 2001, Zhou et al., 2001, Stambolic et al., 2001). Ces interactions complexes entre PTEN et p53 ont une importante implication dans le traitement des tumeurs. En effet, les cellules cancéreuses exprimant PTEN ont déjà été montrées plus sensibles aux agents chimiothérapeutiques ciblant p53 (Mayo et al., 2002). Ces études amènent à de nouvelles approches des désordres liés à PTEN et sont au commencement d'élaboration de potentielles stratégies cliniques pour combattre ces défauts.

#### **A-II-2-2. PTEN dans la voie de signalisation mTOR (mammalian target of rapamycin)**

La voie de signalisation par laquelle PTEN régule la croissance cellulaire est la voie mTOR. Cette voie qui est activée de manière aberrante dans de nombreux cancers humains, joue un rôle central dans la régulation de la croissance des cellules cancéreuses par le contrôle de l'initiation de la traduction des ARN messagers en protéine (Wan and Helman, 2007).

mTOR est à l'interface de deux grandes voies de signalisation, l'une initiée par PI3K (phosphatidylinositol 3' kinase) et l'autre par l'intermédiaire de thréonine kinase sérine 11 (aussi appelé LKB1) (Fig. 1). La stimulation du récepteur IGF-1R (insulin-like growth factor 1 receptor) par les facteurs de croissance tels que l'insuline et l'IGF, régule la voie de signalisation mTOR via PI3K/Akt. PI3K, est un hétérodimère composé de la sous unité p85 régulatrice et la sous unité p110 catalytique, qui est une composante majeure de signalisation en aval du récepteurs du facteur de croissance de tyrosine kinases (RTKs) (Cantley et al., 2002). Des résidus tyrosine spécifiques phosphorylés des RTKs ou de protéines adaptatrices associées, telles que celles de la famille des récepteurs au substrat insuline (IRS), interagissent avec la sous unité p85 et permettent de recruter l'enzyme à la membrane. PI3K phosphoryle la phosphatidylinositol-4,5-bis-phosphate (PIP<sub>2</sub>), et ainsi convertit PIP<sub>2</sub> en PIP<sub>3</sub> au niveau de la membrane cellulaire (Franke et al., 1997). Ensuite, PIP<sub>3</sub> recrute Akt et PDK1 (phosphoinositide 3-kinase dépendante de protéines 1) à la membrane plasmique, ce qui se traduit en partie par l'activation de Akt par phosphorylation sur la thréonine 308 par PDK1 (Stokoe et al., 1997, Stephens et al., 1998). L'activation totale d'Akt est nécessaire et se fait

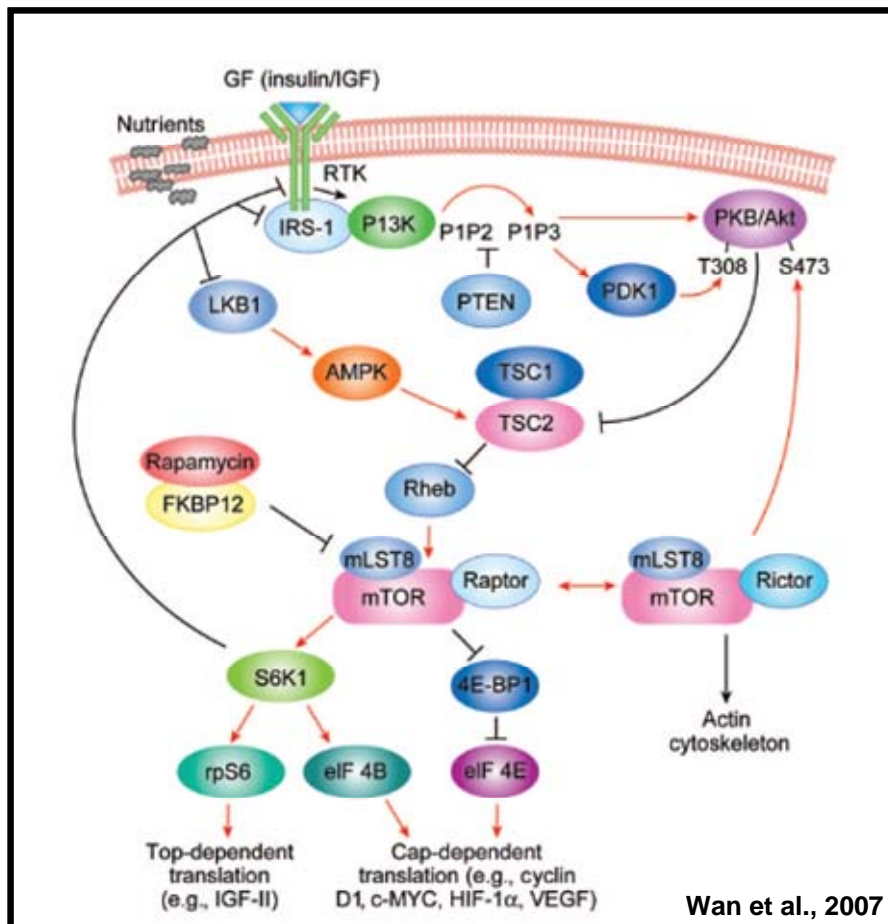
par une phosphorylation supplémentaire de sa sérine 473 (Toker et al., 2000). PTEN déphosphoryle PIP3 pour redonner du PIP2 et ainsi inhiber la signalisation par la PI3K. Récemment, d'importants progrès ont été accomplis dans l'identification des gènes suppresseurs de tumeurs TSC1 et TSC2 (tuberous sclerosis complex) et ainsi que sur leur fonction dans la régulation de la signalisation de mTOR, qui fournit un lien conservé au niveau de l'évolution entre le facteur de croissance régulé par PI3K-Akt et la sensibilité de cette voie aux nutriments (Fingar et al., 2004). Le mécanisme par lequel Akt active mTOR semble être directement lié à la phosphorylation et l'inhibition de TSC2 (Potter et al., 2002, Inoki et al., 2002). TSC1 et TSC2 forment un hétérodimère qui inhibe l'activité de Rheb (Ras homologue enriched in brain), une GTPase requise pour l'activation de mTOR (Hay et al., 2004). Dans une voie parallèle, sensible à la nutrition (c'est-à-dire, par l'intermédiaire d'acides aminés et de l'ATP) est liée à la signalisation mTOR à travers LKB1, un gène suppresseur de tumeur inactivé dans le syndrome de Peutz Jeghers. LKB1 active l'AMP-activated kinase, qui à son tour active TSC1 et TSC2, menant à l'inhibition de mTOR (Inoki et al., 2003).

La voie de signalisation mTOR est anormalement activée dans de nombreuses tumeurs humaines, qui ont de multiples modifications à la fois en amont et en aval de mTOR, conduisant à l'activation de la voie. (Fig. 1). L'activation aberrante de l'axe TSC-Rheb-mTOR passant par la perte de fonction de la protéine suppresseur de tumeur a été lié à la prédisposition tumorale de certains syndromes tels que le syndrome de Cowden (PTEN), Syndrome de Peutz Jeghers (LKB1), et la sclérose tubéreuse (TSC1 /TSC2) (Inoki et al., 2005). En plus de syndrome génétique associée à des mutations, la perte de la fonction de PTEN par mutations au niveau du gène, par délétion ou par méthylation du promoteur ont été trouvés dans beaucoup de cancers (Faivre et al., 2006). Un résultat essentiel de l'inactivation de PTEN est l'activation constitutive de PI3K/Akt, aboutissant à l'activation de la voie mTOR. En outre, les tumeurs associées à l'inactivation de PTEN sont particulièrement sensibles aux effets thérapeutiques des inhibiteurs de mTOR (Neshat et al., 2001, Podsypanina et al. 2001).

**Fig 1. Représentation de la cascade de signalisation mTOR.**  
**Ce schéma décrit comment mTOR intègre les signaux dérivés des nutriments et du facteur de croissance pour réguler l'initiation de la traduction. La signalisation mitogène des RTKs active PI3K et Akt. Akt est phosphorylée sur T308 par PDK1 et la S473 par mTORC2 (composé de mTOR, mLST8 et rictor), conduisant à son activation complète, qui à son tour phosphoryle**



TSC2, conduisant à l'activation de la GTPase Rheb et mTORC1 (composé de mTOR, mLST8, Et Raptor). La voie de détection de l'énergie (c'est-à-dire, par l'intermédiaire d'acides aminés et de l'ATP) est liée à la signalisation mTOR via LKB1. LKB1 active AMPK, qui à son tour active TSC1 et TSC2, ce qui conduit à une inhibition de mTORC1. mTORC1 activé phosphoryle S6K1 et 4E-BP1 et conduit à la libération de 4E-BP1 de eIF-4E, qui jouent des rôles fondamentaux dans la traduction. mTORC1 initie une boucle de rétroaction négative pour moduler l'activité d'Akt par le biais de S6K1. (Wang et al., 2007)



Abréviations: 4E-BP1: eukaryotic initiation factor 4E binding protein-1; AMPK: AMP-activated kinase; eIF-4E: eukaryotic initiation factor 4E; HIF-1 $\alpha$ : hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ ; IGF: insulin-like growth factor; IRS-1: insulin receptor substrate 1; LKB1: serine threonine kinase 11; mLST8: G protein  $\beta$  subunit-like; mTOR: mammalian target of rapamycin; mTORC2: mammalian target of rapamycin complex 2; PDK1, 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1; PI3K: phosphatidylinositol 3' kinase; PIP:phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; PKB, phosphate kinase B; PTEN, phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten; Rheb: Ras homologue enriched in brain; RTK: receptor tyrosine kinase; S6K1: protein S6 kinase 1; TSC: tuberous sclerosis complex; VEGF: vascular endothelial growth factor.

### **A - II - 3 . P53 : gène suppresseur de tumeurs**

P53 est un des gènes suppresseurs de tumeurs le mieux caractérisé. La majorité des autres gènes suppresseurs connus sont associés à un type spécifique de cancer, contrairement à p53 où plus de la moitié des cancers humains présentent une ou plusieurs mutations de ce gène, indiquant ainsi le rôle important de la protéine p53 dans la protection de la cellule (voir la banque de données IARC [www-p53.iarc.fr/index.html](http://www-p53.iarc.fr/index.html)). La protéine p53 a été découverte en tant qu'antigène spécifique de certains sarcomes induits chimiquement chez les souris (DeLeo et al., 1979). Ensuite, d'autres études ont montré sa présence dans des cellules transformées par le virus SV40, où elle est associée à l'antigène T (Harlow et al., 1981; Oren and Levine, 1981). P53 a aussi été trouvée dans les cellules transformées par des agents chimiques et dans les cellules tumorales (Crawford et al., 1981). Ces premières expériences ont défini le gène *p53* comme un oncogène. En fait, dans ces expériences, seule la forme protéique p53 mutée était détectée, la forme normale n'était pas détectée. En réalité *p53* est un gène suppresseur de tumeurs et non un oncogène, car dans de nombreuses tumeurs humaines et murines, le gène *p53* est muté voir délété, ce qui aboutit à la perte de sa fonction. Lorsqu'il est injecté dans des cellules transformées, il induit la suppression du phénotype transformant (Finlay et al., 1989).

La protéine p53 est difficilement détectable dans la cellule dans des conditions normales, mais est rapidement activée en réponse à différents stress comme des dommages au niveau de l'ADN, la perturbation du fuseau mitotique, l'activation d'oncogènes, l'hypoxie ou le manque de facteurs de croissance. Les conséquences biologiques de cette activation sont : l'arrêt de la croissance à des points clés du cycle cellulaire, la mort de la cellule par apoptose, la sénescence ou la différenciation cellulaire (Vogelstein et al., 2000). Ces mécanismes permettent de protéger l'organisme d'une croissance cellulaire incontrôlée (Michael and Oren, 2002).

#### **A-II-3-1. P53 et le cancer**

Les mutations du gène *p53* donnent un avantage sélectif pour les cellules puisqu'elles ne sont plus réprimées au niveau de leur croissance. Les souris ko pour *p53* sont plus susceptibles au développement de tumeurs (Donehower et al., 1992). Malgré son rôle majeur dans la cellule, des lignées cellulaires dépourvues de p53 ont été décrites, indiquant que la cellule peut survivre en son absence.

En raison de sa qualité de suppresseur de tumeurs, on a très vite pensé que la réintroduction du gène *p53* dans des cellules tumorales pourrait permettre de réverser le phénotype tumoral. La transfection du gène *p53* dans des cellules transformées induit un arrêt de leur prolifération dû à un blocage en phase G1 (Mercer et al., 1990; Michalovitz et al., 1990) ou une entrée en apoptose (Yonish-Rouach et al., 1991), mais parfois dans certaines cellules aucun de ces effets n'est visible (Shaulsky et al., 1991; Cheng et al., 1992).

Toutefois, une étude sur des souris transgéniques conditionnelles pour *p53*, présentant un phénotype de souris *p53* ko, montre que le rétablissement de l'expression de *p53* endogène par le système Cre/lox P *in vivo* induit la régression significative de tumeurs (sarcomes et lymphomes) radio-induits (Ventura et al., 2007). Le même type d'expérience de régulation conditionnelle de l'expression de *p53* endogène dans un modèle de souris mosaïque de carcinome du foie montre aussi une régression de ces tumeurs suite à la restauration de la protéine *p53* endogène (Wen Xue et al., 2007). Les mécanismes au niveau cellulaire de la régression tumorale sont l'apoptose dans les lymphomes thymiques et l'arrêt du cycle jusqu'à la sénescence pour les sarcomes et carcinomes du foie.

Ces résultats démontrent que l'inactivation prolongée de *p53* est requis pour le maintien des tumeurs. Ces travaux appuient les efforts mener pour la recherche de traitement des cancers par réactivation de *p53*. Malgré les très nombreuses études menées depuis longtemps à son sujet, les thérapies anticancéreuses reposant sur *p53* ne sont pas disponibles à l'heure actuelle. On peut imaginer vouloir restaurer la fonction de *p53* (ajout de P53 WT ou modification de P53 mutante de manière à lui donner une activité sauvage), ou cibler et inactiver les cellules déficientes en *p53*. Cette approche a déjà donné des résultats prometteurs avec entre autres l'utilisation du ONYX-015 (adénovirus modifié vectorisé) (Khuri et al., 2000) qui cible les cellules déficientes en *p53* ; ainsi que la molécule MIRA-1 qui montre une activité anti-tumorale en préservant la conformation active de *p53* mutant (Bykov et al., 2005).

### **A-II-3-2. P53 est un facteur de transcription**

P53 forme un oligomère de 4 sous unités et agit comme un facteur de transcription (Levine et al., 1989). Il a été montré que *p53* se lie sur une séquence spécifique de l'ADN (Bargonetti et al., 1991; Kern et al., 1991) contenant certaines bases critiques dont des guanines. La séquence consensus comporte 2 motifs palindromiques: **5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3'** séparés par 0 à 13 pb (el-Deiry et al., 1992).

P53 possède 2 homologues, p63 et p73 (Kaghad et al., 1997; Yang et al., 1998), qui peuvent se lier à cette même séquence mais transactivent d'autres gènes, probablement en raison de co-facteurs différents (Mondal and Parvin, 2005). Ils sont aussi capables d'induire l'apoptose (Jost et al., 1997).

Les modifications post-traductionnelles de p53 comme la phosphorylation, la sumoylation ou l'acétylation influencent sa localisation cellulaire : soit nucléaire soit cytoplasmique. Ces modifications influencent l'affinité de p53 pour ses éléments de réponse. Ces modifications influencent également sa liaison à des co-facteurs et donc sa fonction sur le cycle cellulaire et l'apoptose. Différentes études ont permis d'identifier les gènes trans-activés par p53, on en dénombre une centaine parmi lesquels le gène *P21/Waf1/Cip1*, dont le produit est un inhibiteur de cdk (protéines kinases intervenant dans la régulation du cycle cellulaire). L'induction de P21 a pour effet un arrêt des cellules en phase G1 du cycle cellulaire (Deng et al ; 1995). P53 peut également trans-activer certains gènes impliqués dans le processus d'apoptose, tels que *Bax*, *Fas*, *Apaf*, *Puma*, *Noxa*..etc (Hsieh et al., 2002; Rogoff et al., 2002; Wu and Levine, 1994). Le gène *mdm2* possède un élément de réponse à p53 et sa transcription est stimulée par p53 (Alarcon-Vargas and Ronai, 2002). La protéine Mdm2 est une E3-ligase qui permet la dégradation de p53 via le protéasome. Ce système permet de former une boucle de régulation : p53 induit la transcription de son propre régulateur.

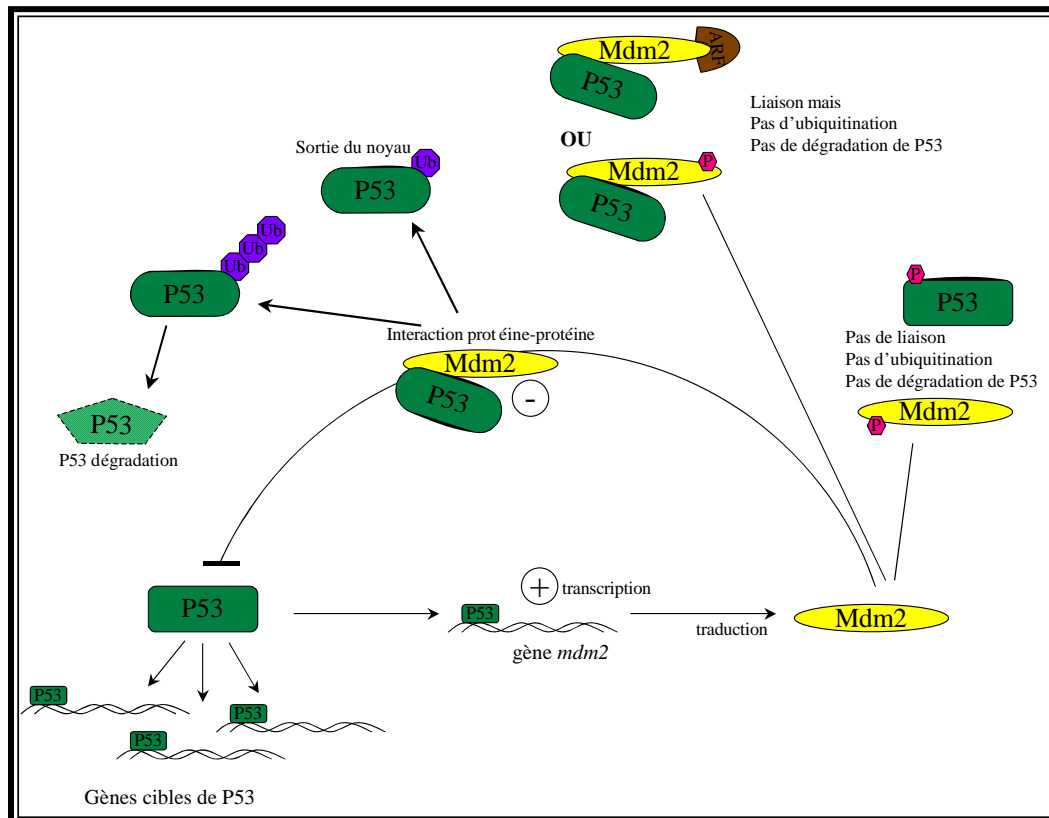
### **A-II-3-3. L'auto-régulation par Mdm2**

Mdm2 est le produit d'un oncogène souvent activé dans les cancers (Watanabe et al., 1996; Momand et al., 1998). C'est une E3 ligase, protéine qui induit la dégradation de p53 par la voie ubiquitine-protéasome (Haupt et al., 1997; Kubbutat et al., 1997).

Mdm2 est capable d'inhiber p53 en se liant à son domaine transactivateur (Momand et al., 1992; Chen et al., 1996) et inhibe ainsi la liaison aux éléments de la machinerie transcriptionnelle (Lu and Levine, 1995; Thut et al., 1995).

L'importance du lien entre p53 et Mdm2 a été mis en évidence par l'étude des souris transgéniques : les souris ko pour Mdm2 présentent une forte létalité embryonnaire, qui disparaît totalement lorsque l'on inactive conjointement les gènes *p53* et *mdm2* (Jones et al., 1995; Montes de Oca Luna et al., 1995).

**Fig 2. Boucle d'autorégulation de P53 par Mdm2**



P53 et Mdm2 doivent toutes deux être dans des états de phosphorylation particuliers pour pouvoir interagir. La régulation de la quantité et de l'état de phosphorylation de Mdm2 est donc très importante pour l'activité de p53 (Ashcroft et al., 2000). Ce serait par ce mécanisme que la cellule maintiendrait un niveau basal relativement bas de p53. De plus, un niveau bas de Mdm2 résulterait en une mono-ubiquitination de p53 entraînant son export du noyau vers le cytoplasme (Li et al., 2003). De façon *à priori* paradoxale p53 active la transcription du gène *mdm2* (Barak et al., 1993; Zauberman et al., 1995). Il résulte de cette double action une boucle de régulation qui permet de contrôler finement l'activité de p53 (Wasylyk et al., 1999).

#### **A-II-3-4. P53 et le cycle cellulaire**

Une des fonctions majeures reconnues pour p53 aujourd'hui est son rôle de régulateur du cycle cellulaire. L'analyse de l'expression de p53 au cours du cycle cellulaire dans des fibroblastes en culture (Reich and Levine, 1984) a montré que la synthèse et la quantité de

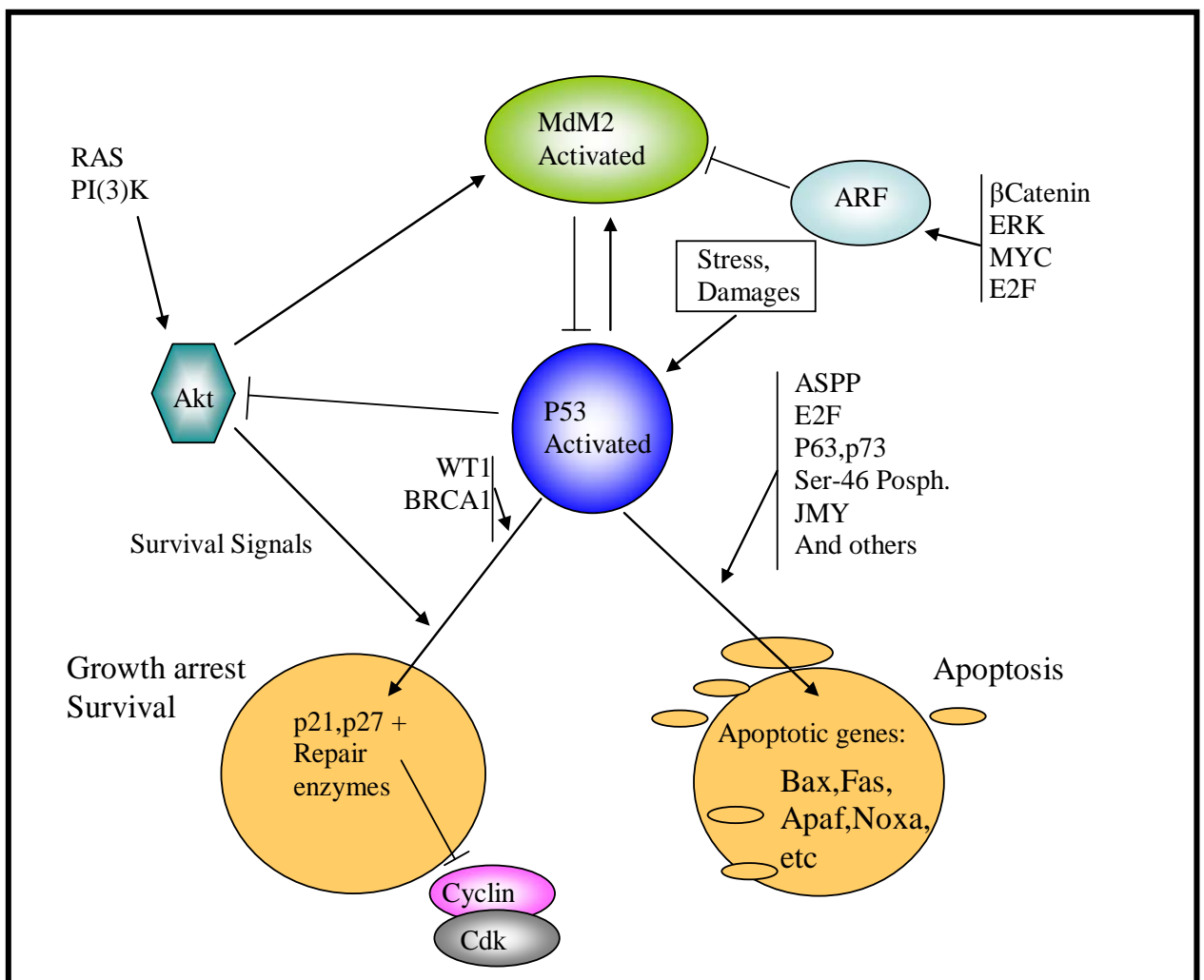
p53 sont accrues en fin de phase G1, ce qui suggère un rôle pour p53 dans la progression des cellules quiescentes vers un état prolifératif.

Cette hypothèse a ensuite été confirmée : p53 peut induire un arrêt de croissance en s'exportant dans le noyau où il bloque les cellules principalement en phase G1 (Baker et al., 1990; Diller et al., 1990; Mercer et al., 1990; Michalovitz et al., 1990; Gannon and Lane, 1991; Martinez et al., 1991). De plus il a été montré que ce blocage peut-être consécutif à un dommage causé à la cellule tel que des lésions au niveau de l'ADN (Kastan et al., 1991). Dans certaines lignées, l'activation (ou la surexpression) de p53 entraîne par contre l'induction de l'apoptose (Yonish-Rouach et al., 1991; Polyak et al., 1996) plutôt qu'un arrêt de la croissance.

*P53* est le gène majeur du maintien de l'intégrité de la cellule il est même nommé "gardien du génome" (Lane, 1992) ou "gardien de la cellule". En cas d'anomalies au niveau de l'ADN, de la cellule ou de son environnement, la protéine p53, en activant ou inhibant diverses voies, organise la réponse cellulaire qui peut être une entrée en phase quiescente pour permettre une réparation des dommages ou s'ils sont trop importants l'induction de la mort cellulaire par apoptose.

**Fig 3. La protéine p53 est activée par une variété de stress et par les dommages au niveau de l'ADN.**

La conséquence biologique de l'activation de p53 dépend des modifications post-traductionnelles de la protéine et du contexte cellulaire. Les signaux de survie et la présence de protéines suppressives de tumeurs tels que WT1 et BRCA1 orientent la réponse p53 vers l'arrêt du cycle et la réparation de l'ADN. En absence de signaux de survie et en présence de co-facteur comme E2F, p63, p73 etc., l'activation de p53 mène à l'apoptose. Arf interfère dans la boucle d'autorégulation p53-Mdm2. Arf se lie à Mdm2 et inhibe sa fonction ubiquitine ligase ce qui résulte à une régulation positive de p53 (Zhang and Xiong, 2001). Inversement, Akt active Mdm2 ce qui conduit à une diminution des signaux p53.



#### **A - II - 4 . Les facteurs épigénétiques**

Les mécanismes épigénétiques agissent pour changer l'accessibilité de la régulation transcriptionnelle de la chromatine au niveau local et global par le biais de modifications de l'ADN et des nucléosomes (Kubicek et al., 2004, Kubicek et al., 2006). Par définition, les régulateurs épigénétiques modifient les activités et les capacités d'une cellule sans affecter directement l'ADN par des mutations au niveau de la séquence. La régulation épigénétique des gènes se fait par méthylation de l'ADN (Herman and Baylin et al., 2003), des modifications covalentes au niveau des histones, par remodelage local du nucléosome (Kubicek et al., 2006). La régulation épigénétique des gènes collabore avec les altérations génétiques dans le développement du cancer (Ballestar et al., 2008, Esteller et al., 2007). Cela apparaît clairement dans tous les aspects de la biologie tumorale, y compris la croissance et la différenciation cellulaire, le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'angiogenèse, les migrations et l'échappement à l'immuno-surveillance (Lung et al., 2004). Un certain nombre d'études ont fourni des détails sur les mécanismes épigénétiques, et leur implication dans le cancer. (Bird et al., 2002, Jones and Baylin, 2002, Jaenisch and Bird, 2003, Feinberg and Tycko, 2004, Hake et al., 2004).

La possibilité d'inverser les codes épigénétiques peut fournir de nouvelles cibles d'intervention thérapeutique (Gal-Yam et al., 2008, Egger et al., 2004, Esteller et al., 2007). Un grand potentiel réside dans le développement de " thérapies épigénétiques " ; plusieurs inhibiteurs d'enzymes contrôlant les modifications épigénétiques, notamment d'ADN et d'histone déacétylases méthyltransferases, sont montrés prometteur pour lutter contre les effets tumorigènes dans certaines tumeurs malignes (Egger et al., 2004).

#### **A - III - L'instabilité génomique**

La notion que la tumeur se développe grâce à l'accumulation d'altérations génétiques des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs est maintenant largement reconnue comme un principe fondamental de la biologie du cancer. Une très grande partie des cancers est constitué de cellules anormales avec un contenu anormal chromosomique, appelé aneuploïdie. L'aneuploïdie est souvent associée à une instabilité chromosomique (INC), un état dans lequel les cellules cancéreuses gagnent et perdent des chromosomes entiers ou de



grandes parties de ceux-ci à des taux élevés par rapport aux cellules normales (Lengauer et al., 1998).

Les bases moléculaires de la INC ne sont pas encore bien définies. Beaucoup de mécanismes sont proposés pour être responsable de l'INC (Lengauer et al., 1998, Duesberg et al., 1999). Comme d'autres phénotypes caractéristiques du cancer, il est possible que des mutations dans les gènes qui contrôlent la stabilité du chromosome soient responsables de l'INC. Toutefois, seul un petit nombre de cancers humains avec des mutations dans les gènes connus pour entraîner des formes expérimentales d'INC sont identifiés. Ces gènes comprennent hBUB1, ATM, ATR, les gènes BRCA1 et BRCA2 (Cahill et al., 1998, Rotman et al., 1998, Smith et al., 1998, Zhang et al., 1998). L'augmentation du nombre de copies de *aurora2/STK15* et *PLK1* sont signalés se produire dans une plus grande fraction de cancers (Zhou et al., 1998, Ewart-Toland et al., 2003, Bischoff et al., 1998, Wolf et al., 1997).

En revanche, un grand nombre de gènes sont identifiés déclenchant l'instabilité chromosomique lorsqu'ils sont mutés dans *Saccharomyces cerevisiae* (Spencer et al., 1990, Kolodner et al., 2002). Ces gènes sont impliqués dans une large variété de voies cellulaires, y compris la condensation des chromosomes, la cohésion des chromatides sœurs, la structure et la fonction du kinetochore, la formation des microtubules, et le contrôle du cycle cellulaire. De même, plusieurs gènes peuvent provoquer des INC dans *Drosophila melanogaster* quand ils sont modifiés génétiquement (Mihaylov et al., 2002, Fung et al., 2002).

Les mécanismes susceptibles de contribuer à l'instabilité chromosomique dans les cancers humains sont ceux décrits chez la levure (Lengauer et al., 1998). En particulier, les défauts dans les protéines qui sont impliqués dans la réparation des cassures double brin, la structure des kinetochores, la ségrégation des chromatides et les gènes clés de la progression du cycle cellulaire sont suggérés de nature à contribuer à l'aneuploïdie (Murray et al., 1995, Nasmyth et al., 1996, Elledge et al., 1996, Paulovich et al., 1997).

Les différents évènements et voies cellulaires ont été proposés pour jouer un rôle dans l'instabilité génétique trouvée dans les cellules cancéreuses (Lengauer et al., 1998). Seul un petit nombre de cancers présentent des mutations spécifiques qui peuvent promouvoir une aneuploïdie (Cahill et al., 1998), et l'étape à laquelle se produit cette instabilité chromosomique dans la tumorigenèse reste controversée (Thiagalingam et al., 1996, Pihan et

al., 1998, Rajagopalan et al., 2003, Sieber et al., 2003, Nowak et al., 2002, Sieber et al., 2002, Shih et al., 2001). Des résultats suggèrent que l'inactivation de hCDC4 est susceptible d'être une cause principale de l'instabilité chromosomique dans les cancers, et que cette mutation peut se produire à un stade précoce. Ces données appuient l'hypothèse selon laquelle l'instabilité chromosomique des cellules cancéreuses, tout comme leur croissance anormale, est le résultat direct des altérations génétiques spécifiques (Rajagopalan et al., 2004).

## **B - Réversion tumorale**

### **B - I - Principe : suppression versus réversion**

#### **B - I - 1 . La suppression du phénotype tumoral**

La notion de gène suppresseur a rejoint l'hypothèse de Knudson : 2 mutations récessives sur un gène suppresseur de tumeurs favorisent la dérégulation de la cellule et par la suite l'apparition du cancer. Cette hypothèse a été validée par la caractérisation du premier gène suppresseur de tumeur : *rb1*, le gène impliqué dans le développement du rétinoblastome.

En 1987, des expériences ont montré que l'introduction d'un chromosome particulier dans certaines cellules tumorales (tumeur de Wilm's) peut induire la suppression de leur phénotype tumoral (Weissman et al., 1987). Tout comme dans les expériences de Harris et Miller (Harris et al., 1969), qui montrent une complémentarité de la cellule maligne par apport de matériel génétique exogène.

La notion de suppression tumorale correspond à la complémentarité d'un manque dans les cellules tumorales par un apport externe d'information génétique. La suppression est un terme utilisé pour décrire la perte, totale ou partielle du phénotype malin. Le terme « suppression » est plus souvent employé lorsque la fonction d'un gène suppresseur de tumeur est restaurée.

#### **B - I - 2 . La réversion tumorale**

Il a été montré que certaines cellules tumorales parviennent à quitter leur état malin pour retrouver un phénotype tumoral significativement atténué. Ce phénomène est appelé **la réversion tumorale**.

Les cellules normales présentent un certain nombre de caractéristiques qui les différencient des cellules tumorales : elles sont notamment sensibles à l'inhibition de contact. L'infection de cellules normales de souris NIH3T3 par le virus SV40 rend celles-ci insensibles à l'inhibition de contact et plus tumorigènes. La découverte, dans ces cellules infectées, de sous-clones redevenus sensibles à la densité cellulaire (Pollack et al., 1968) a ouvert la voie de la réversion tumorale, puisque ces clones retrouvaient "spontanément" des caractéristiques de croissance de cellules normales et surtout étaient beaucoup moins tumorigènes. Ces sous-clones ont été qualifiés de révertants plats "flat revertants" en raison de leur morphologie. Les cellules révertantes sont donc des cellules filles isogéniques mais phénotypiquement différentes, moins tumorigènes que leurs cellules parentales tumorales.

Ces expériences ont été validées par la répétition de ce phénomène avec d'autres virus ou agents inducteurs et d'autres types cellulaires (pour revue voir Ozer and Jha, 1977). Il a également été montré par des expériences de fusion cellulaire que le phénotype révertant peut être dominant sur le phénotype mutateur. (Noda et al., 1983).

**Fig 4. Historique de la réversion tumorale**

1968 - Pollack, Green, Todaro. PNAS 1968 - Rabinowitz and Sachs. Nature	cellules NIH3T3	infection par virus polyoma ou SV40	<i>Flat revertants</i>
1984 - Salmon, Zwiebel. J.Cellular Physiol.	cellules NIH3T3	infection par le virus du sarcome de Kirsten	<i>Flat revertants</i>
1983 - Noda. PNAS 1989 - Kitayama. Cell	cellules NIH3T3	découverte de K-Rev1	
1989 - Degos Lancet		traitement à l'acide rétinoïque	Différenciation terminale
1993 - Telerman et al. PNAS	cellules leucémiques humaines K562	tuées par le parvovirus H1	Cellules révertantes KS
1996 - Nemani et al. PNAS	cellules leucémiques humaines U937 et K562	tuées par le parvovirus H1 découverte du rôle de Siah	Cellules révertantes US et KS
1997 - Bissel JCB		Effet de l'environnement sur les cellules tumorales	
2002 - Tuynder et al. PNAS	cellules de cancer du sein	tuées par le parvovirus H1 découverte du rôle de TCTP	Cellules révertantes
2004 - Tuynder et al. PNAS	cellules de cancer du colon, poumon et mélanome cellules NIH3T3 et NIH3T3 v-src	tuées par le parvovirus H1 transfectées anti-sens TCTP	Cellules révertantes Réversion

## **B - II - Modèle cellulaire M1/LTR6 : identification TSIP et TSAP**

Dans le but de mieux comprendre les mécanismes de cancérisation et notamment ceux relatifs à p53, notre équipe a entrepris d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans la voie p53 et d'en étudier certains plus finement.

Pour cela nous avons utilisé un modèle cellulaire particulier dans lequel les cellules de la lignée murine M1 sont stablement transfectées avec un ADNc codant pour une protéine inactive P53-Val135 thermosensible. (Michalovitz et al., 1990; Milner and Medcalf, 1990). Cette lignée stable est nommée LTR6. Lorsque les cellules sont cultivées à 37°C, p53 est inactive ; par contre lorsqu'elles sont cultivées à 32°C, la protéine adopte une forme qui lui permet d'avoir une activité normale de suppresseur de tumeurs (Yonish-Rouach et al., 1991). Cette activation induit l'entrée en apoptose des cellules LTR6.

En utilisant la technique de *Differential Display*, nous avons pu mettre en évidence l'expression différentielle de gènes entre les cellules où la protéine p53 est inactive et celles où elle est activée (Amson et al., 1996). Certains de ces gènes étaient déjà connus pour être induits par p53, mais d'autres n'avaient encore jamais été décrits.

Les gènes activés par p53 ont été nommés *tsap* (*Tumor Suppressor Activated Pathway*) : ce sont des gènes qui participent potentiellement à la suppression du phénotype tumoral. A l'inverse les gènes inhibés par p53 ont été nommés *tsip* (*Tumor Suppressor Inhibited Pathway*) : ce sont des gènes qui favoriseraient le phénotype tumoral. Les gènes tels que *Siah* (Tsap 3) et *dudulin2* (Tsap 6), qui possèdent chacun un élément de réponse fonctionnel pour p53 au niveau de leur promoteur (Passer et al., 2001, Fiucci et al., 2004), se sont révélés par la suite très importants dans le processus de réversion tumorale.

## **B - III - Modèles des révertants cellulaires**

En parallèle, Telerman et Amson ont choisi d'adopter une stratégie différente et innovante pour étudier la réversion tumorale. Par analogie avec les études décrivant la caractérisation de flat révertants non tumorigènes, isolés à partir de cellules transformées, ils ont émis l'hypothèse selon laquelle cette réversion du phénotype pouvait se produire au sein d'une population cellulaire maligne. Pour développer ce concept, ils ont mis au point des modèles de réversion tumorale à partir de lignées tumorales dérivant de tumeurs primaires (K562 et U937 lignée leucémique, TD47 et BT20 cancer du sein). Ces lignées présentent l'intérêt de posséder de nombreuses mutations, plus représentatives du cancer *in situ*.

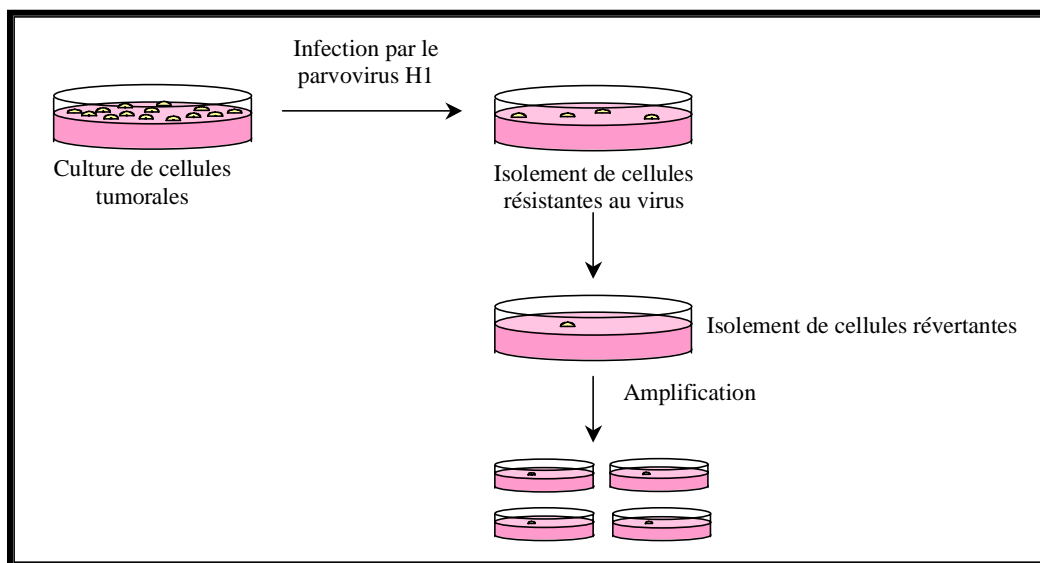
L'objectif de leur travail est d'identifier les mécanismes du processus de réversion tumorale, par l'observation de cellules cancéreuses parvenant à quitter leur état malin pour retrouver un phénotype tumoral significativement atténué (Nemani et al., 1996; Telerman et al., 1993; Tuynder et al., 2004; Tuynder et al., 2002). Ils ont en effet isolé des cellules révertantes à partir de lignées tumorales d'origine humaine en utilisant comme outils le parvovirus-H1 qui a la propriété de tuer préférentiellement les cellules tumorales, en épargnant les cellules normales.

### B - III - 1 . Isolement des cellules révertantes

Le parvovirus-H1 est un virus ayant la propriété d'être oncolytique, cet effet cytotoxique vis à vis des cellules malignes, dépend de différents facteurs cellulaires qui sont modifiés lors de la transformation maligne et rendent les cellules plus sensibles à l'infection virale. Ici, nous utilisons cette propriété, pour sélectionner une population cellulaire phénotypiquement moins tumorale au sein d'une population cellulaire tumorale. (Livre Rommelaere et al., Replication-Competent Virus for Cancer Therapy.: Monogr Virol. Basel ; Karger, 2001)

En infectant des cellules tumorales avec ce virus, la très grande majorité d'entre elles meurent peu à peu. Mais après quelques semaines de maintien en culture, on peut observer l'émergence de clones résistants à l'effet cytotoxique du virus (environ 1/1 000 000). Ce sont donc potentiellement des cellules qui ont un phénotype tumoral atténué : des cellules révertantes.

**Fig 5. Technique d'isolement des cellules révertantes à l'aide du parvovirus-H1**



Ces cellules révertantes ont des caractéristiques proches des cellules normales : elles résistent au parvovirus suite à une réinfection, elles ont perdu leur caractéristique tumorale de croissance en indépendance d'ancrage et elles forment moins de tumeurs que les cellules tumorales lors d'injection dans des souris immunodéficientes.

Cette réversion ne s'apparente pas à de la différenciation puisque l'analyse d'expression de certains marqueurs de différenciation n'a pas révélé de différence entre les cellules parentales et révertantes. De plus, la morphologie des cellules révertantes ne diffère pas de celle des cellules parentales (Tuynder et al., 2002).

Nous pensons que la réversion préexiste à l'infection par le parvovirus qui n'est utilisé que pour sélectionner les cellules révertantes (Tuynder et al., 2004). Mais, dans l'état actuel de nos connaissances, nous ne pouvons pas exclure que le parvovirus aide à l'apparition de cellules révertantes. Le parvovirus n'est, en tout cas, pas nécessaire au maintien du phénotype révertant. En effet, certains clones ne produisent plus de parvovirus (pas de production de particule virale, pas de détection d'ADN viral) et conservent leur phénotype révertant (Tuynder et al., 2002).

### **B - III - 2 . Identification des gènes majeurs de la réversion tumorale**

Afin de comprendre et d'identifier les mécanismes mis en jeu lors du processus de réversion tumorale, les différences de taux d'expression des ARNm ont été analysées entre la lignée révertante et la lignée parentale pour les modèles de leucémie et de cancer du sein. L'analyse de l'expression différentielle des gènes a été réalisée dans les modèles de réversion, obtenus via le parvovirus-H1 et dans deux modèles de suppression tumorale précédemment caractérisés au laboratoire (Nemani et al., 1996, Roperch et al., 1999, Tuynder et al., 2002). Ces derniers modèles basés sur la suppression du phénotype malin, via la transfection d'un gène, permettent d'écarter les gènes qui seraient éventuellement modifiés par le parvovirus-H1 dans les lignées révertantes. Ces modèles sont composés à partir d'une lignée U937 (leucémie) et d'une lignée MCF7 (cancer du sein) respectivement transfectées de manière stable avec le gène *siah-1*. (Nemani et al., 1996, Roperch et al., 1999)

L'analyse de l'expression des gènes a été réalisée entre les modèles U937/U937-*siah-1* et MCF7/MCF7-*siah-1* et les modèles de réversion de leucémie (U937/US4.2 et K562/KS) et

de cancer du sein (BT20/BT20S T47D/T47DS et MB231/MB231S) (Tuynder et al., 2002). Pour se faire, la technique de *Differential Display* (Liang and Pardee, 1992), puis des techniques de criblage à haut-débit: la technique de Megasort™ qui génère des résultats sous forme de séquence d'ADNc et la technique de *Massively parallel Signature Sequencing* (MPSS™) qui génère des signatures ont été utilisées. Ces expériences ont été développées par Sydney Brenner et réalisées par la société Lynx (Brenner et al., 2000). Les différences d'expression les plus significatives ont été confirmées par Northern blot et par RT-PCR en temps réel.

Les résultats obtenus ont permis d'identifier 263 gènes exprimés de manière différentielle pendant le processus de réversion tumorale. Le gène montrant une différence d'expression la plus élevée est *tpt-1* codant pour la protéine TCTP (translationally controlled tumor protein), (Tuynder et al., 2002).

A la suite de ces résultats, trois principaux gènes ont été étudiés au sein du laboratoire : *siah-1*, *tsap6* et *tpt-1*. Mon travail de doctorat s'est essentiellement focalisé sur l'implication des gènes *tsap6* et *tpt-1* dans la réversion tumorale. Nous avons caractérisé les fonctions biologiques et le mécanisme d'action des protéines TSAP6 et TCTP par des approches moléculaires, cellulaires et par l'utilisation de modèles murins, l'objectif final consistant à élaborer une nouvelle thérapie du cancer avec comme cible principale TCTP.

## **C - Développement de drogues pour le traitement des cancers**

Environ un tiers des tumeurs peuvent être guéries par les techniques existantes comme la chirurgie, les radiothérapies et la chimiothérapie, à condition d'être détectées dans les phases initiales. Les schémas thérapeutiques associent souvent ces trois types de traitements. Les chimiothérapies classiques utilisant les molécules cytotoxiques telles que les intercalants de l'ADN (l'actinomycine D), les antimétabolites (méthotrexate), les dérivés platine, les agents alkylants, les agents interférant avec les topoisomérases (doxorubicine) et les agents interférant avec la formation des microtubules (vincristine), agissent à la fois sur les cellules normales et cancéreuses. Leurs bénéfices d'actions sont basés sur le fait que les cellules cancéreuses sont plus prolifératives que les cellules normales, à part quelques tissus comme les cheveux, les tissus hématopoïétiques, le système immunitaire, les cellules intestinales ; ce qui

explique les effets secondaires souvent rencontrés : perte de cheveux, vomissement, immunosuppression,.... . Mais toujours en convenant de la balance effet/risque, certains traitements restent les seuls efficaces pour certaines catégories de cancers.

Les nouveaux objectifs pour le traitement anti-cancéreux sont d'avoir une approche plus spécifique des cellules tumorales afin de limiter les effets secondaires dus à l'affectation des cellules normales. Les enjeux au niveau de la recherche pharmaceutique sont de produire des molécules qui ciblent spécifiquement les cellules cancéreuses. Mais pour ce faire, il faut d'abord identifier et comprendre les cibles à atteindre. Il existe sur le marché des molécules de ce type, dite molécules intelligentes. L'apparition de ces nouvelles molécules, ciblant la cellule tumorale fait l'effet d'une révolution dans le domaine de la cancérologie. Dans cette catégorie, la plus séduisante est sans conteste le STI571 (Glivec®, Novartis), qui cible l'anomalie moléculaire des cellules exprimant la protéine bcr-abl (leucémie myéloïde chronique, leucémie aiguë lymphoblastique Ph1+). D'autres molécules ciblant des protéines de transduction du signal (inhibiteur de la farnésylation de ras par exemple) sont déjà en cours d'essais thérapeutiques. L'avènement des anticorps monoclonaux thérapeutiques est également à remarquer, avec surtout le rituximab (MabThéramd, Genentech), qui est un anticorps monoclonal chimérique murin-humain qui se lie à l'antigène CD20 présent à la surface des lymphocytes B, est utilisé dans les pathologies lymphoïdes B, des lymphomes aux maladies auto-immunes. Sa très bonne tolérance le rend utilisable en ambulatoire, et sa combinaison avec les chimiothérapies ou sa liaison avec des radioéléments en fait une molécule déjà indispensable. Le revers de ces nouvelles thérapeutiques est leur coût exorbitant et pour préserver les bénéfices d'un traitement ciblé, il faut savoir profiler les tumeurs qui seraient potentiellement sensible. Autrement dit, une molécule "intelligente" n'apporte pas un traitement universel.

## **C - I - Exemples de nouvelles thérapeutiques du cancer**

### **C - I - 1 . Herceptin : Anticorps anti-récepteur EGF (Epidermal Growth Factor)**

La sous-famille de la superfamille des récepteurs tyrosine kinase (RTK) comprend les récepteurs ERBb et se compose de quatre membres: EGFR/ErbB1, HER2/ErbB2, ErbB3 et ErbB4. Tous les membres ont un domaine extracellulaire portant le site de liaison au ligand (aussi appelé ectodomain), une région transmembranaire de 23 acides aminés et un domaine



cytoplasmique portant l'activité tyrosine-kinase. Les Tyrosine kinases sont une classe d'enzymes qui catalysent le transfert du dernier phosphate d'une molécule d'ATP (adénosine triphosphate) sur un résidu tyrosine de protéines substrats, qui équivaut à la phosphorylation d'un résidu tyrosine de la protéine cible.

Les récepteurs EGF sont exprimés dans différents tissus épithéliales, mésenchymateuses et d'origine neuronales. Dans des conditions normales, l'activation des récepteurs EGF est contrôlée par l'expression spatiale et temporelle de leurs ligands, qui sont membres de la famille de facteurs de croissance EGF. La liaison du ligand aux récepteurs ErbB induit la formation de récepteurs homo- et hétéro-dimères et l'auto-activation du domaine kinase intrinsèque, entraînant la phosphorylation sur des résidus tyrosine kinase spécifiques dans la queue cytoplasmique. Ces résidus phosphorylés permettent de révéler le site actif qui permettra la phosphorylation de diverses protéines, qui conduira à l'activation des voies de signalisation intracellulaire.

EGFR et HER2 jouent un rôle essentiel dans la régulation de la prolifération cellulaire et la différenciation. Ils ont une forte tendance à se dimériser avec d'autres récepteurs HER suite à la fixation de facteurs de croissance extracellulaires, ce qui se traduit par diverses formes de voies de transduction du signal d'activation, menant à l'apoptose, la survie ou la prolifération cellulaire. Des résultats donnent à penser que non seulement l'expression ou la surexpression du récepteur, mais aussi la communication entre les récepteurs HER jouent un rôle crucial dans le comportement de la tumeur (Kumagai et al., 2001). En particulier, la liaison des ligands des récepteurs spécifiques à l'ectodomaine de l'EGFR résulte souvent dans le recrutement de HER2, comme le partenaire préférentiel pour la dimérisation (Klapper et al., 1999). Comme HER2 est le seul membre de la famille HER à ne pas lier un ligand spécifique connu, sa principale fonction biologique semble résulter de sa participation au complexe hétérodimerique avec EGFR ou d'autres récepteurs (Konecny et al., 2006).

Le gène codant pour la protéine HER2 est un proto-oncogène appelé HER2/neu (Di Fiore et al., 1987). Ce gène a été identifié au niveau du chromosome 17q21. Le terme HER2/neu signifie Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (récepteur pour les facteurs de croissance épidermaux humains) et il est spécifié neu en raison de la conséquence qu'amène sa mutation (Slamon et al., 1989). De plus, le gène HER2 est un homologue du

gène NEU isolé à partir de cellules de neuroglioblastome induites chez le rat et de l'oncogène v-erb-B du virus de l'érythroblastose aviaire

Herceptine (Roche) est le nom commercial pour trastuzumab, un anticorps monoclonal murin humanisé de la classe des immunoglobulines G1 (IgG1). L'objectif de ce traitement est d'inhiber la croissance de tumeurs et de cellules cancéreuses présentant une surexpression de la protéine HER2 (Pietras et al., 1998; Slamon et al., 2001, Roses et al., 2004). Pour accomplir sa tâche, l'Herceptine se lie à la région extracellulaire de la protéine ancrée à la membrane. Par ce phénomène, il inhibe l'action de ces récepteurs en causant leur internalisation ce qui permet de détruire directement le récepteur. De plus, il bloque leur dimérisation donc aucune activité kinase n'est possible. Enfin, il stimule la formation de tétramère de protéine Her2, un état oligomérique non propice à l'activité kinase. Grâce à son action, il en résulte ainsi une baisse de production des protéines oncogènes. Toutefois, ce traitement ne concerne qu'environ 25 à 30% des patientes atteintes du cancer du sein : celui qui présente une mutation du gène Her2 codant pour un récepteur à la surface de la cellule cancéreuse. C'est ainsi que l'Herceptine exercera son action en bloquant de façon spécifique ce récepteur et par la même occasion, il contribue à diminuer la croissance des tumeurs. De plus, il est efficace chez les femmes ayant un cancer du sein en phase précoce afin de prévenir une récurrence du cancer. C'est en association avec la chimiothérapie que le Trastuzumab a démontré clairement un avantage vis-à-vis de la chimiothérapie seule dans le traitement du cancer du sein métastatique. Ses avantages sont autant au niveau des taux de réponses que de la survie prolongée. Il est très important que ce traitement ne soit utilisé que chez les patientes « HER2+ » car chez les autres, l'anticorps est totalement inactif, voire toxique sur les cellules normales (Hortobagyi et al., 2005 ; Romond et al., 2005 ; Piccart-Gebhart et al., 2005). L'Herceptine est le premier traitement du cancer du sein qui vise une altération génétique spécifique aux cellules malignes sans toucher les cellules saines.

### **C - I - 2. Glivec ® (imatinib mesylate), Inhibiteurs de tyrosine kinase : Traitement de la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) à celui des cancers bronchiques à petites cellules.**

Le Glivec ou STI-571 est le premier médicament anti-cancéreux de sa catégorie : il fait partie des "anti-tyrosine-kinases". Il est utilisé spécifiquement dans le traitement de certaines leucémies myéloïdes chroniques (LMC). Ce médicament empêche l'action d'une enzyme (la

tyrosine-kinase), enzyme qui contrôle le développement et la mort des cellules cancéreuses de la LMC qui sont "Chromosome Philadelphie positives" (95% des LMC). Le principe de ce médicament permet d'épargner les cellules saines et de cibler les protéines qui se dérèglent à l'intérieur des cellules cancéreuses. L'étude réalisée sur 532 patients, a démontré que 90% d'entre eux ont retrouvé un niveau normal de globules blancs suite à la prise du Glivec, qui est administré à raison de quatre prises orales par jour.

Les tyrosines kinases sont des enzymes clés du contrôle positif de la multiplication cellulaire. Fréquemment des mutations de proto-oncogènes en oncogènes sont dues justement à des mutations du domaine kinase rendant l'activité tyrosine kinase constitutive et non régulée. C'est le cas dans la LMC où la translocation (9;22) aboutit à l'expression d'une protéine de fusion bcr-abl qui possède une activité tyrosine kinase permanente. Il a été clairement démontré que cette activité tyrosine kinase constitutive est le *primum movens* de la LMC (Aaronson et al., 1991).

Compte tenu de ces faits, des essais d'inhibition de l'activité tyrosine kinase ont été très tôt tentés dans le but d'arrêter voire de supprimer la prolifération des cellules transformées de cette façon. La découverte de petites molécules inhibitrices de l'activité tyrosine kinase, par interférence avec la liaison à l'ATP, a grandement amélioré les résultats obtenus *in vitro*. Plus petits, la pénétration intracellulaire de ces composés est meilleure, de plus leur interaction avec le site tyrosine kinase peut être étudié par cristallographie X. Avec le design informatique, ce type d'étude facilite la synthèse de nouveaux composés possédant de meilleures activités inhibitrices de l'activité enzymatique. Ainsi a été obtenu un composé, le STI 571, dérivé de la 2 phenolaminopyrimidine qui inhibe très fortement l'activité tyrosine kinase des protéines codées par les gènes v-abl, c-abl, et surtout bcr-abl. Son action inhibitrice repose sur son activité compétitrice avec l'ATP au niveau de la poche de liaison de la protéine avec ce dernier.

Le STI 571 a démontré également une activité inhibitrice *in vitro* vis-à-vis d'autres tyrosines kinases que celles des protéines de la famille abl notamment vis-à-vis de celles de c-Kit et du PDGF. Kit est un récepteur de facteur de croissance, son ligand est le Mast Cell Factor ou facteur Steel qui joue un rôle capital dans la multiplication de la différenciation des

précurseurs précoces hématopoïétiques. Kit est également exprimé à la surface d'autres types cellulaires que les progéniteurs hématopoïétiques : mélanocytes, cellules germinales et cellules de cancers bronchiques à petites cellules (CBPC). Ces derniers expriment également son ligand, le facteur steel. (Krystal et al., 2000)

La survie des malades atteints de leucémie myéloïde chronique est encore améliorée avec le Glivec® (Source : Caducee.net - DUKE UNIVERSITY NEWS, Medical Center & Health System News Office). Des patients traités par imatinib (STI571, Glivec® ou Gleevec® (USA)) en traitement de première intention pour une leucémie myéloïde chronique (LMC) pourraient espérer vivre six années de plus en moyenne que ceux traités par la combinaison de d'interféron alpha et la cytosine-arabine (IFN+Ara-C). Cette étude a été réalisée par une équipe du Duke Clinical Research Institute (Durham). Le modèle de survie présenté repose sur les données couplées d'études européennes et de l'étude IRIS (International Randomized Interferon vs. STI571). Selon le modèle utilisé, les patients traités par imatinib pourraient vivre en moyenne 15,3 ans comparés à 9,1 ans pour les patients traités par IFN+Ara-C. L'espérance de vie serait aussi meilleure pour les patients qui passeraient d'un traitement IFN+Ara-C à un traitement basé que l'imatinib.

Le Glivec® est à présent systématiquement proposé en première intention car il est plus efficace, mieux toléré et plus aisé d'administration que l'interféron. Une étude de suivi sur cinq ans confirme l'efficacité durable de ce composé chez des patients (non pré-traités) en phase chronique de LMC. A cinq ans, le taux de survie est même de 90 % ! Mais parfois, les sujets ne répondent pas au traitement ou développent des résistances particulièrement lorsque la maladie est en phase de transformation aiguë.

Les sujets jeunes, résistants au Glivec, peuvent se voir proposer une greffe de moelle. Mais elle nécessite des donneurs compatibles et s'accompagne d'une mortalité qui n'est pas négligeable (de l'ordre de 20 %). Aujourd'hui, de nouvelles thérapies ciblées existent ou sont en cours de développement, commercialisées depuis peu, le dasatinib (Sprycel commercialisé depuis 2006 par les laboratoires Bristol-Myers Squibb) est une thérapie dite multi-sites car agissant sur plusieurs voies oncogéniques ; en phase de test, le nilotinib actuellement testé par les laboratoires Novartis, déjà à l'origine du Glivec.

### **C - I - 3 . Les protéines anti-apoptotiques comme cibles thérapeutiques, exemple de la molécule Obatoclax (GX15-070)**

Obatoclax (GX15-070) est une petite molécule bipyrrrole indole, qui a été découverte et élaborée par Gemin X. Obatoclax est un inhibiteur à large spectre des protéines anti-apoptotiques représentées par la famille Bcl-2. Si la cellule contient un nombre excessif de protéines anti-apoptotiques, les interactions protéines-protéines empêchent les protéines pro-apoptotiques de déclencher l'apoptose (Perez-Galan et al., 2007 ; Trudel et al., 2007). De petites molécules thérapeutiques peuvent se loger dans le sillon des protéines anti-apoptotiques, et empêcher l'établissement des interactions protéine-protéine afin de redonner aux cellules leur capacité à s'autodétruire en réponse à un stress. L'expression accrue de protéines anti-apoptotiques est la caractéristique de nombreux cancers et les médicaments susceptibles de les inhiber font l'objet de recherches intensives.

Obatoclax est un médicament hydrophobe qui se concentre dans les membranes où se trouvent les protéines Bcl-2. Dans un contexte de membrane *in situ*, il a montré qu'il pouvait inhiber radicalement les interactions anti-apoptotiques avec les protéines effectrices de l'apoptose. Des études complémentaires ont montré qu'Obatoclax est un antagoniste anti-Bcl-2 à large spectre qui inhibe les cinq membres anti-apoptotiques de cette famille de protéines (Perez-Galan et al., 2007 ; Trudel et al., 2007).

L'innocuité et le mécanisme d'action de l'Obatoclax ouvre des possibilités pour le traitement de plusieurs formes de cancer, soit en monothérapie, soit en association avec d'autres médicaments. Obatoclax est en cours d'évaluation dans le cadre de plusieurs essais cliniques de phases 1 et 2 parrainés par Gemin X et le National Cancer Institute (NIH) pour le traitement de plusieurs tumeurs solides et cancers hématologiques. Outre son activité clinique dans plusieurs indications, l'Obatoclax est généralement bien toléré sans preuve d'immunosuppression ni de myelosuppression.

#### **C - I - 4. Induction de l'apoptose par des inhibiteurs d'interaction protéine-protéine : exemple des nutlins**

En 2004, le Dr. Vassilev et son équipe (Hoffman-La Roche Inc., Nutley, New Jersey) ont décrit une classe d'antagonistes qui inhibent le complexe p53-Mdm2. Ils ont réussi à synthétiser les premières molécules antagonistes sélectives pour l'interaction entre p53 et Mdm2: les Nutlins. Ces dérivés cis-imidazolines se lient fortement à la poche de liaison de p53 sur Mdm2 (Vassilev et al., 2005; Vassilev et al., 2004). La structure par cristallographie du complexe Mdm2-Nutlin révèle que les Nutlins projettent des groupes fonctionnels dans la poche de liaison qui miment l'interaction des trois acides aminés critiques de p53 pour son interaction avec Mdm2, soit Phe<sup>19</sup>, Trp<sup>23</sup> et Leu<sup>26</sup> (Klein and Vassilev, 2004).

Dans les cellules tumorales portant une p53 de type sauvage (p53+/+), les Nutlins agissent premièrement en pénétrant les membranes cellulaires et en liant la cavité hydrophobique dédiée à p53 située sur la molécule Mdm2. Cette nouvelle interaction permet donc le blocage de la liaison entre p53 et Mdm2, la libération de p53 de son régulateur négatif mène à sa stabilisation et à son accumulation au niveau du noyau, et finalement, à l'activation des différents gènes cibles de p53. L'activation de la voie p53 dans des cellules cancéreuses se manifeste par l'arrêt en phases G1 et G2 et par l'apoptose dépendante des caspases (Klein and Vassilev, 2004).

Les nutlins sont prédits pour le traitement de divers cancers, ceux du poumon (Dey et al., 2007), des os (Zaulig et al., 2007), du sang (Janz et al., 2007, Stühmer et al., 2006, Kojima et al., 2005), des neuroblastomes (Van Maerken et al., 2006) et du colon (Wang et al., 2006). Ils montrent un fort intérêt en association avec des molécules déjà utilisées en clinique, soit en protégeant les cellules saines pendant le traitement anti-cancéreux (Jiang et al., 2007), soit en potentialisant l'action des molécules utilisées (Coll-mullet et al., 2006, Ambrosini et al., 2007, Graat et al., 2007).

Les traitements anticancéreux sont actuellement abordés plus au niveau de l'origine tissulaire des tumeurs mais au vu des nouvelles thérapeutiques intégrant les molécules intelligentes, leurs schémas sont et seront mis en place plus en fonction du statut génétique et protéomique des cancers. Le tout dans le but d'améliorer la prise en charge des patients, pour des résultats plus efficaces et en évitant aussi des chimiothérapies lourdes non adaptées aux patients. On comprend d'autant plus l'intérêt de la réalisation d'une collecte d'informations biologiques sur des cellules cancéreuses et de tumeurs, prodiguée par le plan cancer mis en place en 2003. Ces bibliothèques d'information de la recherche à l'échelle nationale permettraient de caractériser au mieux les tumeurs et de faciliter les échanges avec les équipes de recherche internationales : l'objectif posé est la constitution d'une base d'analyses clinico-biologiques de 100 000 tumeurs.

## REVUES BIBLIOGRAPHIQUES

### ***D - Translationally controlled tumor protein : TCTP***

#### **D - I - Présentation de la protéine**

##### **D - I - 1. Caractéristiques moléculaires de TCTP**

Il y a environ 25 ans, TCTP (translationally controlled tumor protein) a été identifié dans la recherche de protéines liées à la croissance. La stimulation de la croissance par ajout de sérum sur les cellules NIH3T3 résulte en une augmentation de l'expression de 20 protéines. Le traitement de ces cellules avec de l'Actinomycine D, un inhibiteur de la transcription, montre qu'environ la moitié de ces protéines sont régulées au niveau de la traduction (Thomas et Thomas, 1986, Thomas et al., 1981). Une de ces protéines est nommée Q23. D'autres expériences utilisant des cellules de sarcomes de souris, ont identifié que l'ARNm de P21 est abondamment présent sous forme de particules non traduites mRNP (messenger ribonucléoprotéine) (Yenofsky et al., 1982), ces particules sont également présentes dans les cellules murines érythroleucémiques (Chitpatima et al., 1988, Yenofsky et al., 1983). La stimulation sérique de cellules tumorales murines provenant d'ascites Ehrlich conduit à une augmentation de P23 ; de plus l'inhibition de la transcription par Actinomycine D conduit à une stimulation de sa traduction. La régulation du niveau de la traduction est une propriété typique des protéines de la croissance afin de répondre aux besoins cellulaires de manière adéquate (Benndorf et al., 1988, Bohm et al., 1991, Bohm et al., 1989). Les appellations Q23, P21 et P23 sont basées sur le poids moléculaire apparent de la protéine en gel d'électrophorèse SDS-PAGE, le poids calculé, déduit de la taille de la séquence d'ADNc, est 19,5kDa (Sanchez et al., 1997).

Le nom TCTP, translationally controlled tumor protein (Gross et al., 1989), est basé sur le fait que l'ADNc a été obtenu à partir de carcinome mammaire, et que cette protéine soit régulée au niveau de la traduction. Par la suite, plusieurs publications ont montré que cette protéine n'était pas restreinte uniquement aux cellules tumorales mais qu'elle s'exprimait de manière ubiquitaire dans les cellules humaines normales (Sanchez et al., 1997, Thiele et al., 2000). TCTP s'exprime dans de nombreux organismes, allant de l'unicellulaire, levure,



plantes et invertébrés aux vertébrés. De plus, une forte conservation de la séquence à travers la phylogénie sur une longue période de l'évolution, appuie l'hypothèse d'une fonction physiologique cellulaire importante (Bini et al., 1997, Bommer and Thiele 2004, Pay et al., 1992, Thaw et al., 2001). La forte expression de TCTP au cours de la phase exponentielle de croissance de *Saccharomyces cerevisiae*, 100.000 copies/cellules contre 60.000 copies/cellules pour l'actine, classe TCTP comme étant l'une des protéines les plus exprimées (Norbeck and Blomberg 1997) et indique que TCTP peut être une protéine de la croissance.

L'expression de TCTP est induit sous des conditions variées de croissance, de stress et par des substances chimiques de structures diverses (Andree et al., 2006, Walsh et al., 1995, Sinha et al., 2000, Li et al., 2001, Sturzenbaum et al., 1998, Kim et al., 2001, Oikawa et al., 2002). La première analyse du contrôle transcriptionnel du gène *tpt-1* humain révèle que le phorbol ester et la forskolin stimulent la synthèse de TCTP par les facteurs de transcription CREB (cAMP-responsive element binding proteine) via le signal AMPcyclique (Andree et al., 2006). Schmidt démontre que certaines de ces substances, comme les métaux lourds tels que le cuivre, le cobalt, le nickel et la dioxine, agissent au niveau post-transcriptionnel sur les extrémités UTR de l'ARNm de TCTP (Schmidt et al., 2007). Dernièrement, Sun a montré qu'une diminution de l'expression de p53 dans une lignée cellulaire de carcinome nasopharyngique (NPC) induit l'augmentation de l'expression protéique de TCTP (Sun et al., 2007).

La comparaison de la séquence primaire d'acides aminés avec les séquences connues dans les banques de protéines n'a révélé aucune homologie avec d'autres familles protéiques (Bohm et al., 1989). TCTP est une protéine hautement conservée entre les espèces, dans le laboratoire de Craven (Université de Sheffield), Thaw a apporté la solution de la structure de TCTP de la levure *Schizosaccharomyces pombe*, qui définira, sur les bases d'homologies de séquences, la structure pour les autres espèces (Thaw et al., 2001). L'analyse de la structure 3D de TCTP de levure montre une homologie de structure avec Mss4 humain et son homologue dans la levure Dss4 (Thaw et al., 2001). Mss4 est le suppresseur de *sec4*, une protéine chaperonne qui se lie à la forme GTP/GDP libre des protéines Rab (Nuoffer et al., 1997). À l'origine, Mss4 a été identifié comme un facteur d'échange de guanine (GEF) pour les protéines Rab. Les protéines Rab sont des protéines G faisant partie de la super famille Ras. Ces protéines jouent un rôle important dans le transport des vésicules, notamment au

niveau du contrôle de la destination des vésicules dans la voie de sécrétion (Boguski and McCormick 1993, Pai et al., 1998). Le site de liaison de Mss4 à Rab correspond aux régions les plus conservées dans TCTP. Cette similitude de structure entre TCTP et Mss4 suggère un rôle possible pour TCTP en tant que chaperonne de protéines G.

#### **D - I - 2 . Activités extracellulaires de TCTP**

En 1995, le groupe de Susan Mac Donald attribue à TCTP des nouvelles fonctions cytokines. Ils ont découvert des fonctions de stimulation de la sécrétion d'histamine pour TCTP, et ont renommé TCTP : HRF pour *Histamine-Releasing Factor* (Mac Donald et al., 1995). Ils montrent l'implication TCTP sur la libération de l'histamine par les cellules basophiles, dans la phase tardive de réaction (LPR) de l'allergie pathologique. En plus de l'histamine, les basophiles stimulés par HRF/TCTP sécrètent aussi de l'IL-4 et IL-13 de manière IgE dépendante. (Schroeder et al., 1996, Schroeder et al., 1997). Plus les basophiles humains sont stimulés par IL-3 et plus TCTP/HRF est sécrété, suggérant une boucle autocrine possible pour TCTP/HRF (Nielsen et al., 1998).

Les HRFs font partie d'un groupe hétérogène de facteurs qui stimulent la sécrétion d'histamine par différents modes d'actions. Ils peuvent être divisés en deux groupes ; HRF IgE-dépendant et IgE-indépendant. Les HRFs IgE-dépendant sont subdivisés en facteurs liant ou non les IgE. TCTP/HRF fait partie du dernier groupe, c'est un HRF dépendant de l'IgE mais ne se liant pas directement à lui (Liu et al., 1986, Mac Donald et al., 1996, Wantke et al., 1999). Récemment, TCTP de la moisissure *Cladosporium herbarum* est défini comme étant un de ces allergènes et se lie aux anticorps IgE produits par les patients allergiques à ce champignon et serait corrélé à la sévérité de leur fond asthmatique (Rid et al., 2008). TCTP/HRF isolé à partir de surnageants de cellules murines d'érythro-leucémie, a montré un potentiel de facteur de croissance sur les cellules B (Kang et al., 2001). Enfin, TCTP/HRF a aussi été montré comme étant une cytokine qui stimule les éosinophiles à produire de l'IL-8 (Bheekha-Escura et al., 2000). Dernièrement, Vonakis et ses collaborateurs décryptent la voie de signalisation induite par TCTP/HRF sur les basophiles portant le récepteur à TCTP, elle comprend la phosphorylation de Akt, MEK, ERK, Syk et du récepteur FCεRIγ et un changement du taux calcium intracellulaire (Vonaski et al., 2007).

### **D - I - 3 . Interactions moléculaires**

Une des premières propriétés moléculaires décrites de TCTP est sa capacité à lier le calcium (Haghighat et al., 1992, Rao et al., 2002, Sanchez et al., 1997, Xu et al., 1999). Le domaine de liaison au calcium est localisé à la position 81-112 (Kim et al., 2000). Une augmentation de la concentration cytoplasmique de calcium induit une augmentation de l'expression de TCTP à la fois au niveau de la transcription et de la traduction. Une élévation soutenue de la concentration calcique intra-cytoplasmique peut mener à la mort cellulaire par apoptose et nécrose (Trump and Berezesky 1996, Graidist et al., 2007); un rôle possible pour TCTP serait de « tamponner » par séquestration du calcium qui serait libéré en réponse à des stimuli apoptotiques. La localisation du site de liaison est remise en cause par Feng (Feng et al., 2007) qui détermine une structure de TCTP humain par RMN et cartographie un site de liaison pour le calcium de faible affinité. Les résidus interagissant avec le calcium définis dans cet article sont l'asparagine 131, la glutamine 132 et l'acide aspartique 150.

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). D'ailleurs, Kim et ses coll. (Kim et al., 2007) montrent que des souris transgéniques sur-exprimant TCTP développent une hypertension artérielle par répression de la pompe NaK-ATPase ; et propose TCTP comme une cible thérapeutique pour le traitement de l'hypertension.

eEF1A et eEF1B $\beta$  ont été identifiés comme de nouveaux partenaires de TCTP par criblage en double hybride dans la levure en utilisant TCTP comme appât, (Cans et al., 2003, Langdon et al., 2004). Ces deux protéines sont impliquées dans l'étape d'élongation de la synthèse des protéines. eEF1A est l'homologue eucaryote de EF-Tu bactérien qui recrute les acides aminés chargés sur l'ARNt. eEF1A est une protéine G, qui est active sous la forme liée au GTP et se lie à l'ARNt-aminoacyl. Une fois placé sur le ribosome, le GTP s'hydrolyse et eEF1A-GDP est relargué. L'activité d'eEF1A est restaurée par les facteurs d'échange de guanine (GEF) eEF1B $\alpha$  et eEF1B $\beta$ , qui sont les homologues eucaryotes de EF-Ts bactériens, remplacent le GDP par du GTP. Il a été montré que TCTP stabilise la forme d'eEF1A-GDP et qu'il inhibe l'activité GEF d'eEF1B $\beta$  mais pas celle d'eEF1B $\alpha$ , ces résultats sont en faveur pour définir TCTP comme inhibiteur de la dissociation du GDP (GDI) (Cans et al.,

2003). Chez la drosophile, TCTP régule et interagit directement avec Rheb, *Ras homologue enriched in brain*, une GTPase de la superfamille Ras. Rheb stimule la croissance cellulaire et est un effecteur important de la voie de signalisation Insulino récepteur/mTOR. Rheb est directement inactivé par TSC1 et TSC2, leurs formes mutantes causent chez l'humain un syndrome bénin la *tuberous sclérosis*. TSC1 et TSC2 qui sont des protéines GAP pour Rheb. Hsu et ses collaborateurs montrent que TCTP drosophile contrôle la croissance et la prolifération cellulaire en régulant positivement l'activité de Rheb, TCTP est donc une GEF pour Rheb (Hsu et al., 2007).

TCTP se lie à la tubuline *in vitro* et montre une homologie de séquence avec le domaine de liaison à la tubuline de la protéine MAP-1B (microtubule associated protein). TCTP est associé au cytosquelette de microtubules de manière dépendante au cycle cellulaire et est lié durant les phases G1, S, G2 et M précoce. Au cours de la transition métaphase anaphase, TCTP se détache des microtubules. Le sevrage en sérum des cellules, qui bloque les cellules en G0, ne montre aucune association de TCTP à la tubuline. Durant la métaphase, il a été montré que TCTP se lie aussi aux fuseaux mitotiques (Gachet et al., 1999). Les expériences de surexpression de TCTP affectent le cytosquelette de microtubules, la morphologie des cellules et leur croissance. Mmi1, *microtubule and mitochondria interacting protein*, est une protéine orthologue de TCTP dans la levure, elle interagit et stabilise aussi les microtubules (Rinnerthaler et al., 2006)

Le criblage par double hybride révèle que TCTP interagit avec la polo-like kinase (Plk) (Yarm et al., 2002). Les mitotiques polo-like kinases sont des serine/thréonine kinases, impliquées dans la formation et la fonction des fuseaux bipolaire et de leur dynamiques au cours de la mitose. Les protéines associées aux microtubules (MAP) sont des substrats de la Plk. TCTP est phosphorylé sur les résidus sérine 46 et 64 par la Plk. Cette phosphorylation semble causer le détachement de TCTP des fuseaux. La surexpression du mutant TCTP 46/64, déficient pour la phosphorylation par la Plk, donne des cellules multinuclées et apoptotiques, ce qui signifierait être dû à la différence d'affinité de TCTP aux microtubules durant la transition métaphase anaphase (Yarm et al., 2002). TCTP est qualifié de non-MAP, bien qu'il stabilise les microtubules comme ces dernières.

Par double hybride, TSAP6 a été également montré s'associant de manière spécifique à TCTP (Amzallag et al., 2004). TSAP6, l'homologue humain de la protéine de rat Phyde, est une protéine à 6 domaines transmembranaires. A l'origine décrite parmi l'une des protéines activées par p53 au cours du processus de réversion tumorale (Amson et al., 1996). Les études d'immuno-fluorescence indiquent que TSAP6 et TCTP sont partiellement co-localisés au niveau de structures vésiculaires. La sur-expression de TSAP6 inductible par p53 aboutit à une augmentation de la sécrétion de TCTP (Passer et al., 2003, Amzallag et al., 2004). Cette étude démontre que TCTP est sécrété via des vésicules et non par la voie classique de sécrétion du système réticulum endoplasmique/appareil de golgi.

La diminution de TCTP induit l'apoptose (Graidist et al., 2004, Li et al., 2001, Liu et al., 2005, Tuynder et al., 2002, Yang et al., 2005). De plus, plus TCTP est exprimé dans les cellules Hela et Saos, plus les cellules sont protégées de la cytotoxicité induite par du 5-fluouracil ou de l'étoposide (Graidist et al., 2004, Li et al., 2001). Un criblage par double hybride utilisant Mcl-1 comme appât récupère TCTP comme protéine partenaire (Zhang et al., 2002). Ces auteurs proposent un rôle potentiel de Mcl-1 comme protéine chaperonne pour TCTP. Mcl-1 est une protéine anti-apoptotique appartenant à la famille Bcl-2. Mcl-1 est décrit pour jouer un rôle pivot dans de nombreux programmes de développement animal. Il a une courte durée de vie et sa dégradation entraîne l'apoptose des cellules, indiquant qu'il peut jouer un rôle dans la survie à court terme (Moulding et al., 1998). TCTP interfère avec la dégradation de Mcl-1 via le protéasome par une inhibition de l'ubiquitination de Mcl-1 (Liu et al., 2005). À l'inverse, Yang propose que TCTP soit une protéine chaperonne pour Mcl-1. Récemment, TCTP a été montré interagissant avec sa région N-terminal avec le domaine BH3 de la protéine Bcl-xL (Yang et al., 2005). Ce domaine de liaison qui interagit aussi avec Mcl-1 a été montré déterminant pour son activité anti-apoptotique. De plus, Rinnerthaler et ses collaborateurs montrent que Mmi1 (homologue de TCTP chez la levure) a des fonctions anti-apoptotique et interagit à la fois avec les microtubules et les mitochondries. Le modèle de structure de Mmi1 est basé sur la structure de TCTP *Saccharomyces pombe*. Cette protéine cytosolique montre une localisation mitochondriale après exposition à des stimuli apoptotiques, de même après induction de BAX, protéine apoptotique membre de la famille Bcl-2 (Rinnerthaler et al., 2006).

Fig 6. Représentation schématique des interactions et fonctions de TCTP dans la cellule :

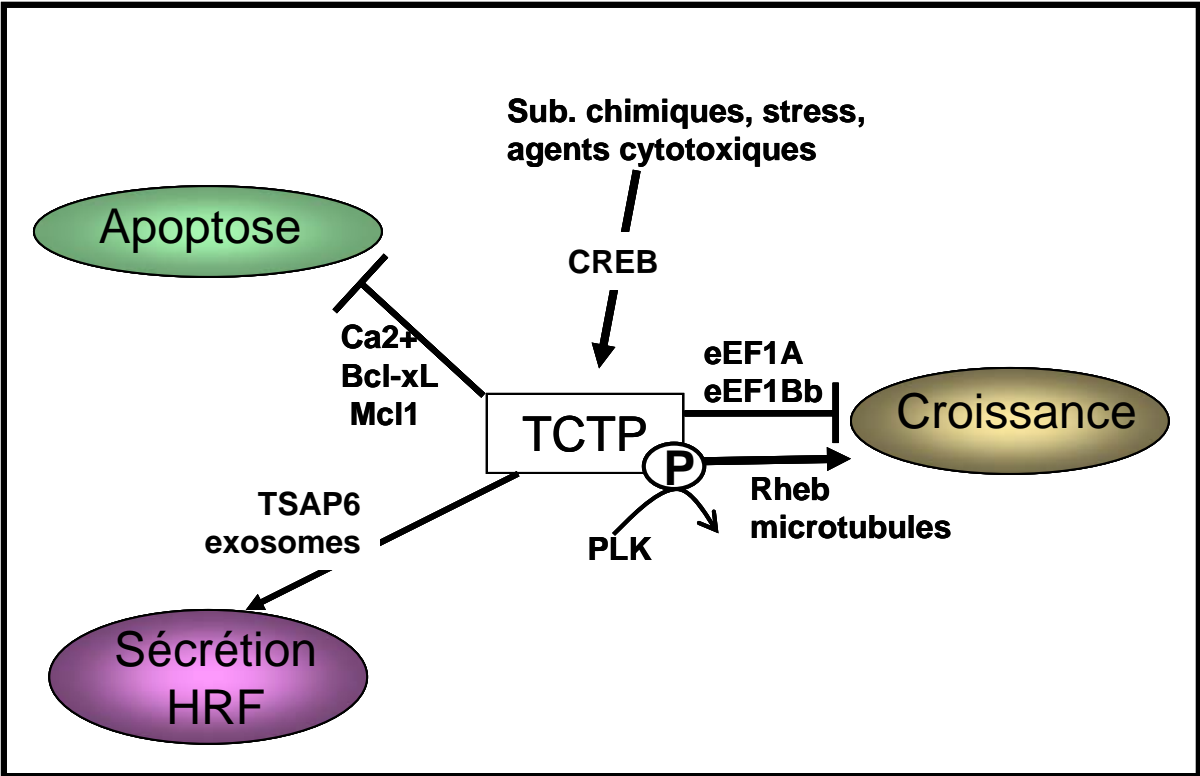


Fig 7. TCTP séquence

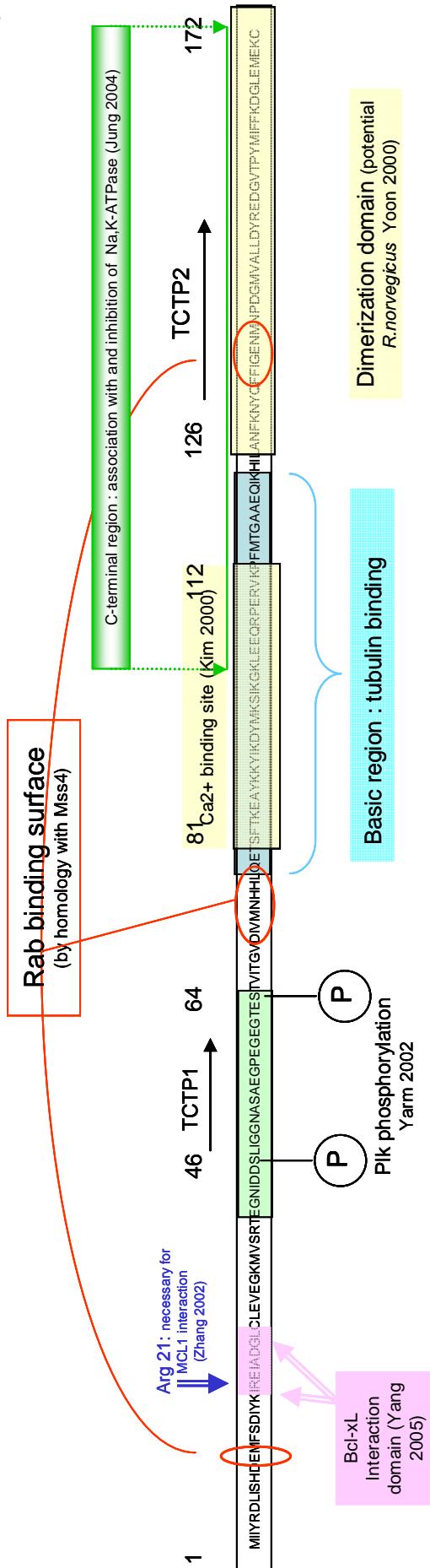


Fig : Représentation de la séquence acides aminés de TCTP humain. Les différents domaines d'interactions et d'homologies connus sont indiqués, TCTP1 et TCTP2 sont les séquences conservées définissant la famille TCTP.

## **D - II - Principaux travaux réalisés sur la protéine TCTP au sein de notre laboratoire**

Au sein du laboratoire Molecular Engines Laboratories (MEL), à la suite des résultats (Tuynder et al., 2002) désignant TCTP comme le gène le plus fortement sous exprimé lors du processus de réversion tumorale, plusieurs études ont été menées en parallèle pour comprendre le degré d'implication de TCTP dans la réversion tumorale. Les différentes caractéristiques biologiques décrites sur TCTP à cette période ; liaisons au calcium - à la tubuline - fonction HRF ...; ne suffisaient pas pour définir le rôle de TCTP dans ce processus. Les diverses investigations menées chez MEL ont montré que TCTP était un élément essentiel de la réversion tumorale et qu'il porte un fort potentiel de cible thérapeutique pour le cancer (Tuynder et al., 2004).

TCTP est le gène le plus fortement réprimé dans le processus de réversion tumorale (Tuynder et al., 2004). En effet, dans l'analyse Megasort, 248 signaux TCTP sont détectés dans les cellules tumorales U937 contre 2 signaux dans les cellules révertantes correspondantes US. La diminution de l'expression de TCTP induit la réorganisation *in vitro* de certaines cellules épithéliales de tumeur du sein en une structure d'acini sur un support cellulaire de membrane basale reconstituée en 3D, reflet du comportement de cellules « normales » épithéliales du sein. La sous expression de TCTP dans les cellules U937 résulte en un fort phénotype de suppression qui a pu être démontré par des études *in vivo* en utilisant des souris scid/scid. De plus, TCTP est fortement surexprimé dans les cellules tumorales par rapport aux cellules normales (Tuynder et al., 2002). Une autre raison de s'intéresser à TCTP est le fait qu'il a été identifié comme étant un partenaire de TSAP6, activée par p53 (Amson et al., 1996, Passer et al., 2003, Amzallag et al., 2004).

Trois modèles expérimentaux ont été développés afin de mieux caractériser TCTP (Tuynder et al., 2004). Dans le premier modèle, de nouvelles lignées cellulaires de réversion tumorale ont été créées. L'isolement de cellules révertantes à partir de différents cancers tels que le cancer du colon, du poumon et des mélanomes a été réalisé en utilisant de nouveau le parvovirus H-1 comme outil de sélection.



Dans le second set d'expériences, la diminution de TCTP dans les cellules NIH3T3 transformées par le virus v-src, induit la formation de *flat revertants* avec une restauration partielle du contrôle de la croissance par inhibition de contact et une dépendance d'ancrage.

Dans le dernier groupe d'expériences, nous avons tenté d'inhiber la voie de TCTP avec des drogues. Une corrélation a été trouvée entre la cytotoxicité de drogues sur des cellules tumorales et la diminution de l'expression de TCTP.

Au cours de ma thèse, j'ai mené différents travaux suivant, pour le développement de molécules ciblant TCTP à but thérapeutique. Une étude cristallographique de TCTP humain a été réalisée et nos analyses structurales ont fait paraître une homologie entre les hélices H2 et H3 de TCTP humain et les 2 hélices H5-H6 de Bax, protéine pro-apoptotique membre de la famille Bcl-2. Nous montrons que TCTP protège les cellules de l'apoptose avec une forte implication des hélices H2-H3 en antagonisant l'activité pro-apoptotique de Bax au niveau des mitochondries (Susini et al., 2008). En parallèle, pour mieux comprendre les fonctions *in vivo* de TCTP, nous avons réalisé une lignée de souris *knock-out* (ko) pour *tpt-1*. Il a fallu au préalable définir le gène fonctionnel codant pour TCTP dans la souris (Fiucci et al., 2003), pour lequel il existe plusieurs pseudogènes murins. Nos premières observations montrent qu'il est impossible d'obtenir des souris viables ko totale pour TCTP, la désactivation du gène *tpt-1* conduit à une létalité embryonnaire précoce (Susini et al., 2008).

Pour mieux comprendre l'implication de TCTP dans l'apoptose, une présentation de la cascade de signalisation de cette voie et de ces principaux intervenants cellulaires est décrite à la suite.

### **D - III - Voie de signalisation de l'apoptose au niveau des mitochondries**

Voir livre: Lewin B, Gene VIII, 2004; Weinberg R.A., the biology of cancer, 2007

Au cours du développement d'un organisme eucaryote pluricellulaires, certaines cellules doivent mourir. Les cellules indésirables sont éliminées au cours de l'embryogenèse, de la métamorphose, du renouvellement tissulaire. Ce processus est appelé mort cellulaire programmée ou apoptose. L'apoptose implique l'activation d'une voie qui mène au suicide de la cellule par un processus caractéristique dans lequel la cellule devient plus compacte, des vésicules se forment au niveau des membranes, la chromatine est condensée, et l'ADN est fragmenté. C'est un processus actif qui dépend de l'ARN et la synthèse des protéines par les cellules mourantes. L'apoptose peut être déclenchée par une variété de stimuli, y compris le retrait des facteurs essentiels de croissance, le traitement par des glucocorticoïdes,  $\gamma$ -irradiation et l'activation de certains récepteurs.

L'apoptose est donc important, non seulement dans le développement des tissus, mais dans la défense immunitaire et à l'élimination des cellules cancéreuses. Aussi, l'activation inappropriée de l'apoptose est impliquée dans les maladies neurodégénératives. Une voie commune pour les fonctions de l'apoptose passe par les caspases. Les caspases sont des protéases qui sont impliquées dans plusieurs étapes de la voie apoptotique. La formation d'un complexe au niveau du récepteur Fas ou TNF active la caspase-8 qui initie la voie intracellulaire de signalisation qui conduit à la libération du cytochrome c de la mitochondrie ; qui à son tour active une cascade de protéases, dont les actions aboutissent à la destruction des structures cellulaires.

Les membres de la famille des caspases (cystéine aspartate protéases) sont des éléments importants en aval de la voie. Les caspases ont une cystéine catalytique, et clive leurs cibles au niveau d'un aspartate. Il y a environ 14 membres de la famille des caspases chez les mammifères. Les caspases se divisent en deux groupes. La sous-famille caspase-1 est impliquée dans la réponse inflammatoire. La sous-famille caspase-3 (composée de caspases 3

et caspase 6 à 10), est impliquée dans l'apoptose. Toutes les caspases sont synthétisées sous forme de pro-caspase inactif, qui ont des séquences supplémentaires à l'extrémité N-terminale. L'activation de la réaction implique le clivage du pro-domaine suivi par le clivage de la caspase elle-même au niveau de la petite sous-unité et de la grande sous-unité. Les caspases avec de grands pro-domaines sont impliquées dans l'initiation de l'apoptose. Leur dimérisation provoque leur clivage autocatalytique qui active la caspase.

L'apoptose implique des modifications au niveau de l'enveloppe mitochondriale. La voie passe de la membrane plasmique à la mitochondrie lorsque la caspase-8 clive la protéine Bid. Le clivage libère le domaine C-terminal de Bid, qui se délocalise à la membrane mitochondriale. L'action de Bid cause le largage du cytochrome c. Bid est un membre de la famille Bcl2 et agit de concert avec d'autres membres cette famille pour libérer le cytochrome c des mitochondries. La mitochondrie est le point de contrôle crucial pour l'apoptose. La libération du cytochrome c est précédée par les changements de la perméabilité de la membrane mitochondriale. Les membres de la famille Bcl-2 agissent au niveau de cette membrane et leur mode d'action est la formation de canaux dans la membrane. L'apoptose implique la localisation et la concentration des membres de la famille Bcl-2 au niveau de la membrane mitochondriale, incluant Bid et Bax impliqué dans la perméabilité de la membrane.

Le cytochrome c active la prochaine étape de l'apoptose. Le rôle fondamental du cytochrome c est le déclenchement de l'activation de la caspase-9. Le cytochrome c déclenche l'interaction de la protéine cytosolique Apaf-1 avec la caspase-9 dans un complexe nommé l'apoptosome. La réaction se fait en plusieurs étapes. Le cytochrome c se lie à Apaf-1. Cela permet à Apaf-1 de lier l'ATP. Ceci, à son tour, lui permet de s'oligomériser, ce qui provoque un changement de conformation qui expose le domaine de liaison à la caspase, puis Apaf-1 se lie à la procaspase-9. L'incorporation de procaspase-9 dans l'apoptosome déclenche l'auto-activation de clivage. La caspase-9, à son tour, clive la procaspase-3 pour générer la caspase-3. La caspase-9 active les caspases-6 et 7. La caspase-3 est, à ce que l'on pourrait appeler le stade effecteur de cette voie. Toutes les cibles essentielles de l'activité de la protéase pour l'apoptose n'ont pas été identifiées. Une cible connue est l'enzyme PARP (poly [ADP-ribose] polymérase) dont sa dégradation n'est pas indispensable à la mort cellulaire, mais est utile pour le diagnostic de l'apoptose.

La voie apoptotique peut aussi être inhibée à l'étape catalysée par les caspases. Les protéines appelées IAP (inhibiteur de l'apoptose) peuvent se lier aux procaspases et aux caspases activées pour bloquer leurs activités. Les activités de blocage des IAPs devront être antagonisées afin de procéder à l'apoptose. Les cellules des vertébrés contiennent une protéine appelée Smac/Diablo, qui est libérée de la mitochondrie, dans le même temps que le cytochrome c, et agit en se liant aux IAPs pour les bloquer.

Une autre voie pour le déclenchement de l'apoptose qui ne passe pas par Apaf-1 et la caspase-9, et qui ne soit pas entravée par Bcl2, implique l'activation de JNK. Différentes cellules utilisent ces voies, à divers degrés. L'apoptose a été présentée pour la première fois être nécessaire pour le développement normal chez *C. elegans*, et les mutations chez des souris knock-out montrent que c'est aussi le cas pour les vertébrés. Chaque cellule peut contenir les composants de la voie apoptotique et être assujetti à la régulation de l'équilibre entre l'activation et la répression de la mort cellulaire.

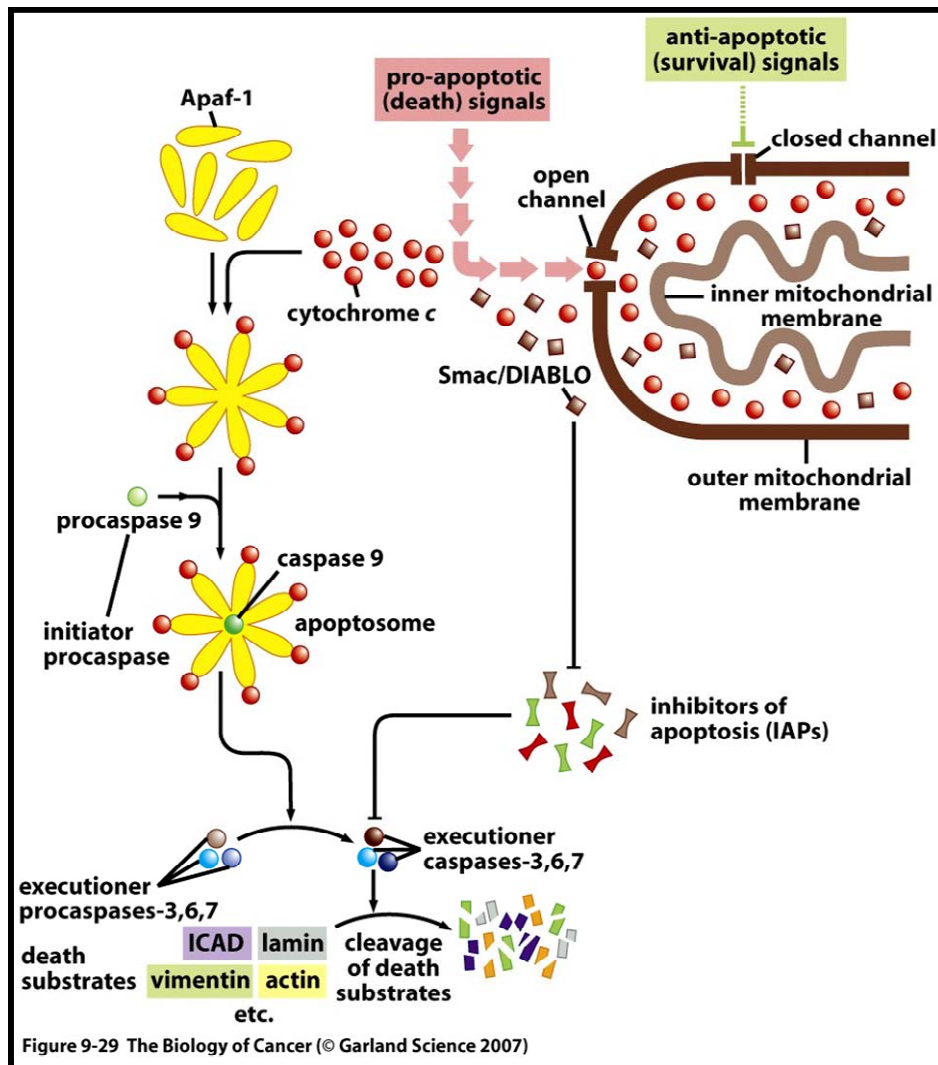


Fig 8. La cascade apoptotique des caspases .

La membrane externe mitochondriale (marron foncé) est le point critique qui détermine la vie ou la mort de la cellule. Plusieurs signaux anti-apoptotiques travaillent pour maintenir fermé les canaux au niveau de cette membrane, en opposition aux signaux de mort pro-apoptotiques qui s'efforcent à ouvrir ces canaux (en haut à droite de la figure). Parmi les molécules libérées dans le cytosol les molécules de cytochrome c (cercle rouge) et les molécules Smac/DIABLO (carrés marron) sont cruciales. Le cytochrome c s'associe avec les molécules Apaf-1 pour former le complexe apoptosome (à gauche de la fig). Ce complexe attire et clive la procaspase 9 en caspase 9 active (cercle vert), qui à son tour clive la procaspase 3. Il en résulte une cascade d'activation par la caspase 3 sur d'autres procaspases (caspases exécutives), qui une fois activées clivent plusieurs substrats dont le clivage cause le phénotype des cellules apoptotiques. Normalement, un nombre d'inhibiteurs de l'apoptose (IAPs, en bas à droite) se lient et inactivent les caspases. Cependant, les molécules Smac/DIABLO qui sont aussi libérées de la mitochondrie antagonisent ces IAPs, de façon à protéger les caspases de l'inhibition par ces protéines. (Weinberg RA, The biology of cancer, 2007)

### **D - III - 1 . Bax et la famille Bcl-2**

L'apoptose, la mort cellulaire programmée, est essentiel pour l'homéostasie cellulaire et tissulaire, impliqué dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques (Evan et al., 2000). Les protéines de la famille Bcl-2 sont des régulateurs clés de ce programme et leur fonction principale est de contrôler la perméabilité des mitochondrie et particulièrement, la libération de protéines apoptogéniques par ces organelles. (Er E. et al, 2006)

Les protéines de la famille Bcl-2 peuvent être divisé en trois groupes basés sur leur structure et sur leur rôle dans l'apoptose (Fig 9) :

Les protéines anti-apoptotique comme Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl-1, NR-13, Boo/Diva/Bcl-2-L-10, Bcl-B, E1B 19K (adénovirus), BHFR1 (Epstein Barr virus), CED-9 (C. elegans). Ces protéines sont caractérisées par la présence de 4 domaines d'homologie Bcl-2 (BH : BH1, BH2, BH3 et BH 4) (Fig 9)

Les protéines pro-apoptotiques telles que Bax Bak, Mok/Mtd et Bcl-xS, contiennent 3 domaines d'homologie BH1, BH2 et BH3.

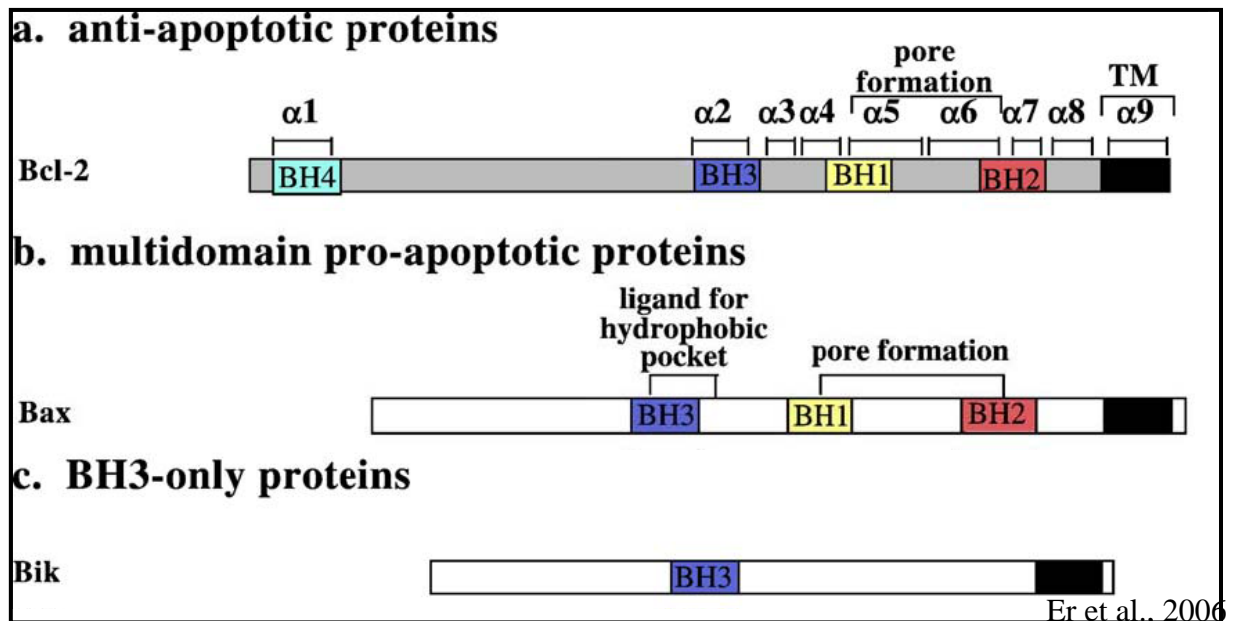
Les protéines qui comportent que le domaine BH3 (BH3-only proteins : BOP), incluant Bid, Bad, Noxa, Puma, Bmf, BimL/Bod, Bik/Nbk, Hrk/DP5, Bnip3 et Bnip3 L, sont des protéines qui induisent l'apoptose par activation des protéines pro-apoptotiques comme Bax ou par inhibition des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2.

La majorité de ces protéines contient dans la partie C-terminal une hélice  $\alpha$  hydrophobe, qui est un domaine transmembranaire potentiel impliqué dans la localisation membranaire au niveau des organelles telles que la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et le noyau (Akao et al., 1994, Krajewski et al., 1993). Ces protéines peuvent former des homo-dimères et/ou des hétéro-dimères (Oltvai et al., 1993, Yang et al., 1995), essentiellement par l'interaction de leur domaine BH3 (Chittenden et al., 1995). Le domaine BH4 qui correspond à la première hélice  $\alpha$  ( $H\alpha 1$ ) des protéines anti-apoptotiques est impliqué dans le contrôle de leurs fonctions « anti-mortalité ».

#### **Fig 9. Représentation de membres de la famille Bcl-2.**

Les régions d'homologie Bcl-2 de 1-4 (BH1-4) sont indiquées. TM représente la région transmembranaire qui sert de médiateur pour la localisation membranaire intracellulaire. A :  $H\alpha$ , la région  $H\alpha 5$ - $H\alpha 6$  qui contient le domaine BH1 correspond à la région « pore forming »

basée sur l'homologie de structure avec les toxines bactériennes. Le domaine BH3 dans les membres pro-apoptotiques est un ligand pour les poches hydrophobes formées par les domaines BH1-BH3 des membres anti-apoptotiques. (Er et al., 2006)



#### D-III-1-1. Localisation cellulaire de Bax

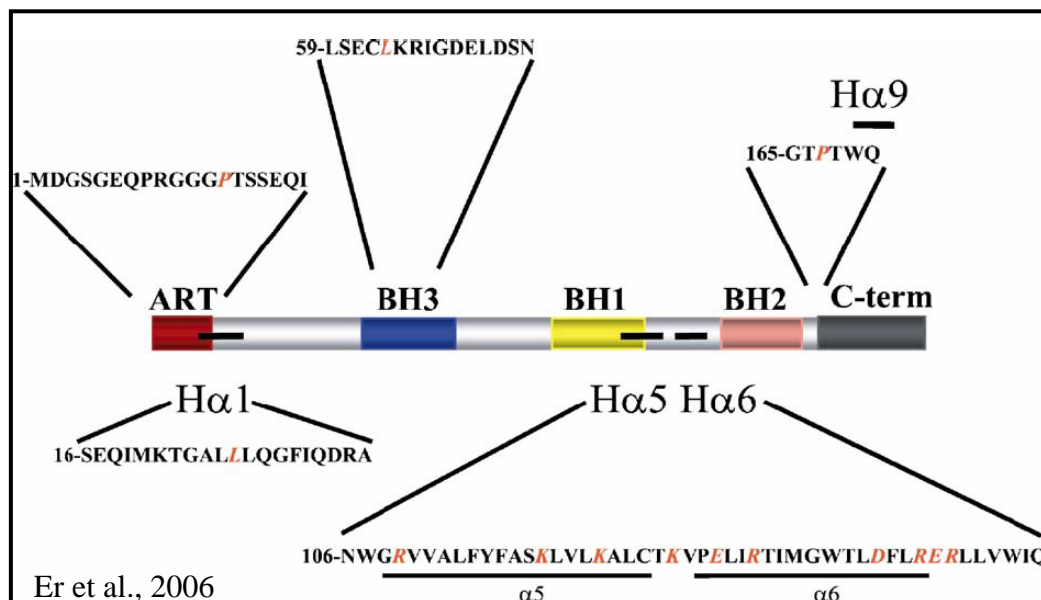
L'activation de Bax durant l'apoptose ne nécessite pas généralement d'une augmentation de la transcription de ce gène. Le fractionnement cellulaire et la microscopie confocal montrent une localisation cytosolique majoritaire de Bax dans une majorité de type cellulaire malgré la présence du domaine transmembranaire putatif en C-terminal (Hsu et al., 1997, Wolter et al., 1997, Hsu et al., 1998). Cependant, la localisation de Bax dans le cytosol n'est pas unanimement observée et différents groupes scientifiques décrivent une localisation mitochondriale constitutive dans les cellules saines (Desagher et al., 1999).

Les données de la structure 3-D par RMN de Bax montrent que hélice hydrophobe  $\alpha 9$  localisé en C-terminal est incurvé dans un sillon hydrophobe. Bien que hélice  $\alpha 9$  soit essentiellement composée d'acides aminés hydrophobe, il contient plusieurs acides aminés polaires (Thr 172-174-182-186 et Ser 184). Excepté la Ser 184, ils sont tous exposés au solvant et contribuent à la solubilité de Bax dans cette conformation. (Suzuki et al., 2000). Les résidus Ser 184 et Pro168 sont essentiels pour la structure de H $\alpha 9$  et la localisation intracellulaire de Bax au niveau de la membrane externe des mitochondries (OMM : Outer Mitochondrial Membrane) (Schinzel et al., 2004, Schinzel et al., 2004, Wolter et al., 1997,

Nechushtan et al., 1999). L'hélice  $\alpha 1$  est aussi impliqué dans l'adressage de Bax aux mitochondries (Cartron et al., 2002). D'autre part, la partie N terminal est importante pour conserver la conformation cytosolique de Bax (Goping et al., 1998, Cartron et al., 2002). Le troisième domaine important dans le processus de translocation de Bax à l'OMM est formé par les hélices centrales H $\alpha 5$ -H $\alpha 6$ , qui constituent le domaine putatif de formation de pores au niveau de l'OMM décrit par Nouraini (Nouraini et al., 2000). Bax semble s'insérer dans les membranes en suivant le modèle décrit pour les toxines bactériennes, avec les surfaces hydrophiles de H $\alpha 5$  et H $\alpha 6$  se faisant face et les côtés hydrophobes face à la phase liquide (Suzuki et al., 2000, Muchmore et al., 1996). Une étude démontre le rôle de H $\alpha 5$  et H $\alpha 6$  comme domaine transmembranaire de Bax (Heimlich et al., 2004).

**Fig 10. Acides aminés cruciaux et domaines de Bax impliqués dans ses fonctions apoptotiques et/ou le ciblage des mitochondries.**

La région N-ter ART (Apoptosis Regulation of Targeting) est essentielle pour la localisation cytosolique de Bax. Les régions d'homologies Bcl-2 sont indiquées, basées sur leur homologie de structure avec Bcl-2. C-term indique l'hélice alpha terminale qui est décrite comme un domaine transmembranaire et le signal d'adressage (Schinzel et al., 2004). Les séquences d'acides aminés des hélices alpha H $\alpha 1$ , H $\alpha 5$ , H $\alpha 6$ , H $\alpha 9$  sont représentées, les résidus cruciaux impliqués dans la translocation de Bax et /ou son activation sont représentés en rouge. (Er et al 2006)





### **D-III-1-2. Activation de Bax**

La forme mitochondriale de Bax trouvée dans les cellules non-apoptotiques est un monomère de 21 kDa légèrement associé avec la membrane externe mitochondriale ou soluble dans le cytosol. Sous induction de l'apoptose, ce monomère évolue en un complexe de haut poids moléculaire (96 à 260 kDa) qui s'insère dans l'OMM, ce qui suggère que l'oligomérisation accompagne l'insertion de Bax au niveau des mitochondrie (Gross et al., 1998, Antonsson et al., 2001, Guihard et al. 2004). Ces complexes apparaissent comme étant des homo-oligomères de 6 à 8 molécules de Bax. L'oligomérisation semble être une étape importante dans l'activation de Bax. L'électron microscopie indique que la translocation de Bax à la membrane des mitochondries est la première étape d'activation de Bax et que l'oligomère associé aux mitochondries est la forme biologique active pro-apoptotique. (Nechushtan et al., 2001) Deux modèles sont proposés pour expliquer l'activation de Bax au cours de l'apoptose. Le premier suggère que Bax est constitutivement associé avec l'OMM, puis subit un changement de conformation sous l'induction de l'apoptose conduisant à la formation d'oligomères et à l'accrochage à l'OMM. (Desagher et al., 1999). Le second modèle suggère que le changement de conformation s'effectue dans le cytosol résultant à l'ouverture de H $\alpha$ 9 C-terminal se qui causerait l'exposition du *pore forming domain* H $\alpha$ 5-H $\alpha$ 6 et probablement aussi l'accessibilité au domaine BH3 et seulement ensuite Bax est adressé aux mitochondries via son extrémité N-ter ou C-ter (Cartron et al., 2005, Schinzel et al., 2004, Schinzel et al., 2004).

## **E - TSAP6 (Tumor Suppressor Activated Pathway 6)**

### **E - I - Présentation de la protéine TSAP6**

Nous avons découvert que TSAP6 est capable de lier et d'induire la sécrétion de la protéine TCTP (Amzallag et al., 2004). TCTP se trouve en partie dans des petites vésicules membranaires dans le milieu extracellulaire appelées exosomes et la surexpression de TSAP6 augmente le niveau de TCTP dans ces exosomes. Nous avons constaté que TSAP6 joue un rôle dans la libération des exosomes.

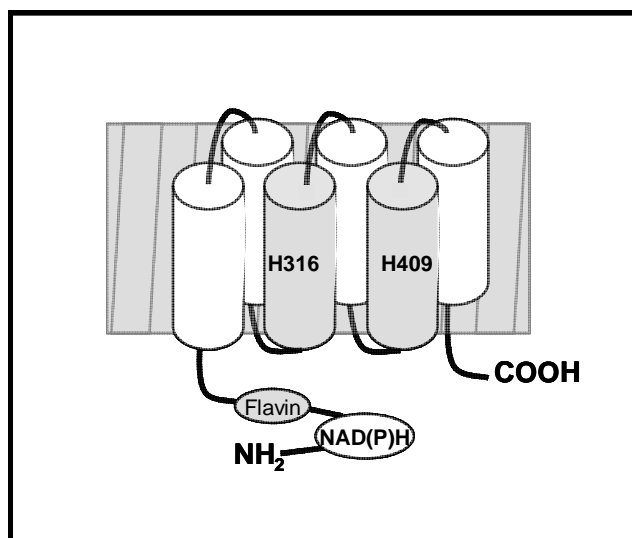
TSAP6 (Tumor Suppressor Activated Pathway 6), est une protéine d'environ 55 kDa dont le transcript a été initialement trouvé surexprimé dans les cellules murines LTR6 apoptotiques (Amson et al., 1996, Yonish-Rouach et al., 1991). TSAP6 est très fortement activé au cours de la suppression et la réversion tumorale, c'est pour cela qu'il a été nommé Tumor Suppressor Activated Pathway clone 6, en opposition avec les autres transcrits qui sont inhibé au niveau de leur expression (Amson et al., 1996, Roperch et al., 1998). Quand p53 est artificiellement activé, l' ARNm tsap6 devient beaucoup plus abondant, montrant ainsi que l' expression de TSAP6 est induite par p53 (Passer et al., 2003). Une analyse de séquences de la région promotrice de TSAP6 a révélé la présence d'une séquence correspondant au consensus de liaison de p53 à l'ADN (El-diery et al., 1992). Cette séquence est activable par p53 (Passer et al., 2003). L'ARNm de TSAP6 a été détecté dans différents tissus humains, murins et de rat (Passer et al., 2003; Porkka et al., 2003). TSAP6 est supposée avoir un rôle important dans la cellule car sa séquence a été particulièrement conservée tout au long de l'évolution des mammifères par rapport à la moyenne des autres gènes du génome (Castillo-Davis et al., 2004).

TSAP6 (également nommé STEAP3) est l'homologue humain de la protéine pHyde du rat (Rinaldy et al., 2000, Steiner et al., 2000) et appartient à une famille de protéines à 6 domaines transmembranaires dont font partie STEAP1 (Six Transmembrane Epithelial Antigene of Prostate), STAMP1 = STEAP2 et TIARP (TNFa Induced Adipose Related Protein) (Hubert et al., 1999, Moldes et al., 2001, Kormaz et al., 2002). Bien que ces protéines partagent des homologies de séquence dans leurs domaines transmembranaires (aussi nommés ACRATA) (Sanchez-Pulido et al., 2004), aucune fonction commune n'a été décrite pour le moment. TSAP6 et les autres membres de cette famille présentent un site de liaison putatif à

l'hème et une Rossmann fold domaine qui pourrait être responsable d'une fonction potentielle de NADH / NADPH oxydase (Fig 11). La caractérisation de l'expression de TSAP6 dans les tumeurs, établi une corrélation avec le grade de la tumeur: il est moins exprimé dans les tumeurs peu différenciées et non traitées par rapport à celles bien différenciées (Porkka et al., 2003). En revanche, les autres membres de la famille TSAP6, STEAP1 et STAMP1, sont bien connues pour être surexprimées dans le cancer de la prostate (Hubert et al., 1999; Yang et al., 2001; Ernst et al., 2002; Korkmaz et al., 2002; Porkka et al., 2002; Vanaja et al., 2003; Zisman et al., 2003; Edwards et al., 2005). STEAP1 est également surexprimé dans l'estomac (Kim et al, 2003) et dans le cancer du sein métastatique (Zucchi et al, 2004) et surtout au cours de la micrométastase (Kakiuchi et al, 2003). Il est notable que STEAP1 est définie comme une nouvelle cible pour l'immunothérapie pour soigner le cancer de la prostate. Plusieurs équipes ont montré l'efficacité d'un traitement par un anticorps monoclonal reconnaissant STEAP1 sur des xenogreffes de tumeurs de prostate dans des souris. (Gancia et al., 2007, Challita et al., 2007, Alves et al., 2006). Il est même décrit que ce traitement se fait par induction d'une réponse immune spécifique par les cellules T CD8+ (Machlenkin et al., 2005). De son côté, STAMP2 (TIARP) est identifié comme un facteur important reliant l'inflammation et le métabolisme. (Wellen et al., 2007, Waki et al., 2007).

**Fig 11.Représentation schématique de la structure de TSAP6.**

**Les 6 domaines transmembranaires sont nommés ACRATA pour « Apoptosis, Cancer and Redox Associated Transmembrane domain » (Sanchez et al., 2004). Les domaines 3 et 5 présentent un domaine du type hémopexin porté par les histidines 316 et 409, qui pourraient permettre la fixation d'une molécule d'hème. L'extrémité Nterminal porte un domaine du type Rossmann fold homologue à celui trouvé dans les NADH/NADPH oxydo-réductases.**



Outre sa surexpression comme conséquence d'un processus apoptotique, TSAP6 a été démontré capable d'induire l'apoptose dans différents types cellulaires (Rinaldy et al., 2000; Steiner et al., 2000, Zhang et al., 2001). En outre, un siRNA ciblant le gène *tsap6* peut inverser cette effet pro-apoptotique (Passer et al., 2003). L'apoptose induit par TSAP6 a été décrit passant par l'activation de la caspase-3 (Zhang et al., 2001). L'implication de TSAP6 dans la voie apoptotique a également été liée à son interaction avec la protéine pro-apoptotique Nix (Passer et al., 2003).

TSAP6 est également impliquée dans la progression du cycle cellulaire, sa surexpression bloque les cellules en G2/M en association avec la protéine kinase Myt1 qui est un régulateur négatif de la transition G2/M (Passer et al., 2003). TSAP6 inhibe aussi la croissance des cellules tumorales de la prostate et du sein (Steiner et al., 2000, Zhang et al., 2001). Chose intéressante, la surexpression de TSAP6 est capable d'inhiber la croissance des cellules p53 positif mais pas celle des cellules sans p53 (Steiner et al., 2000), ce qui suggère d'autres liens entre les protéines p53 et TSAP6.

La suppression génomique responsable du phénotype de la souris nm1054 a été cartographié au locus de TSAP6 (Ohgami et al., 2005; Ohgami et al., 2005). Les expériences de suppression et de complémentation ont confirmé que la suppression de TSAP6 induit une anémie microcytaire. La fonction ferric-reductase de TSAP6 a été montré et il est proposé d'être responsable du désordre au niveau du cycle du récepteur de la transferrine et de l'anémie dans les souris nm1054 TSAP6<sup>-/-</sup> (Ohgami et al., 2005). Récemment, Levine et ses collaborateurs (Yu et al., 2006) ont montré de manière qualitative dans des lignées cellulaires cancéreuses, la dépendance de la sécrétion d'exosomes à p53 et l'implication de TSAP6 dans cette régulation par des méthodes de surexpression par transfection transitoire de plasmide codant pour TSAP6.

Mon travail de thèse a consisté en outre à caractériser la fonction des protéines TSAP6 *in vivo*, pour cela nous avons développé des outils pour générer et étudier des souris ko TSAP6. Les animaux obtenus présentent un phénotype anémique mycrocytaire et un défaut dans la libération du recepteur à la transferrine conduisant à un défaut de maturation des globules rouges, et nous démontrons que la production d'exosomes est compromise dans les

cellules TSAP6 ko. Pour faciliter la compréhension des résultats de l'étude de ces souris, une présentation de quelques notions d'hématologie et de sécrétion sera exposée.

## **E - II - Quelques notions d'hématologie**

### **E - II - 1 . L'érythropoïèse**

L'érythropoïèse est l'ensemble des mécanismes qui concourent à la formation des érythrocytes (hématies, globules rouges). Chez l'humain, elle s'effectue à partir de la naissance dans la moelle osseuse, chez l'adulte, l'érythropoïèse a lieu essentiellement dans les cavités médullaires des os plats (sternum, os iliaques, côtes..). Chez la souris, elle se produit aussi dans la rate. Elle a pour finalité d'assurer le maintien d'un stock d'hémoglobine constant en produisant en continue un nombre de globules rouges équivalent au nombre d'hématies phagocytées lors de l'hémolyse physiologique. En cas de besoin, les capacités d'adaptation de l'érythropoïèse sont importantes. En cas de pertes, la production s'accroît; en cas de transfusions, la production diminue. Les hématies formées sont extrêmement homogènes en taille, couleur et forme.

Les précurseurs érythroïdes se nomment proérythroblastes et érythroblastes. Les érythroblastes sont produits au niveau de la moelle osseuse. Une érythropoïèse hépatique et splénique existe pendant la vie foetale. La maturation des érythroblastes jusqu'au globule rouge dure 6 jours environ. Les cellules de la lignée érythroblastique au niveau médullaire sont (Fig 12) :

Les proérythroblastes : grande taille, chromatine à grains serrés, cytoplasme très basophile.

Les érythroblastes basophiles : taille moyenne, noyau sans nucléole, chromatine mottée, cytoplasme basophile.

Les érythroblastes polychromatophiles : noyau de taille réduite, cytoplasme bleu pâle.

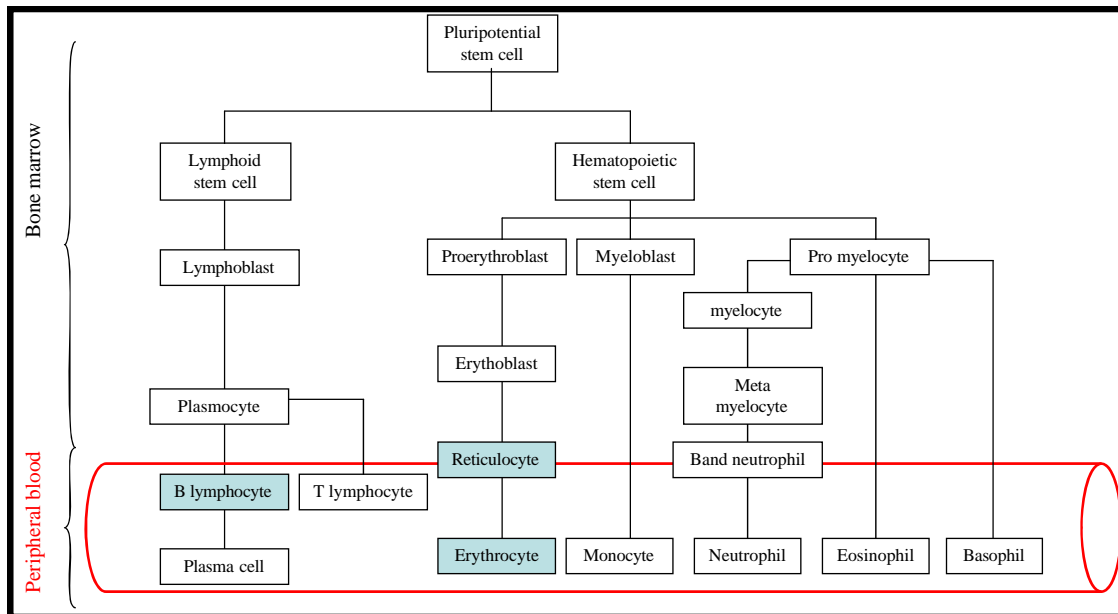
Les érythroblastes acidophiles : noyau excentré et très dense.

L'expulsion du noyau de l'érythroblaste acidophile donne une cellule anucléée nommée réticulocyte (coloration au bleu de Crésyl, précipite les ARNs) qui peut produire des petites quantités d'hémoglobine. La durée de vie des réticulocytes est de 48 à 72h. Puis il y a la

transformation en globules rouges dont la durée de vie est de 110 jours (chez les mammifères).

**Fig 12. Diagramme représentant l'hématopoïèse.**

**Qui est l'ensemble des phénomènes, l'érythropoïèse inclus, concourant à la production et au remplacement continu et régulé des cellules sanguines.**



### E - II - 2 . L'anémie

L'anémie est un nom générique qui regroupe de nombreuses maladies associées à un manque de globules rouges ou d'hémoglobine, et qui résulte à un transport inadéquat de l'oxygène par le sang. La baisse du taux d'hémoglobine dans le sang se traduit le plus souvent par une baisse du nombre des globules rouges. L'hémoglobine est une protéine synthétisée par les érythroblastes. Elle est composée d'une partie protéique : la globine, et de l'hème contenant le fer permettant le transport de l'oxygène et du gaz carbonique. Le fer est indispensable à la synthèse de l'hémoglobine (Hb)

Lorsque le nombre d'hématies est augmenté par rapport à la normale, on parle d'érythrocytose ou de polycythémie. Suivant les différentes situations pathologiques, la taille des globules rouges peut varier et on parle de microcytose ou de macrocytose. Lorsque la charge en hémoglobine est inférieure à la normale, on parle d'hypochromie. Lorsqu'il y a surcharge en hémoglobine, on parle d'hyperchromie. On dit des érythrocytes qu'ils sont normochromes lorsque la charge en Hb est normale.

Pour que le taux d'hémoglobine reste normal, il doit y avoir équilibre entre la quantité de globules rouges produits dans la moelle osseuse et celle détruite en particulier dans la rate. Sinon, le taux d'hémoglobine baisse et l'anémie s'installe. L'anémie se définit par la baisse du taux d'hémoglobine au-dessous de la limite inférieure de la normalité. La baisse du taux de globules rouges et celle de l'hématocrite généralement constatées en cas d'anémie ne peuvent être considérées comme des critères de diagnostic valables. En effet, ces deux paramètres ne varient pas forcément de façon parallèle : en cas de microcytose le nombre de globules rouges peut être normal voire augmenté, alors que l'hématocrite et l'hémoglobine sont abaissés.

L'anémie microcytaire peut être normochrome ou hypochrome ; La microcytose caractérise des hématies de volume inférieur à la normale et s'observe surtout dans les anémies ferriprives.

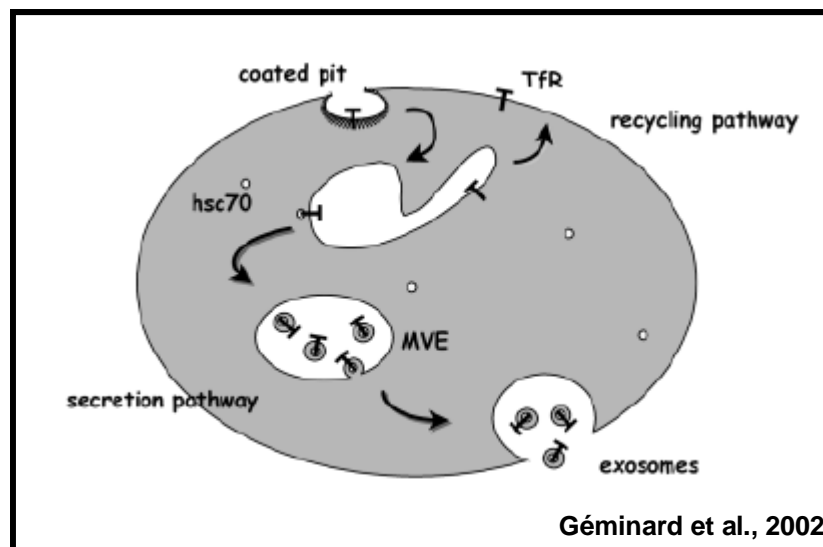
### **E - II - 3 . Le cycle du récepteur à la transferrine au cours de la maturation des réticulocytes**

Au cours de la différenciation des cellules érythroïdes, un vaste programme de maturation a lieu, conduisant à la dégradation ou l'élimination des organites, y compris le noyau, les mitochondries, les ribosomes, les lysosomes, réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. (Géminard et al., 2002). Au cours de la maturation, il y a élimination partielle ou totale de protéines spécifiques de la surface cellulaire. Au cours de ce processus, la surface membranaire et le volume cellulaire sont considérablement réduits, contribuant à l'augmentation de la densité cellulaire. Il a été montré que les réticulocytes de rat perdent approximativement 1/3 de leurs lipides membranaires durant la maturation *in vivo* (Shattil and Cooper 1972). Cette diminution de la surface est attribuée au remodelage de la membrane plasmique. Une des conséquences de ce remodelage est la perte de la capacité d'endocytose des globules rouges matures. En effet, les érythrocytes matures ne sont plus capables de capturer des molécules du milieu extracellulaire par endocytose lié à un récepteur. Plusieurs récepteurs tels que le récepteur à la transferrine (TfR), le récepteur  $\beta$ 2-adrenergique et le récepteur à l'insuline sont perdus durant l'étape finale du processus de différenciation. Différents processus tels que l'autophagie et/ou la perte de membrane ont été rapportées pour décrire ce remodelage (Seelig et al., 1972, Simpson and Kling 1968). Plus récemment, la sécrétion de vésicules, appelé exosomes, a été démontrée comme étant le processus majeur impliqué dans le control de la fonction membranaire au cours de la différenciation des

hématies. Les bases moléculaires de ce processus a été beaucoup étudié en utilisant la TfR car cette protéine, qui est abondamment présente à la surface des réticulocytes (environ 100 000 copies), est complètement éliminée de la cellule par la sécrétion d'exosomes (Fig 13).

**Fig 13. Voie du TfR au cours de la maturation des réticulocytes.**

TfR (T) est internalisé à la surface de la cellule et puis, soit il est recyclé à la membrane plasmique, on parle de la voie de recyclage, soit il s'accumule dans des petites vésicules contenues dans les endosomes multivésiculaires (MVE). Le récepteur est expulsé dans le milieu extracellulaire via les exosomes quand les MVEs fusionnent avec la membrane plasmique, on parle de la voie de sécrétion.



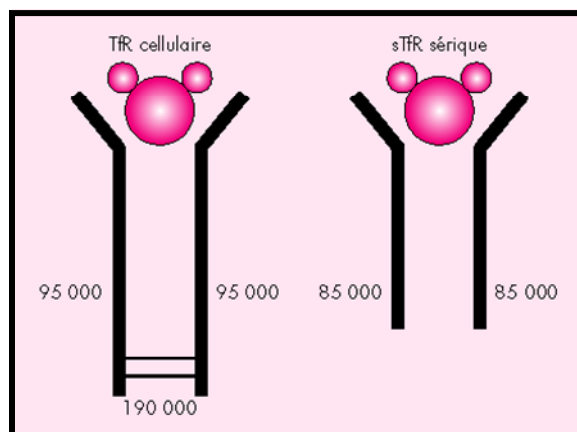
Le transport du fer dans le plasma est assuré par la transferrine qui fournit le fer aux cellules grâce à son interaction avec un récepteur membranaire spécifique (TfR) (Fig 15). Le récepteur de la transferrine est une glycoprotéine de 760 acides aminés. Le récepteur fonctionnel est composé de deux monomères, liés par deux ponts disulfures formant ensemble une molécule de 190 000 daltons (Fig 14). Toutes les cellules, excepté les globules rouges matures, ont un TfR à leur surface, mais le plus grand nombre se trouve sur les cellules érythroïdes, le placenta et le foie. Chez l'adulte normal, environ 80 % des TfR sont à la surface des cellules érythroïdes dans la moelle. La densité du récepteur sur les cellules en prolifération est liée à l'accessibilité du fer. Ainsi, un déficit en fer induit une augmentation rapide de la synthèse de TfR et de la densité des TfR à la surface de la cellule alors qu'un excès de fer réduit le nombre des TfR. Ainsi, la masse totale des TfR dépend à la fois du nombre de cellules érythroïdes dans la moelle et de la densité des TfR par cellule.



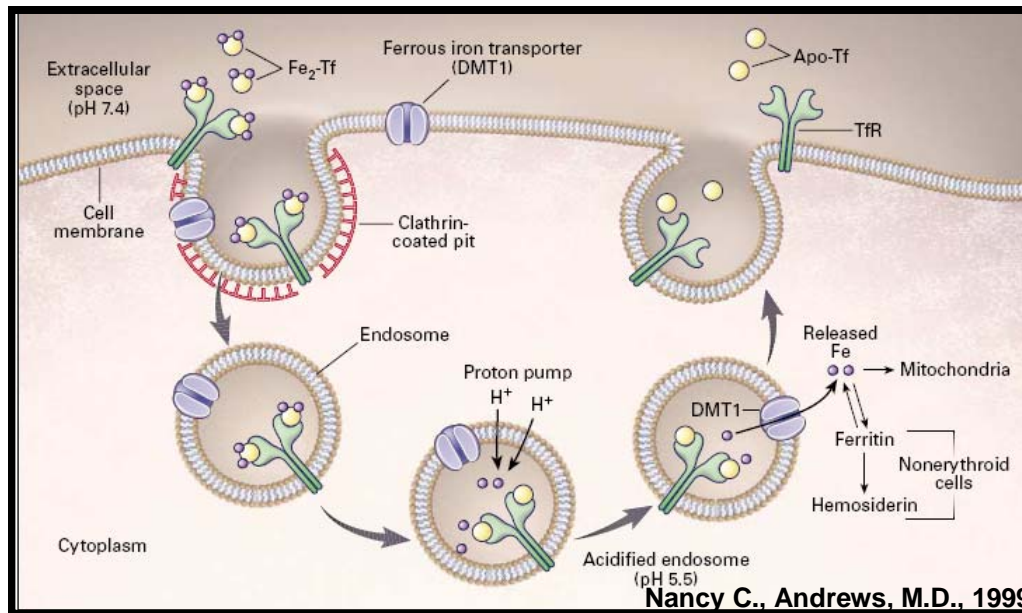
Une forme soluble et circulante du TfR (sTfR) a été observée chez l'homme aussi bien que chez l'animal. Le sTfR du sérum est un monomère tronqué du TfR cellulaire ayant perdu ses 100 premiers acides aminés. Il circule sous forme d'un complexe associant la transferrine à ce récepteur soluble (Shih et al., 1990). Il est possible que deux monomères de cette forme soluble du récepteur (85 kDa) lient une molécule de transferrine (80 kDa) pour donner une molécule d'un poids moléculaire total d'environ 250 kDa (Fig 14). Une très petite quantité du récepteur circule sous forme d'un dimère intact présent dans les exosomes, proportion variant selon la pathologie (Johnstone et al., 1992). La forme soluble du récepteur de la transferrine est produite par protéolyse grâce à une sérine protéase membranaire qui existe surtout à la surface des exosomes dans les corps multivésiculaires, avant l'exocytose (Baynes et al., 1994). La quantité de sTfR mesurée dans le sérum est proportionnelle à la quantité de TfR cellulaire, principalement des érythroblastes et dans une moindre mesure des réticulocytes.

**Fig 14. Représentation schématique du TfR.**

La partie gauche représente le TfR cellulaire, composé de deux monomères (PM 95 000 chacun) reliés par deux ponts disulfures, et capable de lier une molécule de transferrine (cercle gris, avec deux atomes de fer). La partie droite représente sTfR, monomère tronqué du TfR cellulaire (PM 85 000), circulant sous la forme d'un complexe de transferrine et de deux monomères tronqués



**Fig 15. Le cycle de la transferrine.**



Le fer chargé sur la transferrine (Tf-Fe) se lie à des récepteurs de la transferrine (TfR) à la surface des précurseurs érythroïdes. Ces complexes se localisent dans des creux membranaires revêtus de clathrine, qui par invagination forment des endosomes spécialisées. Une pompe à protons diminue le pH dans ces endosomes, ce qui conduit à des changements dans la conformation des protéines qui entraînent la libération du fer de la transferrine. Le transporteur de fer, DMT1, fait passer le fer à travers la membrane endosomale, pour pénétrer dans le cytoplasme. Pendant ce temps, la transferrine (Apo-Tf) et les récepteurs de la transferrine sont recyclés à la surface cellulaire, où chacun peut être utilisé pour de nouveaux cycles de liaison au fer et d'absorption du fer. Dans les cellules érythroïdes, la plupart du fer s'installe dans la mitochondrie, où il est incorporé dans la protoporphyrine pour produire de l'hème. Dans les cellules non-érythroïdes, le fer est stocké dans la ferritine et l'hemosiderine.

### E - III - les voies de sécrétions

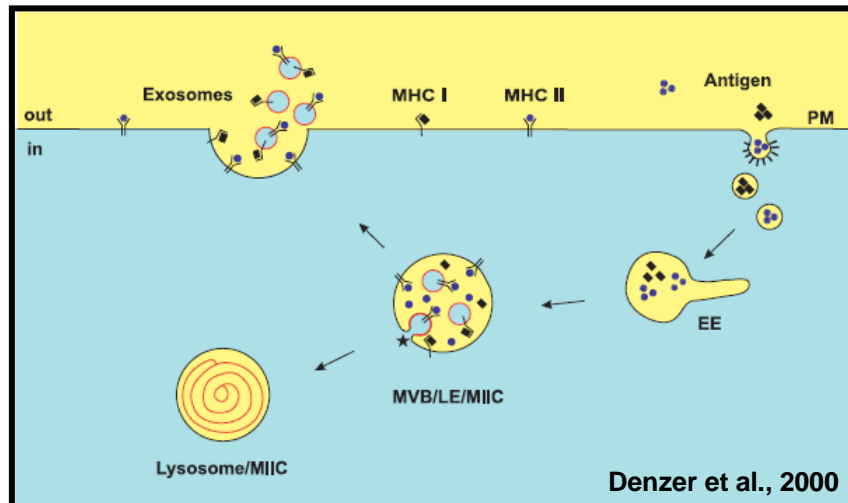
#### E - III - 1 . Les exosomes

##### E-III-1-1. La biogenèse des exosomes

Les voies de sécrétions dites non-classiques sont insensibles à l'action de la brefeldine A contrairement au système Réticulum/Golgi. Le terme "exosome" a été d'abord utilisé en 1987 pour décrire des vésicules libérées pendant la culture *in vitro* de réticulocytes de mouton dans les études de maturation de réticulocytes par Johnstone (Johnson et al., 1987). Ils suggèrent que la sécrétion d'exosomes soit un mécanisme de régulation des fonctions membranaires en sortant des protéines de membrane inutiles aux réticulocytes pendant leur maturation.

Actuellement, l'exosome est défini comme de petites vésicules de membrane, formées par bourgeonnement vers l'intérieur de membrane endosomal, qui génèrent des corps multivésiculaires (MVBs) et sont libérés comme exosomes à la suite de la fusion des MVBs avec la membrane plasmique (Fig 16).

**Fig 16.Représentation schématique de la formation des MVBs et des exosomes dans la présentation antigénique.**



Les corps multivésiculaires (MVBs) sont des compartiments endosomal tardifs (late endosome : LE) situés dans la voie d'endocytose entre les endosomes précoces (early endosome : EE) et les lysosomes. Les vésicules internes des MVBs sont générées par le bourgeonnement de la membrane vers l'intérieur des MVBs. Les antigènes exogènes sont intégrés dans le EEs des cellules présentatrices d'antigène (CPA) par endocytose lié au récepteur présenté dans la figure, par phagocytose ou par macropinocytose. L'acidification du compartiment active des protéases, qui lyse les antigènes en peptides (des rectangles noirs et points bleus). Les LEs et des lysosomes des CPA contiennent la majorité des molécules intracellulaires du CMH de classe II et sont donc nommés compartiments enrichis CMH de classe II (MIICs). Les molécules du CMH de classe II sont disponibles sur la membrane limitant des MIICs (noir) et sur l'intérieur des membranes (rouge), ce dernier étant soit sous forme de vésicules dans les LEs soit sous forme de feuillet dans les lysosomes. Les MIICs également contiennent des molécules du CMH de classe I, qui sont principalement situées sur les vésicules. Les MIICs sont un site majeur pour le chargement de peptides des molécules du CMH de classe II, le recyclage et le chargement des molécules du CMH de classe I avec l'antigène exogène se déroulent dans les voies d'endocytose. Une façon pour le peptide-CMH de parvenir à la membrane plasmique est par la fusion des multivésiculaires MIICs avec la membrane plasmique. De cette façon, les molécules du CMH sont non seulement incorporées dans la membrane plasmique (PM), mais aussi libérées dans l'espace extracellulaire sur des

**vésicules, qui sont appelées exosomes. Les exosomes chargés de peptides contiennent des molécules du CMH dans une orientation qui leur permet de stimuler les lymphocytes T.**

Les exosomes sont généralement purifiés à partir des surnageants de cultures cellulaires ou des effusions de tumeurs malignes humaines (Bard et al., 2004, Navabi et al., 2005) et sont identifiés selon des caractéristiques physiques et morphologiques typiques. Les exosomes ont un diamètre d'environ 50nm et flottent sur des gradients de saccharose et leur gamme de densité est 1.13-1.19 g/ml. Une variété de cellules sécrètent des exosomes, y compris les cellules épithéliales (Lin et al., 2005, Van Niel et al., 2001), des cellules mastocytaires (Raposo et al., 1997), des plaquettes sanguines (Heijnen et al., 1999), des cellules présentatrices d'antigènes (APCs) (Zitvogel et al., 1998) ou des cellules de tumeur (Wolfers et al., 2001).

Des analyses par western blot et par cytométrie de flux ont identifié beaucoup de protéines cellulaires dans les exosomes issus de sources cellulaires diverses (Clayton et al., 2001). De nouvelles protéines sont caractérisées à partir d'exosomes de cellules dendritiques (CDs) (Théry et al., 1999), des tumeurs (Bard et al., 2004, Hegmans et al., 2004), des cellules épithéliales (Van Niel et al., 2001, Van Niel et al., 2003) et des cellules B (Wubbolts et al., 2003). Les résultats montrent clairement que les exosomes ne sont pas seulement composés de membrane cellulaire, mais sont aussi des nano-organelles avec une composition spécifique (Théry et al., 2002). Trois groupes de protéines ubiquitaires et spécifiques du type cellulaire sont enrichis dans les exosomes dérivés des CDs et de tumeurs : des molécules de présentation d'antigène, des protéines de transduction de signal et des protéines du cytosquelette. En plus de ces trois groupes de protéines, d'autres molécules liées à la présentation d'antigène sont aussi détectées (Wolfers et al., 2001, Théry et al., 1999, Andre et al., 2004). Les exosomes ont également une composition lipidique unique. Les données sur les exosomes provenant de cellules mastocytaires et dendritiques montrent que la membrane lipidique de l'exosome présente une couche lipidique serrée et se caractérise par une distribution non asymétrique des phosphatidyléthanolamine (PE) et un rapide va et vient (flip-flop) entre les deux couches de membrane (Wubbolts et al., 2003, Laulagnier et al., 2004, Mobius et al., 2003). Les exosomes contiennent en quantité abondante du cholestérol qui prévaut dans les vésicules de leurs précurseurs, ainsi que d'autres compositions de lipides, comme la sphingomyéline, et GM3 (Wubbolts et al., 2003, Mobius et al., 2003). Compte tenu

de la composition caractéristique en protéines et en lipides, les exosomes sont distinctes des autres types de vésicules cellulaires.

### **E-III-1-2. Leurs fonctions biologiques**

Les fonctions biologiques des exosomes dépendent largement des types de cellules à partir desquels elles sont obtenues. Leurs fonctions putatives peuvent être divisées en deux grandes catégories, l'une est d'éliminer les protéines obsolètes au cours de la maturation des cellules (Johnstone et al., 1987, Johnstone et al., 1990, Johnstone et al., 1991) et l'autre est d'arbitrer la communication intercellulaire par transfert de matériel entre les cellules (Fevrier et al., 2004, Mack et al., 2000, Skokos et al., 2003). En fait, les témoignages recueillis auprès de nombreux groupes de recherche ont montré que les exosomes jouent un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire, y compris la stimulation immunitaire et l'immunosuppression. Les exosomes dérivés de lymphocyte B présentent en abondance des molécules CMH de classe I et II, des molécules de co-stimulation B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86), la molécule d'adhésion ICAM-1 (CD54), aussi le marqueur de cellules B CD20, et ont la capacité d'activer des cellules T CD4 + de manière restreinte au système de présentation d'antigène par la molécule CMH de classe II (Clayton et al., 2001, Raposo et al., 1996). Les mastocytes peuvent contribuer à la régulation des réponses immunitaires spécifiques au moyen des exosomes qui ont une activité mitogène *in vitro* et *in vivo* sur les lymphocytes B et T (Skokos et al., 2001). Les exosomes sécrétés par les cellules tumorales et les CD ont été plus intensivement étudiés en raison de leur puissante activité immuno-stimulatrice. Les exosomes dérivés de CD exprimant le CMH de classe I et CD86 ont été utilisées pour générer la lyse *in vitro* de tumeurs par des cellules T CD8 +. Les exosomes issus des CD ont aussi la capacité de générer de puissantes réponses immunitaires anti-tumorale *in vivo* (Zitvogel et al., 1998). Les exosomes dérivés de tumeurs, qui sont enrichis en antigènes tumoraux, sont une nouvelle source d'antigènes de rejets tumoraux pour l'activation des lymphocytes T cytotoxiques (Wolfers et al., 2001). Toutefois, les exosomes de tumeurs ont besoin des cellules accessoires pour générer des réponses efficaces *in vitro* des lymphocytes T. Ces cellules accessoires, comme les CD, sont supposées générer un microenvironnement approprié pour l'immuno-modulation par ces exosomes (Thery et al., 2002, Schneider et al., 1999). En présence de cellules dendritiques matures, les exosomes dérivés de tumeurs pourraient susciter une réponse anti-tumorale efficace des cellules T (Andre et al., 2002).

S'appuyant sur leurs effets anti-tumoraux *in vitro* et *in vivo*, plusieurs essais cliniques de phase I ont été terminés avec succès (Morse et al., 2005, Chaput et al., 2004, Escudier et al., 2005, Denzer et al., 2000).

### **E - III - 2 . La voie de sécrétion dite classique**

Voir livre : Lewin B, Gene VIII, 2004 ; site web : <http://www.sciencebio.com/FacBio>

#### **E-III-2-1. Quelques définitions :**

Lors de l'exocytose, la cellule sécrète des macromolécules par fusion de vésicules de sécrétion avec la membrane plasmique. Au cours de ce processus, le cytosquelette transporte vers la membrane plasmique une vésicule de transport originaire du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi. Toutes les cellules sécrétrices exportent leurs produits de sécrétion au moyen de l'exocytose.

Au cours de l'endocytose, la cellule laisse entrer des macromolécules par invagination d'une partie de la membrane plasmique. Une vésicule se forme et se détache de la membrane en emprisonnant les macromolécules provenant de l'extérieur de la cellule. Il existe deux formes d'endocytose ; la pinocytose : la cellule absorbe des gouttelettes de liquide extracellulaire contenues dans de minuscules vésicules. La pinocytose ne constitue pas une forme de transport spécifique. Et l'endocytose par récepteur interposé: lorsqu'un ligand se lie à son récepteur, l'ensemble est internalisé dans la cellule par invagination de la membrane. Une couche de molécules de clathrine recouvre la partie intracellulaire. Le manteau de clathrine pince la membrane pour former une vésicule, qui migre vers les endosomes précoces.

La phagocytose, une forme extrême d'endocytose, est une des particularités des cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, cellules dendritiques). La cellule laisse entrer des particules au moyen de pseudopodes (prolongements cellulaires). Ces particules sont beaucoup plus grosses que les macromolécules destinées à l'endocytose. Par ailleurs, les pseudopodes émis autour de la particule phagocytée font intervenir de nombreux microfilaments d'actine, ce qui ne se produit pas lors de l'endocytose. Les pseudopodes enveloppent la particule dans une vacuole qui fusionne ensuite avec un lysosome rempli d'enzymes hydrolytiques qui digèrent la particule.

L'exocytose, l'endocytose et la phagocytose représentent des modes de transport actif ; qui nécessitent de l'ATP. L'endocytose et l'exocytose ont lieu de façon continue dans la plupart des cellules eucaryotes. Comme la quantité de membrane plasmique des cellules matures varie peu à long terme, on peut conclure que l'ajout de membrane consécutif à l'exocytose compense la perte résultant de l'endocytose

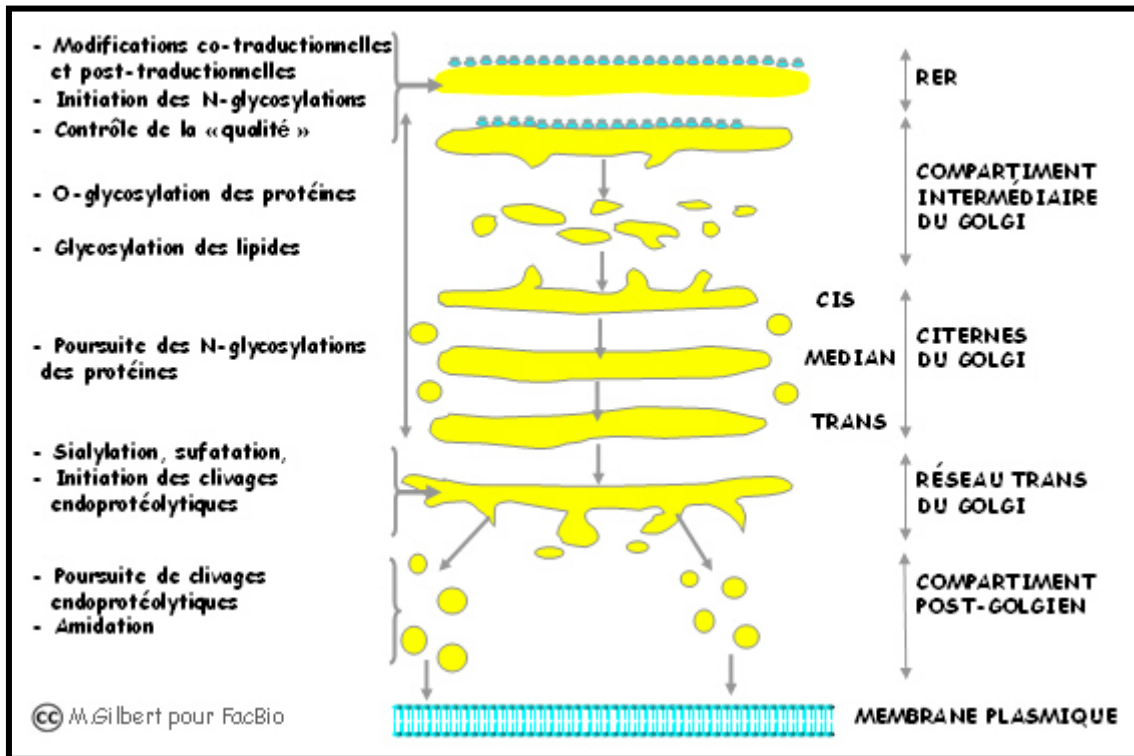
### **E-III-2-2. Le trafic intracellulaire des protéines**

Le compartiment post-golgien présente une grande diversité d'organisation selon la spécialisation fonctionnelle des cellules. Il est souvent le territoire d'expression de la différenciation cellulaire, c'est le cas des cellules glandulaires, des neurones et des cellules polarisées.

Les protéines qui résident dans le système réticuloendothélial ou qui sont sécrétées à partir de la membrane plasmique, entrent dans le réticulum endoplasmique (RE) par transfert co-translationnel directement à partir du ribosome. Ils sont transportés à travers l'appareil de Golgi dans la direction antérograde (vers l'avant). Les signaux spécifiques peuvent les pousser à être conservées dans le RE ou dans une citerne de l'appareil de Golgi, ou dirigés vers d'autres organites tels que les endosomes. Le chemin par défaut est d'être transporté vers la membrane plasmique. Le transport rétrograde (vers l'arrière) est moins bien caractérisé, mais des protéines qui résident dans le RE sont extraites de l'appareil de Golgi en vertu de signaux spécifiques. Différents types de vésicules sont responsables pour le transport de et vers différents systèmes membranaires. Les vésicules se distinguent par la nature de leurs manteaux de protéines. Les complexes protéiques COPI sont associés aux vésicules assurant le transport rétrograde. Les complexes COPII sont impliqués dans le transport antérograde.

Le rôle fondamental de l'appareil de Golgi est les modifications post-traductionnelles des protéines issues du réticulum (Fig 17). Deux types de modifications conditionnent l'activité biologique des protéines. La première est l'addition covalente de chaînes glycosylées (glycosylation), d'acides gras, de groupements phosphates, de groupements sulfates. Les coupures protéolytiques sont le deuxième type de modifications.

Fig 17. Modifications post-traductionnelles des protéines dans le Golgi



### E-III-2-3. Les mécanismes moléculaires

Dans la voie de sécrétion régulée des protéines, les protéines sont triées dans des vésicules recouvertes de molécule de clathrine issues de la face trans-Golgi. Certaines vésicules peuvent fusionner en de grandes granules de sécrétion. Les vésicules passent également vers les endosomes, qui contrôlent le trafic à la surface cellulaire. Les vésicules de sécrétion sont stimulées pour décharger leurs cargaisons à la membrane plasmique par des signaux extracellulaires.

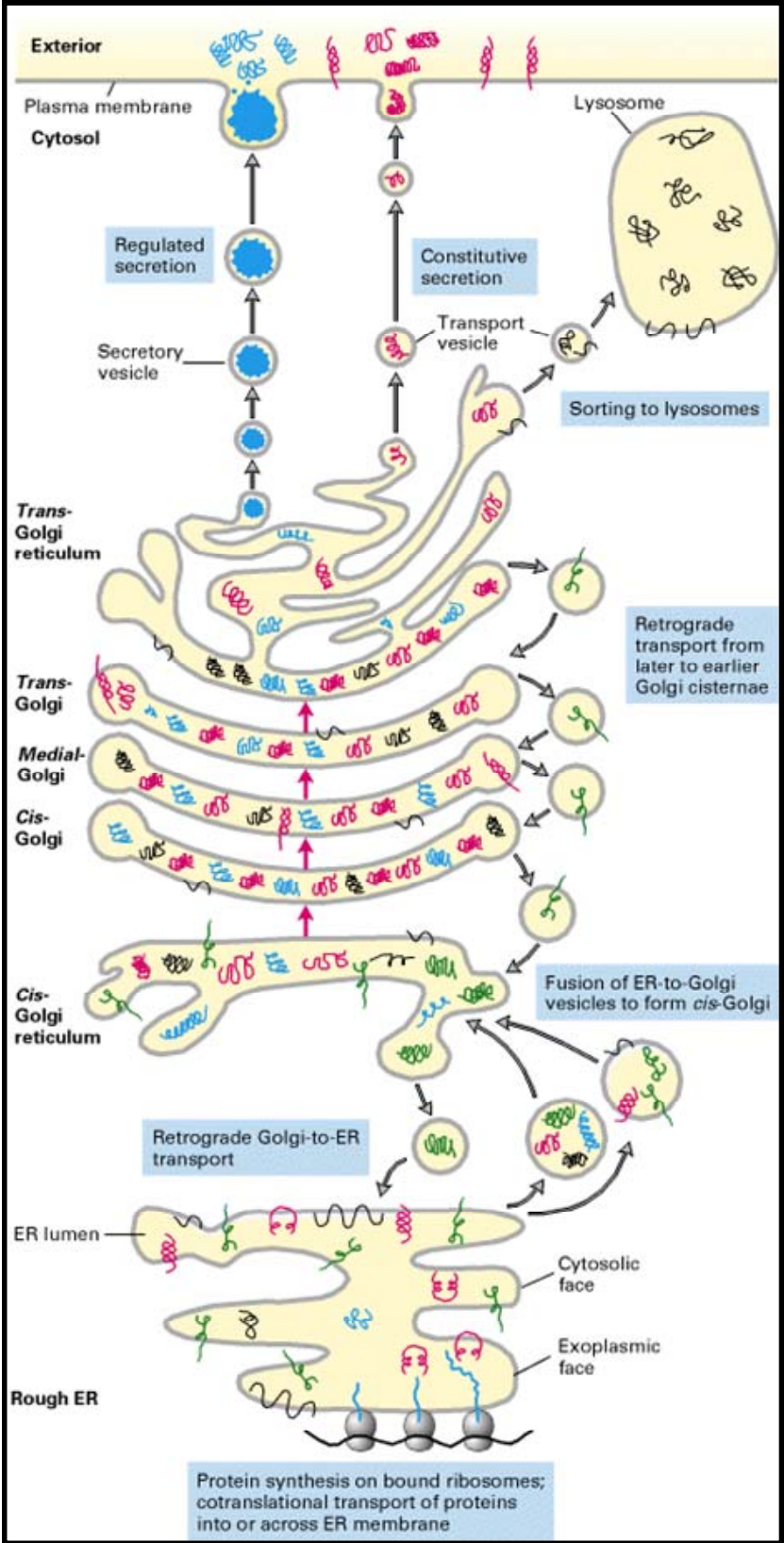
Le bourgeonnement et la fusion de tous les types de vésicules sont contrôlés par une petite protéine se liant au GTP. Il s'agit de la protéine ARF pour la clathrine et pour les vésicules COP-I, et de la protéine Sar1P pour les vésicules COP-II. Lorsqu'il y a activation par liaison au GTP, ARF/Sar1p s'insère dans la membrane et provoque l'assemblage du manteau protéique. Ceci conduit finalement au bourgeonnement membranaire. Quand ARF/Sar1p est inactivé par l'hydrolyse du GTP en GDP, il se retire de la membrane et il y a désassemblage de la couche de protéines.



Les vésicules doivent d'abord reconnaître les membranes cibles appropriées par une réaction de rapprochement dans laquelle un complexe d'attache reconnaît les protéines Rab sur la vésicule et rapproche la vésicule de la membrane cible. Les protéines Rabs sont des protéines G monomérique, elles sont attachées aux membranes par l'addition de groupes prényl ou palmityl à leur extrémité Cterminal. Il y a environ une trentaine de Rabs, distribués dans différents systèmes membranaires dans la cellule. Différents Rabs sont impliqués dans le transport du RE vers le Golgi, dans la voie régulé ou constitutive du Golgi vers la membrane plasmique et dans les étapes de transport entre les endosomes. La réaction de fusion est déclenchée quand une molécule v-SNARE (v pour vesicule) présente sur la vésicule s'apparie spécifiquement avec une molécule t-SNARE (t pour target) de la membrane cible, qui conduit à la fusion des membranes.

L'exocytose de la voie régulée est déclenchée par des signaux extracellulaires reconnus par des récepteurs de la membrane plasmique. La voie de signalisation qui est activée permet l'exocytose des hormones, neuropeptides et autres. L'exocytose de la voie constitutive est spontanée et les protéines sont transportées à la membrane par des vésicules de petite taille. A noter que les lipides membranaires seront aussi intégrés dans la membrane plasmique. L'ensemble de ces protéines et lipides fait que la membrane plasmique est très hétérogène avec des micro compartiments, qui sont le lieu d'interactions: lipides-lipides, protéines-protéines, lipides et protéines avec le cytosquelette.

Fig 18. Transport des protéines à travers le système Réticulum/Golgi



## RESULTATS

### F - TSAP6 régule la sécrétion d'exosomes induite par p53

#### F - I - Modèle murin TSAP6 knock out

Lespagnol Alexandra\*, Duflaut Dominique\* et al., **Exosome secretion, including the DNA-damage-induced p53 dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice.** Soumis à publication.

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

TSAP6 est un gène cible directe de la protéine p53. Nous montrons dans cet article que TSAP6 est une protéine glycosylée (Fig 19) et qu'elle peut s'oligomériser. Par la technique d'immunofluorescence avec un anticorps polyclonal spécifique produit par nos soins, nous montrons sur différents types cellulaires que TSAP6 est présent dans le réseau trans-Golgien, dans le compartiment de vésicules endosomales et au niveau de la membrane cytoplasmique (Fig 20).

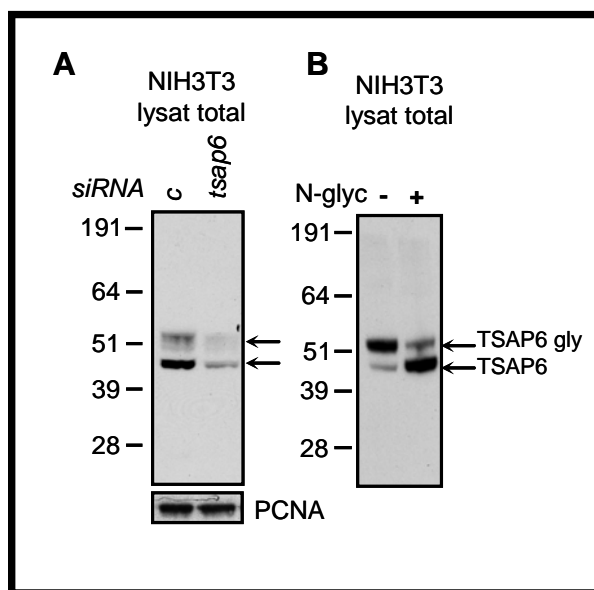


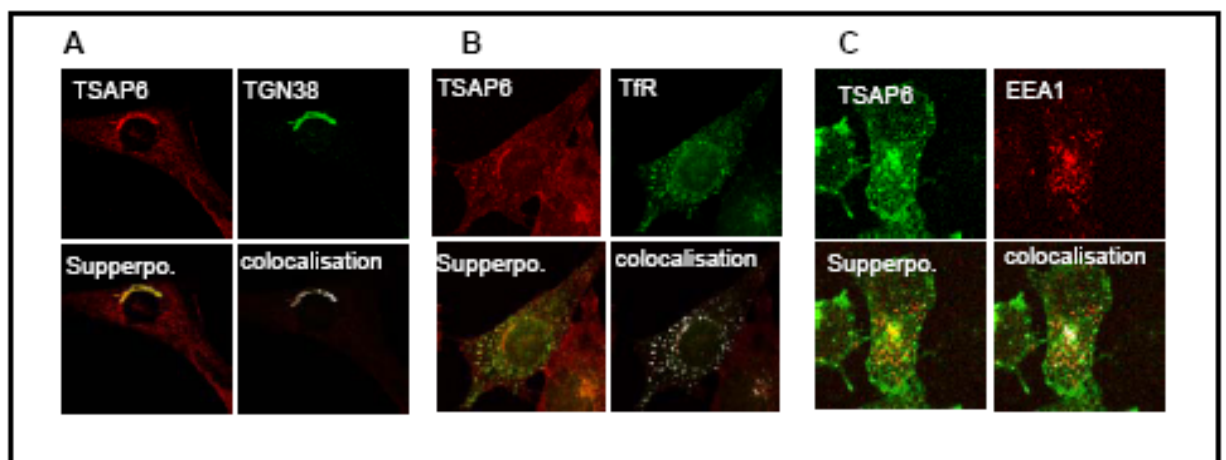
Fig 19. TSAP6 est une protéine glycosylée.

A. Deux bandes majoritaires de 46 et 52 kDa sont détectées dans le lysat protéique total des cellules murines NIH3T3, par un anticorps polyclonal reconnaissant spécifiquement l'extrémité N-terminale de la protéine murine TSAP6. L'utilisation d'un siRNA de TSAP6 montre que les bandes détectées sont spécifiques. L'immunoblot de la protéine PCNA permet de contrôler l'équilibre des dépôts. B. La bande de 52kDa résulte de la glycosylation de TSAP6, elle est

atténuée après traitement des cellules par la N-glycosidase. Le matériel et méthodes de ces expériences sont décrits dans l'article Lespagnol et al.

**Fig 20. Localisations intracellulaires de la protéine TSAP6 endogène**

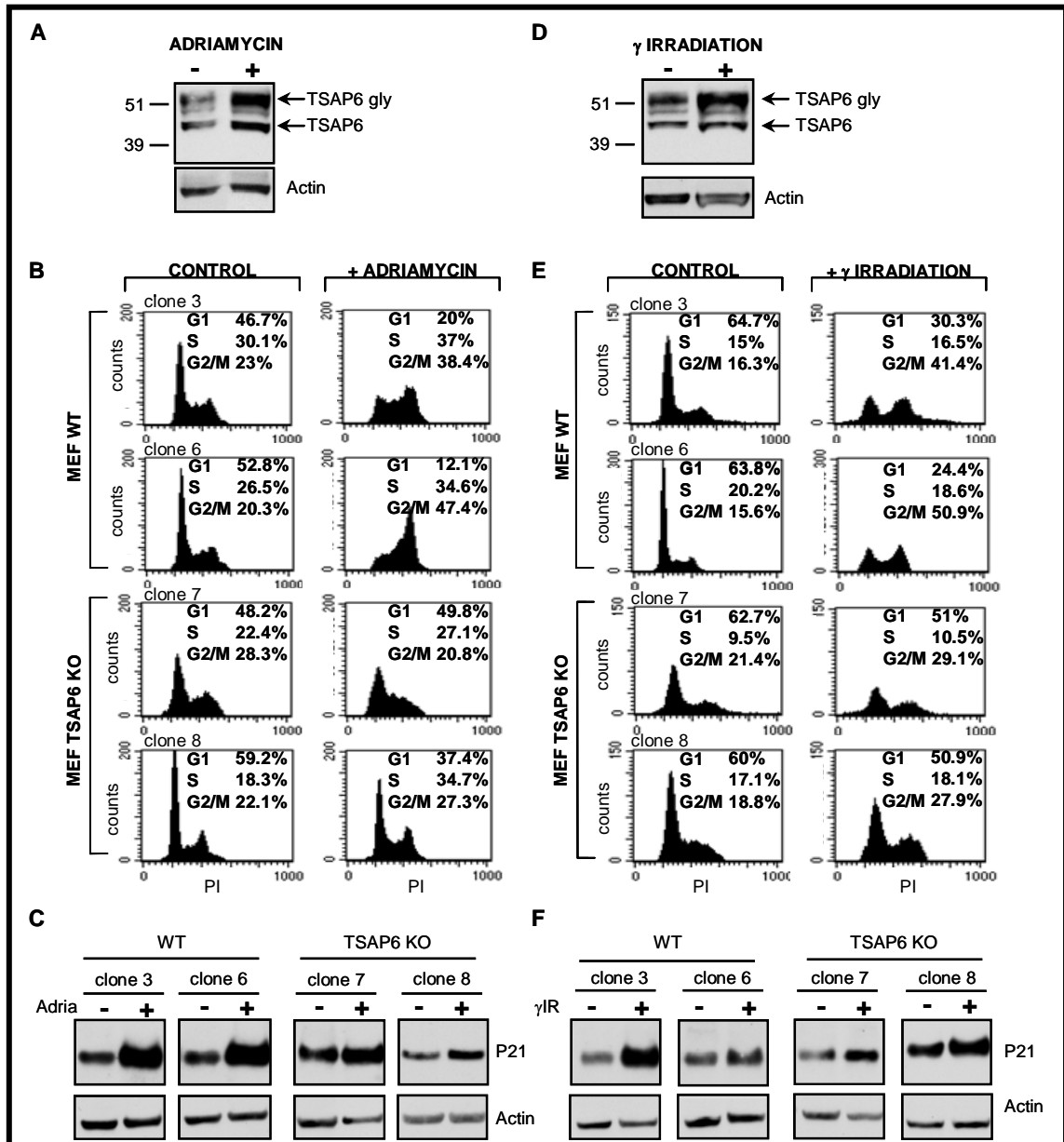
La détection par immunofluorescence montre TSAP6 endogène par l'anticorps anti-TSAP6 (en rouge pour A et B, en vert pour C), la localisation de TNG38 (A, en vert) et du Tf-R (B, en vert) et de EEA1 (C, en rouge). Les superpositions en jaune et les co-localisations en blanc montrent une codistribution partielle de TSAP6 avec le réseau trans-golgien, le Tf-R et les endosomes. Chaque image de microscopie confocale représente un même plan de la cellule. Le matériel et la méthode sont décrits dans l'article Lespagnol et al.



Pour étudier la fonction physiologique de TSAP6, nous avons généré des souris déficientes pour TSAP6. Le gène est localisé sur le chromosome 1 pour la souris et contient 6 exons codant. Les souris ko ont été générées par délétion des exons 2 et 3 par le système Cre/LoxP. Le principe de réalisation des modèles murins est présenté dans le chapitre matériels et méthodes. L'analyse de ces modèles a montré qu'ils souffrent d'anémie microcytaire (Fig 2, Lespagnol et al.); les globules rouges sont plus petites et sont appauvris en hémoglobine et d'une splénomégalie, leurs rates sont plus grosses (Fig 1, Lespagnol et al.). Grâce à ces modèles, nous confirmons l'engagement de TSAP6 dans le cycle cellulaire (Fig 21) et l'apoptose (Fig 4, Lespagnol et al.). Par analyse du cycle cellulaire en cytométrie de flux, des cellules MEFs TSAP6 ko, survivant à des agents apoptotique comme  $\gamma$ -irradiation ( $\gamma$ -IR) et l'adriamycine, ne présentent pas de blocage dans leur transition G2/M contrairement aux cellules MEFs sauvages (Fig 21). Les rates issues de souris TSAP6 nul  $\gamma$ -IR, présentent

une densité moindre de cellules apoptotiques au niveau de leur pulpe blanche, lieu de lignage des lymphocyte B et T (Fig 4 a, Lespagnol et al.).

Ces souris présentent aussi un défaut au niveau de la maturation des réticulocytes et sont déficientes pour la régulation du récepteur à la transferrine (TfR) par un processus connu pour être dépendant de la sécrétion exosomale. Les réticulocytes et les érythrocytes prélevés sur les animaux TSAP6 nul présentent plus de TfR à leur surface, même après trois jours de différenciation *in vitro* (Fig 3, Lespagnol et al.).



**Fig 21.** Réduction du blocage de la phase G2/M du cycle dans les MEFs TSAP6 knock-out.

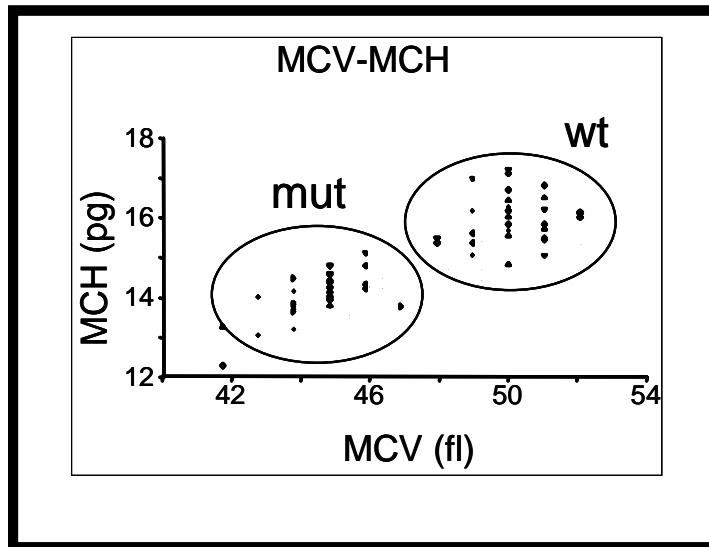
**A, D:** L'induction de TSAP6 est contrôlée dans les MEFs sauvages. Les cellules sont traitées avec 2  $\mu$ M d'adriamycine ou  $\gamma$ -irradiated à 10 Gy, puis sont récoltées pour produire un lysat de

**protéines totales et immunoblottées pour TSAP6 pour contrôler son induction par p53. B, E: le cycle cellulaire des MEFs sauvages et TSAP6 ko est mesuré par cytométrie de flux, après 16h d'incubation avec l'adramycine ou 24h après irradiation. C, F: L'induction de P21 est vérifiée dans les différents clones traités pour témoigner de l'activation de p53. L'actine est utilisé pour contrôler l'homogénéité des dépôts.**

Nous démontrons que la production d'exosomes est gravement compromise dans les cellules TSAP6 ko. De plus, nous montrons que les dommages induits sur l'ADN dépendants de p53 par  $\gamma$ -irradiation ou par incubation des cellules avec de l'actinomycine D stimulent la voie de sécrétion non classique exosomale et que cette voie est abrogée dans les cellules TSAP6 ko. La production est en moyenne multipliée par deux à la suite de l'activation de p53 (Fig 5 et Fig 6, Lespagnol et al.).

Nous avons aussi analysé des souris produit par la société Ingenium Pharmaceuticals, portant une mutation ponctuelle dans le gène *tsap6*. Cette mutation a été induite par injection de N-éthyl-N-nitrosourée (ENU), un agent chimique qui induit des mutations aléatoires dans les spermatogonies. Les mutations dominantes sont observées dans les souris de première génération F1 et les mutations récessives dans les générations suivantes (Hrabe de angelis et al., 2000, Justice et al., 1999). La localisation de la mutation créée est réalisée par clonage positionnel en suivant la distribution de marqueurs génomiques spécifiques à chaque lignée de souris, associés au phénotype. (Schalkwyk et al., 1999, Panthier et al., génétique de la souris, 2003).

La mutation des souris que nous appellerons TSAP6 pm (point mutation) remplace la glutamine 395 en lysine. Cet acide aminé est localisé dans le 5<sup>ème</sup> domaine transmembranaire. Ces souris présentent des anomalies sanguines, les analyses montrent que leurs globules rouges sont plus petits et plus nombreux avec un hémocrite normal, on parle de microcytose et d'érythrocytose (Fig 22). La cause majeure d'apparition d'un tel phénotype sans anémie est un déficit en fer. Pourtant les analyses du sang total sur un nombre restreint de souris, n'ont montré aucunes autres anomalies que ce soit pour le nombre de réticulocytes, la fragilité osmotique, la demi-vie des érythrocytes le contenu du fer dans le foie, le métabolisme du fer, la capacité de liaison de la transferrine.



**Fig 22. Phénotype des souris TSAP6 pm.**

**Chaque point représente une souris. Le volume cellulaire (MCV, mean corpuscular volume) et le contenu en hémoglobine (MCH, mean corpuscular hemoglobin) des hématies sont plus faibles pour les animaux mutés (mut) par rapport aux animaux sauvages (wt).**

Toutefois quelques tests préliminaires de GST-pull down (expériences permettant de détecter des interactions protéine-protéine) ont montré que TSAP6pm s'associe moins avec TCTP comparé à TSAP6 sauvage. Malgré ces résultats qui restent à confirmer, beaucoup de choses restent à faire avec ce modèle, refaire des analyses sanguines pour le métabolisme du fer sur un plus grand nombre d'animaux, contrôler la localisation intracellulaire de TSAP6 muté, étudier le cycle du Tf-R et la sécrétion des exosomes pour savoir si cette mutation affecte ces mécanismes et analyser l'activité ferric-réductase décrite par Ohgami (Ohgami et al., 2005).

**F - II - Article I : Exosome secretion, including the DNA-damage-induced p53 dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice.**

Alexandra Lespagnol<sup>1,\*</sup>, Dominique Duflaut<sup>1,\*</sup>, Giusy Fiucci<sup>1</sup>, Chantal Beekman<sup>2</sup>, Lionel Blanc<sup>3</sup>, Jean-Christophe Marine<sup>2</sup>, Michel Vidal<sup>3</sup>, Robert Amson<sup>1, 4</sup> and Adam Telerman<sup>1,4</sup>. Soumis à publication

\*These authors made equal contributions to this paper

<sup>1</sup> Molecular Engines Laboratories, 20 rue Bouvier 75011 Paris, France.

<sup>2</sup> Laboratory for Molecular Cancer Biology, VIB-UGent, Technologiepark, 927, B-9052 Ghent, Belgium.

<sup>3</sup> UMR CNRS 5235, Université Montpellier II, cc107, 34095 Montpellier, France.

<sup>4</sup> Present address: Laboratoire de Biotechnologie et Pharmacologie génétique Appliquée (LBPA) UMR 8113, École Normale Supérieure, 61 Avenue du Président Wilson, 94235 Cachan, France.



**Exosome secretion, including the DNA-damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice**

Alexandra Lespagnol<sup>1,\*</sup>, Dominique Duflaut<sup>1,\*</sup>, Giusy Fiucci<sup>1</sup>, Chantal Beekman<sup>2</sup>, Lionel Blanc<sup>3</sup>, Jean-Christophe Marine<sup>2</sup>, Michel Vidal<sup>3</sup>, Robert Amson<sup>1,4</sup> and Adam Telerman<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Molecular Engines Laboratories, 20 rue Bouvier 75011 Paris, France.

<sup>2</sup> Laboratory for Molecular Cancer Biology, VIB-UGent, Technologiepark, 927, B-9052 Ghent, Belgium.

<sup>3</sup> UMR CNRS 5235, Université Montpellier II, cc107, 34095 Montpellier, France.

\*These authors made equal contributions to this paper

<sup>4</sup> Present address: Laboratoire de Biotechnologie et Pharmacologie génétique Appliquée (LBPA) UMR 8113, École Normale Supérieure, 61 Avenue du Président Wilson, 94235 Cachan, France.

Running title: TSAP6 controls exosome secretion

| Keywords: TSAP6, Steap3, exosome, p53, TCTP.

Abbreviations : TSAP6, Tumor Suppressor Activated Pathway 6; TCTP, Translationally Controlled Tumor Protein ; MEFs, Mouse Embryo Fibroblasts ; PARP, Poly (ADP-Ribose) Polymerase ; TUNEL, Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling

Corresponding author:

Adam Telerman

LBPA UMR 8113

École Normale Supérieure,

61 Avenue du Président Wilson, 94235 Cachan, France

Phone: + 33-6 20 89 13 82 Fax +33-1 43 26 03 52

e-mail: [telerman@noos.fr](mailto:telerman@noos.fr)

**Abstract**

TSAP6 (Tumor Suppressor Activated Pathway 6), also known as *Steap3*, is a direct p53 transcriptional target gene and a potential regulator of protein secretion e.g. Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP). In keeping with the latter, we show herein that TSAP6 is a glycosylated protein present in the trans-Golgi network, endosomal-vesicular compartment and cytoplasmic membrane. To further investigate the physiological function of TSAP6, we have generated TSAP6-deficient mice. These mice exhibit microcytic anemia with abnormal reticulocyte maturation and deficient Transferrin-Receptor (Tf-R) down-regulation, a process known to be dependent on exosomal secretion. Moreover, we provide direct evidence that exosome production is severely compromised in TSAP6-null cells. Finally, we show that the DNA-damage-induced p53-dependent nonclassical exosomal secretory pathway is abrogated in TSAP6-null cells. Given the fact that exosomes are used as cell-free vaccines against cancer and that they could be involved in the biogenesis and spread of HIV, it is important to understand their regulation. The results presented here provide the first genetic demonstration that exosome formation is a tightly controlled biological process dependent of TSAP6.

## Introduction

TSAP6 (or more recently known as Steap3) was initially discovered because differentially regulated following activation of wild-type p53 function <sup>1</sup> and was later shown to be strongly activated in tumor suppression and reversion, which is why we named it Tumor Suppressor Activated Pathway clone 6, in contrast with other transcripts which are inhibited in their expression (TSIPs) <sup>1,2</sup>. Its promoter contains a functional p53-responsive element <sup>3</sup>. TSAP6 is part of a family of oxydoreductases with 6 transmembrane domains <sup>4</sup> and, was recently identified as a ferrireductase <sup>5</sup>. Decreasing the expression of TSAP6 with anti-sense mRNA or siRNA results in inhibition of apoptosis and cell cycle arrest. TSAP6 binds to <sup>3</sup> and cooperates with Nix, a pro-apoptotic, BH3-only, Bcl2 family-member and Myt1 kinase, a negative regulator of the G<sub>2</sub>M transition.

Among the most intriguing functions of TSAP6 is its potential role in the transport of proteins via the nonclassical pathway. TSAP6 is indeed required for the secretion of TCTP <sup>6</sup>. The nonclassical pathway was described following the discovery that proteins such as Interleukin1 $\beta$  (IL1  $\beta$ ) and Galectin could be secreted by cells in the absence of a functional ER-Golgi system <sup>7,8</sup>. There are different nonclassical export routes and the exosomes are only one of them <sup>9</sup>. Most proteins secreted by the alternative pathways lack the conventional signal peptides usually present in secreted proteins, and this secretion process continues in the presence of Brefeldin A (BFA), an inhibitor of the ER-Golgi-dependent protein secretion. The nonclassical export routes are of major importance since they are responsible for the secretion of HIV-tat, Herpes simplex VP22, angiogenic growth factors, inflammatory cytokines and components of the extra-cellular matrix <sup>9</sup>. It seems unlikely that a single mechanism mediates the secretion of all these factors.

In this nonclassical export route, the exosomes have been discovered through the work on the reticulocyte maturation process concomitant with the Transferrin Receptor (Tf-R) release <sup>10</sup>. As outlined by Rose M. Johnstone, the structure by which the Tf-R is expelled from the reticulocytes

was named “exosome”, in contrast with the endosomes, which internalize molecules into the cell <sup>11</sup>. Exosomes are suggested to play an important role in immunity being directly involved in inter-cellular signal transfer <sup>12,13</sup>. The exosomal pathway could be “hijacked” by certain viruses, and vehiculates HIV <sup>14,15</sup>. The growing list of proteins secreted by exosomes includes among others the MHC Class I and II, integrins, tetraspanins, heat shock proteins and membrane transport and fusion proteins. A breakthrough was achieved when Zitvogel and colleagues found that exosomes derived from dendritic cells induce an immune response strong enough to eradicate established murine tumors, opening hereby a new treatment strategy now applied to patients: the cell-free vaccines <sup>16</sup>. Since then, exosomes are considered as “vesicles shipping extracellular messages” contributing this way to an acellular mode of communication.

Although it was known that TSAP6 is a p53-target gene and that it regulates the nonclassical pathway of protein secretion, it was only recently highlighted, through a series of elegant experiments by A. Levine and colleagues, that p53 could control the secretion of exosomes <sup>3,6,17</sup>. In the present study, we provide the first genetic evidence that secretion of exosomes is TSAP6-dependent and that TSAP6 controls to a large extent the p53-dependent nonclassical exosomal protein secretion pathway.

## Results

### TSAP6-deficient mice display a microcytic anemia.

TSAP6 is located on murine chromosome 1, spans over 38.8 kb and contains 6 coding exons. TSAP6 knockout mice (also referred to in this work as TSAP6 KO, TSAP6  $-/-$  or TSAP6 null mice) were generated by deleting exons 2 and 3 (Fig. 1A).

To generate a *Tsap6* mutant mouse line, a loxP site was inserted 5' of exon 1 and two loxP sites flanking a neomycin resistant gene were inserted 3' of exon 2 by homologous recombination in embryonic stem (ES) cells (Fig. 1A). Correctly targeted ES clones (*Tsap6*<sup>Neo-R/+</sup>) were obtained, as assessed by PCR and Southern blot, and Cre-mediated excision of exons 2 to 3 was achieved upon electroporation of a Cre-recombinase expression vector in those cells. One clone that showed proper deletion of exons 2 to 3 (*Tsap6* <sup>$\Delta 2-3/+$</sup> ), as identified by PCR analysis, was used to establish a *Tsap6* mutant mouse line. Mice were genotyped using a PCR-based approach using primers F1, R1 and R2 (Fig. 1A). Heterozygous (*Tsap6* <sup>$\Delta 2-3/+$</sup> ) and homozygous (*Tsap6* <sup>$\Delta 2-3/\Delta 2-3$</sup> ; thereafter referred to as *Tsap6* <sup>$-/-$</sup> ) mice for this mutation (*Tsap6* <sup>$\Delta 2-3/+$</sup> ) are viable and fertile. All the TSAP6 knockout mice and derived cells described in this study were generated by crossing *Tsap6* <sup>$\Delta 2-3/+$</sup>  animals.

To demonstrate that this mutation results in the complete ablation of *Tsap6* expression, we first produced a rabbit antiserum directed against a N-terminal peptide of the murine TSAP6 protein. In NIH3T3 cells, the antibodies detect by Western blot analysis two major bands of 46 and 52 kDa (Fig. 1B) that are strongly down-regulated with different TSAP6 siRNAs (data not shown) of which one is exemplified in Fig. 1B. Importantly, these two bands are absent in Mouse Embryo Fibroblasts (MEFs) from TSAP6  $-/-$  embryos (Fig. 1C). The upper band is the result of a glycosylation since it strongly fades away after treatment of the cells with N-glycosidase (Fig. 1D). Moreover, confocal microscopy using the same antiserum shows that the TSAP6 protein is localized at the perinuclear region, co-localizing with the trans-Golgi network marker TGN38 (Fig.

1E). The punctuated cytoplasmic and plasma membrane staining partially co-localizes with the Transferrin Receptor and EEA1, (Fig. 1F, Supplementary Fig. 1), suggesting that TSAP6 is expressed in the endosomal pathway. Immunofluorescence analyses performed on different cells reveals the same expression pattern of TSAP6 (Supplementary Fig. 1). Importantly, this staining is absent in MEFs from the TSAP6  $-/-$  embryos (Fig. 1F). These results suggest that the antibodies are highly specific for the TSAP6 protein product and that deletion of exon1 and 2 leads to a Tsap6-null mutation. The 46-52 kDa TSAP6 protein is expressed at a variable level in tissues of wild-type mice and absent in all tissues from the TSAP6  $-/-$  mice (Fig. 1G). Since our previous data suggested that TSAP6 decreases the cellular level of TCTP we examined TCTP or the TfR expression in Tsap6-null cells. As shown in Figure 1H the splenocytes from TSAP6 KO mice accumulate TCTP and the TfR which is consistent with the idea that TSAP6 could regulate protein secretion.

Pathological analysis of the TSAP6  $-/-$  mice shows a significant splenomegaly (Fig. 1I). Microscopic analysis of these spleens in TSAP6  $-/-$  mice shows a strong extramedullary hematopoiesis with an alteration of the architecture, the white pulp being more spread and the red pulp showing small cells irregular in shape and variable in size (Fig. 1J). The peripheral blood counts show a pronounced increase in platelets and an increased number of red blood cells (RBC) with a drop in hemoglobin, MCV and MCH (Fig. 2A). Both the reticulocytes and erythrocytes are much smaller in the TSAP6  $-/-$  mice when analyzed by FACS (Fig. 2B), May-Grünwald-Giemsa (Fig. 2C) and electron microscopy (Fig. 2D). Besides being smaller, these cells have a completely abnormal shape (Fig. 2 C, D). These red blood cells from TSAP6  $-/-$  mice have a very pronounced osmotic fragility (Fig. 2E). Other biochemical parameters tested are within the normal range, besides for a mild hyperglycemia in female TSAP6 KO mice (Supplementary Fig. 2).

**TSAP6  $-/-$  mice exhibit delayed reticulocyte maturation with retention of the Tf-R as a consequence of reduced secretion of exosomes.**

The Tf-R is on one hand efficiently recycled to the plasma membrane after endocytosis and intracellular iron release. On the other one, after about forty cycles the Tf-R is either degraded or expelled from the reticulocyte through exosomes. Given the above results - showing the abnormal phenotypic features of the red blood cells in TSAP6  $-/-$  mice and the subcellular localization of TSAP6, partially overlapping with the Tf-R and early endosomal vesicles - we investigated whether the reticulocytes from TSAP6  $-/-$  mice go through normal maturation. We first assessed the status of the Tf-R on the surface of reticulocytes from animals that were not treated with phenylhydrazine (Fig. 3A). The maturation state of red cells from blood of 13 wild-type controls and 11 TSAP6-KO mice was analyzed. Two criteria were monitored: RNA content by Thiazole Orange labeling, and presence of Tf-R on the cell-surface at equilibrium, through binding of an anti-Tf-R antibody at 4°C. Mice sampling was carried out to have for each KO mouse a WT mouse of the same litter.

As shown in figure 3A presenting data obtained from two representative mice (WT and TSAP6 KO), the percentage of Thiazole Orange-labelled red cells was higher in TSAP6 KO mice (8.34%) than in WT mice (5.34%), reflecting an anemic phenotype. We computed that  $6.68\% \pm 0.66\%$  and  $11.15\% \pm 2.92\%$  of red cells were positive for Thiazole Orange-labelling in the WT and TSAP6 KO mice series, respectively. When we analyzed the presence of Tf-R on the surface of red cells, in agreement with the anemic phenotype, we found a higher percentage of cells from KO mice labelled with the anti-Tf-R antibody ( $7.28\% \pm 2.49\%$  vs.  $2.60\% \pm 0.32\%$  for TSAP6 KO and WT mice series, respectively). More interestingly, when we determined the ratio  $r = \%Tf-R/\%TO$  for each mouse, we found a ratio of  $0.39 \pm 0.04$  (WT mice) and  $0.61 \pm 0.03$  (TSAP6 KO mice) (Supplementary Table 1). In other words, 39% of immature (Thiazole Orange -labelled) cells were positive for Tf-R in WT mice, while at the same time 61% of immature cells were positive for Tf-R in TSAP6-KO mice. These experiments were reproduced on another series of animals where both, the bone marrow erythroblasts and peripheral blood reticulocytes were analysed for their expression of the Tf-R (Supplementary Fig. 3). A May-Grünwald-Giemsa staining of the bone marrow shows

an increase number of red blood cells precursors (WT: 20.% +/- 2; TSAP6 KO: 37% +/- 8), the erythroblasts, characterized by a round nucleus and a basophilic cytoplasm (Supplementary Fig. 3 A and B). The Tf-R was measured in Ter119 positive cells representing the erythroid population. The Ter119 antibody recognizes a glycoprotein A-associated molecule from early proerythroblast to mature erythrocyte stages. Two populations Ter119 positive and Tf-R positive were identified (Supplementary Fig. 3 C and D). R1 represents the population with high levels of Tf-R and R2 represents the population with low levels of Tf-R. In the bone marrow erythroblasts, the R1 population is significantly higher in KO mice (46 %) than in WT mice (30 %). For the peripheral blood reticulocytes, there is also an increase of the R1 population in the TSAP6 KO mice (11 %) versus the WT mice (4.5 %). The R2 population did not differ significantly in the bone marrow erythroblasts between WT and KO mice, neither in peripheral blood reticulocytes. Altogether, this might reflect a lag phase in Tf-R expulsion through exosomes during bone marrow erythroblasts and reticulocyte maturation of TSAP6-KO mice, leading to a higher pool of cell surface-associated Tf-R.

Mice were next rendered anemic by phenylhydrazine treatment to augment the proportion of reticulocytes. Reticulocytes are allowed to mature for 3 days, during which they lose an important fraction of the Tf-R. This can be monitored either by FACS (Fig.3B) or by Western blot analysis (Fig.3C) of the Tf-R content in the reticulocyte fraction. Under normal conditions the Tf-R content becomes progressively weaker. Using such a classical maturation assay, we observed that in WT animals at t0 61.4% of the reticulocytes are positive for the Tf-R and that this drops to 33.7% after 48h of maturation. In contrast, the TSAP6 KO mice show 78.2% of TfR present on their reticulocytes at t0 and 84.4% after 48h of *in vitro* maturation (Fig. 3B). This was further confirmed by Western blot analysis. In the reticulocyte pellet from the WT animals, the TSAP6 protein dimerizes and oligomerizes into higher migrating forms (Fig. 3C and Supplementary Fig. 4). On day 3, the 46-52 kDa TSAP6 is almost undetectable in the WT reticulocytes and all the TSAP6



protein is oligomerized. Concomitantly, there is a decreased content in the cells of the Tf-R. In contrast, in the reticulocytes from TSAP6  $-/-$  mice the content in Tf-R remains elevated as compared to the WT ones, suggesting retention of Tf-R during reticulocyte maturation in the knockout animals.

In order to verify whether this difference in Tf-R expression at the surface of reticulocytes could be due to a defect in traffic and/or recycling of this receptor, we studied another cellular population *i.e.* thymocytes, that do not lose Tf-R during a maturation process like reticulocytes do. FACS analysis revealed that at 4C° no significant differences in surface Tf-R expression could be detected between WT and TSAP6 KO thymocytes (Supplementary Table 2). When incubated at 37C° for 1h, 15-25% of the receptor was internalized leaving a smaller fraction detectable at the cell surface (Supplementary Table 3). Here again no significant differences was measured between WT and TSAP6 KO thymocytes suggesting that TSAP6 is not involved in Tf-R internalization process. These results reinforce the notion that the relative accumulation of Tf-R at the cell surface of reticulocytes issued from TSAP6 KO animals is rather due to a defect in exosome secretion.

We next examined the secretion process during the maturation of the reticulocytes but were unable to obtain highly reproducible results due to the important lysis of the TSAP6  $-/-$  red blood cells, likely due to their fragility (Fig. 2E).

Eventually we tested this hypothesis using Bone Marrow Dendritic Cells (BMDCs) which are the second best investigated model of exosomal secretion<sup>13,18</sup>. As reported previously, the BMDCs also contain Tf-R, that is abundantly secreted by the exosome pathway<sup>16</sup>. Interestingly, the Tf-R (type I, CD71) has been described to be the cell entry receptor for Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV)<sup>19</sup> and to play a determining role in the activation of dendritic cells by this retrovirus<sup>20</sup>. This receptor is regulating iron uptake not only in reticulocytes but in most cells, as recently reviewed<sup>21</sup>. As shown in Fig. 3D, the TSAP6  $-/-$  BMDCs contain a much heavier load of Tf-R as compared to their WT counterparts. Most striking is the observation that TSAP6 $-/-$  BMDCs secrete 50% less

exosomes than the WT (Fig. 3E). Secretion of the Tf-R by the exosomes of TSAP6 <sup>-/-</sup> mice BMDCs is also severely decreased (Fig. 3F). Since the exosomes migrate at a very precise density, this was further confirmed by sucrose gradient centrifugation (Fig. 3G). Altogether these results suggest that in the TSAP6<sup>-/-</sup> mice have a strongly impaired secretion of exosomes.

### **TSAP6 controls exosome secretion in response to DNA damage and p53 activation.**

Since TSAP6 is a p53 target gene, we examined whether or not it functions as a critical mediator of p53-induced biological activities. To this end, mice were irradiated (Fig. 4) and p53-induced apoptosis was examined in the spleen by TUNEL and PARP cleavage assays. As expected, a massive induction of apoptosis was detected in the spleen of wild-type mice (Fig. 4 A, B). Strikingly, the apoptotic response was significantly attenuated in spleen from TSAP6 <sup>-/-</sup> animals (Fig. 4 A, B). To demonstrate that this phenotype is a consequence of a defect downstream of p53, the expression of p21, a well-known p53-target gene, was examined in irradiated splenocytes. A comparable increase in P21 expression was observed in WT and Tsap6-deficient cells (Fig. 4 B and Supplementary Fig. 5). In order to exclude the possibility that Tsap6-deficient splenocytes are more resistant to radiation-induced apoptosis because of a depletion of the radiosensitive cell population(s), splenocytes were further analyzed by FACS for Annexin V positive cells and a series of cell surface markers. In agreement with the above data, the total number of Annexin V positive cells after was significantly higher in the WT mice (37 %) than in the TSAP6 KO mice (15.5 %) (Fig 4C). Moreover, all sub-populations analyzed, including B cells, T cells, or erythrocytes, were less prone to apoptosis in the TSAP6 KO mice than in the WT animals (Fig 4D). More specifically, the Ter119 and CD4 positive cells in the TSAP6 KO mice were extremely resistant to apoptosis. These data indicate that TSAP6 is an essential mediator of p53-induced apoptosis in response to  $\gamma$ -irradiation.

We next asked whether activation of p53 by DNA damage regulates exosomal protein secretion in a TSAP6-dependent manner. For that purpose, we analyzed the secretion of exosomes in MEFs and BMDCs from WT, and TSAP6 <sup>-/-</sup> mice. The cells were either  $\gamma$ -irradiated (for the MEFs) or treated with ActinomycinD (for the BMDCs). The ratio of secreted exosomal proteins in activated ( $\gamma$ -irradiated MEFs or ActinomycinD-treated BMDCs) versus resting cells is presented in Fig. 5A and E. When irradiated, WT MEFs secrete twice the amount of exosomal proteins (1.94 +/- 0.37) while the TSAP6 <sup>-/-</sup> MEFs do not respond significantly (1.12 +/- 0.29) in their exosomal protein secretion (Fig. 5A). The same quantitative increase in exosomal protein secretion is found in WT BMDCs after they were treated with ActinomycinD (2.65 +/- 0.43), while this response is not significant in TSAP6 <sup>-/-</sup> BMDCs (1.30 +/- 0.63) (Fig. 5E). The difference in the secretion of exosomal proteins between WT vs. TSAP6 <sup>-/-</sup> cells is highly significant (MEFs WT vs. KO P values 0.0001 and BMDCs WT vs. KO P values 0.00001) (Fig. 5A and E). Previous reports quantifying the secretion of exosomes suggest an increase in function of the applied stimulus that varies by a factor of 1.2 to 2<sup>22-24</sup>. Thus the present report that TSAP6 <sup>-/-</sup> BMDCs secrete 50% less exosomes than WT cells, and that activation of p53 by DNA damage increases the secretion by a factor of 2, is within the limits expected in response to a robust stimulus, that can even be much stronger for one specific protein<sup>24,25</sup>.

When instead of looking at the total amount of secreted exosomal proteins, specific proteins, such as Flotillin, Tsg101 or Galectin-3 are monitored, their secretion varies in MEFs and BMDCs for the WT cells, while there is no significant increase detectable in the TSAP6 <sup>-/-</sup> cells (Fig.5 B and F). The exosomes were tested for their migration on a sucrose density gradient since this is the parameter that most accurately defines the exosomal fraction (Fig. 5 C and G), it is thus a qualitative parameter and not a quantitative one as it is the case in Fig. 5 B and F. All the experiments were carried out before there was any detectable sign of apoptosis that could contaminate the exosomes with cellular debris and apoptotic bodies, and no significant cleavage of

the PARP was detected (Fig. 5D and H). Moreover, the experiments on BMDCs were always carried out in the presence of *zVAD-fmk* when ActinomycinD was added, and this again to avoid any induction of apoptosis. As control, we used GP96; as shown in Fig. 5B and F, there is no contamination of the exosomal fraction with GP96, indicating that there is no cell death or unspecific protein leakage occurring.

Induction of TSAP6 was monitored by Western blot analysis, and activation of p53 was assessed by analyzing induction of P21 expression (Fig. 5D and H). This level of induction of TSAP6 and P21 is more pronounced in the MEFs (Fig. 5D) than in the BMDCs (Fig. 5H) due to the difference in cellular system, DNA damaging agent (irradiation or ActinomycinD) and time of incubation post induction.

We further used Pifithrin-alpha as p53 inhibitor to assess whether or not TSAP 6-exosomes are p53 dependent (Fig. 6). In two different cellular systems, MEFs and spleen cells, following irradiation or ActinomycinD treatment, Pifithrin-alpha significantly inhibited the production of exosomes in WT but not in TSAP6 null cells (Fig. 6 A and D). The expression of specific exosomal proteins such as TSAP6, TCTP, Flotilin-1, TF-R was activated following DNA damage and strongly inhibited by Pifithrin-alpha in WT cells only (Fig. 6 B and E). The effect of Pifithrin-alpha was assessed by monitoring the inhibition of expression of P21 (Fig. 6 C and F). In the MEFs no sign of apoptosis was present (PARP, Fig. 6C). In the spleen cells, there was a minor effect on PARP cleavage (PARP, Fig. 6F), but most importantly, no leakage of GP96 into the exosomal fraction was detected (Fig. 6 E).

These results indicate that p53 activation by DNA damage induces an increased secretion of exosomes and that this process is TSAP6-dependent.

## Discussion

Since the discovery of p53 in the eighties, a wealth of information has been assembled, making it probably the best studied protein<sup>26</sup>. Its loss of function in over 50% of cancers, together with its key position as regulator of the cell cycle, apoptosis and senescence, has greatly contributed to the interest of investigators<sup>27</sup>. It was unexpected that p53 could control the protein secretory machinery and the previous reports related on p53 target genes that were *bona fide* secreted proteins such as Thrombospondin-1, IGF-BP3, Plasminogen activator, Maspin, but none of them are regulators of the protein secretory pathways<sup>28-32</sup>. In the initial experiments (A.T. and R.A., data not shown), when either TSAP6 or TCTP alone were transfected into cells, the proteins were expressed at the expected level. However, when both TSAP6 and TCTP were simultaneously co-transfected, TSAP6 was expressed but TCTP became almost undetectable. We then confirmed that TSAP6 facilitates the secretion of TCTP via the alternative pathway<sup>6</sup>. In the present study, we aimed at getting a more physiological picture of the role of TSAP6 as a potential regulator of the exosomal secretion pathway, and whether it was part of an essential p53 regulated process.

The data reported here suggest that the TSAP6 protein is present in the cell under two forms, a non-glycosylated and a glycosylated species. The proportion between both forms varies in the different tissues and cells. The punctated cytoplasmic staining, which partially colocalizes with Tf-R and EEA1, suggests that TSAP6 is present in the endosomal pathway. The punctated cytoplasmic and membrane pattern is in agreement with our previous studies on the human TSAP6 protein, using tagged constructs. More intriguing is the strong perinuclear staining, co-localizing with the trans-Golgi network (TGN). This sub-cellular localization of TSAP6 is compatible with the compartment responsible for the biogenesis of exosomes. This distribution reflects a central role of TGN in protein secretion by both classical and nonclassical routes. Indeed, TGN is well known as the “last station” of the ER/Golgi secretion pathway, driving proteins to their respective final destination (*e.g.* lysosome, plasma membrane). Several reports indicate that the translocation site of galectins

might be related to exosome biogenesis and that exosome formation is highly connected with TGN. Very interestingly, it has recently been demonstrated in epithelial cells that galectin-3, a protein also identified in exosomes secreted by dendritic cells<sup>33</sup>, is involved in apical sorting of glycoproteins from the TGN through binding to their carbohydrate residues<sup>34</sup>, pointing out that galectin-3, a protein without signal peptide is located in the lumen of TGN vesicles. It is thus tempting to envision TGN as a compartment where alternative secretion of proteins could occur. Although formation of exosomes is often presented as a process taking place in late endosomal structures, there is strong evidence that depending on the cell type, exosomes can be formed from a recycling endosomal/TGN compartment<sup>35 23 36, 37 23</sup>. The “Trojan exosome hypothesis” has been proposed in the biogenesis of retroviruses<sup>14</sup>. This hypothesis is partly based on similarities in the biogenesis of viral and exosomal particles, especially the implication of the ESCRT machinery. Targeting of the HIV type 1 envelope to the trans-Golgi network through binding to TIP47 has been demonstrated to be essential for env incorporation into virions and infectivity<sup>38</sup>. Altogether these data are consistent with ones’ expectations from a protein, such as TSAP6, in order to fulfill a regulatory role in the fate of exosomes.

The most striking phenotypic feature in the TSAP6 knockout mice is the microcytic anemia with anisocytosis and an augmented osmotic fragility. One explanation for the microcytosis is that TSAP6 is<sup>5</sup> a ferrireductase. In the light of the results shown here, they have by all probability also rescued the exosome regulating function of TSAP6, but their study was not focused on exosomes. Hence, our results suggest that there is an alternative explanation for the TSAP6<sup>-/-</sup> phenotype, namely the one provided by the above discussed data on the localization of TSAP6 and the biological connection between the endosomal/TGN compartment and exosomes. The absence of TSAP6 causes a deregulation of these compartments, resulting in a severe deficiency in exosome formation delaying the maturation of bone marrow erythroblasts and peripheral blood reticulocytes, with as consequence smaller cells retaining the Tf-R instead of normally expelling it. This was

illustrated in the above results where the percentage of reticulocytes and their expression of the Tf-R were already significantly higher in the TSAP6 KO mice prior to phenylhydrazine treatment. When we performed a classical reticulocyte maturation assay, following the induction of anemia by phenylhydrazine, it became even more evident that these reticulocytes from TSAP6 KO mice have a severe defect in maturation and in jettison their Tf-R. These animals have an intact internalization pattern of their Tf-R but as illustrated with the experiments on bone marrow dendritic cells, they are deficient in the production of exosomes. Altogether these data indicate that the anemic phenotype is due, at least to a large extent, to an improper reticulocyte maturation with impaired loss of Tf-R which is as previously described an exosomal process.

We finally questioned whether TSAP6 is part of an essential p53 regulated process. We therefore investigated whether TSAP6 *per se* is necessary for the secretion of exosomes following p53 activation. It was unexpected that p53 could control the protein secretory machinery; previous reports related that some p53 target genes were *bona fide* secreted proteins such as *e.g.* Thrombospondin-1, IGF-BP3 and Plasminogen activator, but none of them are regulators of the protein secretory pathways<sup>28-30</sup>. Our results indicate that in different cellular systems (MEFs, BMDCs and spleen cells) there is a complete absence of response to p53 for exosomal protein secretion in TSAP6<sup>-/-</sup> mice.

More than 20 years separate by now the discovery of exosomes and TSAP6, the first described protein regulating their production. Our results indicate that one function of TSAP6 in regulating exosome production is to expel from the cells proteins that are not necessary anymore for their further development and life, such as the Tf-R for mature red blood cells. Another example of a protein that is expelled from the cells, in this case through its interaction with TSAP6, is TCTP<sup>6</sup>. This is an anti-apoptotic factor and thus, reducing its intra-cellular load in cancer cells renders them more prone to apoptosis. Here the exosome may function as a “detoxifier” of the cell and it seems reasonable that p53 would have under its command such genes that would detoxify the cell. A

second function of the exosomes and TSAP6 could be to communicate with the environment in signaling abnormal intra-cellular events that it detects. This could lead p53 *via* TSAP6 to be in control of the “bystander effect”. In patients with a loss of p53 function, this would mean that exosomes do not vehiculate the messages anymore and that destruction of cancer cells by the immune system would be inefficient. Altogether this opens a new area of research where we could learn how the p53-TSAP6 pathway signals the status of a cell to its surrounding.



## **Acknowledgements**

This study is part of the PhD thesis of Alexandra Lespagnol (Université Paris VII), and Dominique Duflaut (Université Paris XI). We are grateful to Tania Sorg and Daniel Metzger for their help and advice in the generation of the TSAP6 knockout mice, to Alain Schmitt, Marie-Claude Gendron, Myriam Garfa, and Evelyne Souil for their expertise. We wish to thank Dr. Naomi Taylor for kindly providing antibodies for spleen immune-phenotyping.

C. B. is supported by a grant from the Belgian Foundation for Cancer Research. This work was supported by a grant from ARC (# 3444) to M. V. and a Eureka grant from the European Communities to A.T. and R.A.

**Competing interests statement:** The authors declare that they have no competing financial interests.

## Material and Methods

### Generation of TSAP6 knockout mice

To delete the second and the third coding exons of murine TSAP6 gene, a targeting vector was constructed as follows: a genomic region containing the second and third coding exons of the murine TSAP6 was amplified by PCR using following primers containing a *XhoI* site on the forward primer and a *SacII* site on the reverse primer: Forward 5'-CCGCTCGAGCATATATTTTGCATGCGCCC-3' reverse 5'-TTCCCGCGGGCCATCCAGGCCATGACATTG-3'. The *XhoI/SacII* fragment was inserted into a pBluescript (pBS) vector. A 46 bp polynucleotide containing a LoxP site floxed by two *NheI* sites was added 404 bp upstream exon 2 in the unique *SpeI*. Finally a neomycin resistance gene floxed by two LoxP sites was added 533 bp downstream exon 3. This construct was linearized and introduced into C57Bl6 ES cells to obtain recombinant mice in which the exons 2 and 3 upon Cre-mediated recombination.

Genotyping was performed by PCR using The genotyping was performed using a three-primers-based PCR strategy; the primers were as follows:

F1 5'-CTGTCCCATGTCCTCTTAAGTTATC-3';

,R1 5'-AGCTCAGAAATTAGAGGGAGAGGAT-3' and

R2 5'-TGAACCCCAGAATACATGAATAAGT-3' (Insert Fig.1A). For all phenotyping experiments, TSAP6 WT and KO mice were obtained by crossing two TSAP6 heterozygotes. Mice of the same litter or of the same age were used in each experiment. Analysis of the phenotype was performed on 24 mice: 5 KO males, 7 KO females, 6 control WT males and females. WT and KO lines have a 75% C57Bl6 mixed genetic background. All experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986.

**Bone marrow derived dendritic cells (BMDCs)** were cultured in IMDM (Sigma) with 10% endotoxin free FCS (BioWest), 1% L-Glutamine, 500  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol, antibiotics and 30% conditioned medium from J558 cells (a GM-CSF-secreting plasmacytoma kindly provided by Dr.

C. Théry). Briefly, precursors of BMDCs, were obtained by flushing femurs and tibias with IMDM using a 25-gauge needle. Cells were grown during 8-13 days to induce differentiation into BMDC (expression of CD11c).

### **Immunofluorescence analysis**

MEFs were fixed for 20 min. at room temperature with paraformaldehyde 4% in PBS, permeabilized for 10 min. with triton-X100 0.2% in PBS, and stained with primary antibodies including: polyclonal anti-TSAP6 at 1/100, sheep anti-TNG38 (Serotec) at 1/100 and mouse anti-Tf-R H68.4 (Zymed) at 1/50. The respective secondary antibodies were: anti-rabbit Alexa 594 (red), anti-goat Alexa 488 (green) or anti-mouse Alexa 488 (green) antibodies at 1/4000 (Molecular Probes). Confocal imaging was performed using a Zeiss LSM 5 Pascal confocal microscope.

### **FACS analysis**

Freshly isolated reticulocytes from phenylhydrazine (PHZ) treated or not mice (WT or TSAP6 KO) were washed 3 times in PBS and then immunostained with allophycocyanin (APC)-conjugated anti-Ter119 (1:200) (BD Pharmingen) and phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD71 (1:200) (BD Pharmingen) antibodies, as previously described. The same protocol was used on erythroblasts, isolated from bone marrow of WT or TSAP6 KO mice as previously described.

For mice that were not PHZ treated (WT and TSAP6 KO), red cells were collected, washed in PBS and RNA levels were determined by using Thiazole orange as a control of maturation as previously described. As for PHZ treated mice, TfR quantity was determined by using phycoerythrin (PE) conjugated anti-CD71 (1:200) (BD Pharmingen) antibody.

For spleen immunophenotyping and apoptosis assay, spleens were first grinded and cells washed 3 times in PBS. Immunophenotyping was determined by using a mix of allophycocyanin (APC)-conjugated anti-Ter119, allophycocyanin Cy7 (APC-Cy7)-conjugated anti-B220, phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD11b, (1:200) (BD Pharmingen) antibodies or a mix of allophycocyanin (APC)-conjugated anti-Ter119, phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD4, phycoerythrin Cy7 (PE-Cy7)-conjugated anti-CD8 (1:200) (BD Pharmingen) antibodies. In both case, apoptosis was determined by adding FITC-conjugated Annexin-V (Sigma Lab.).

In each case, fluorescence was finally monitored by flow cytometry on a FACSCanto instrument (BD Pharmingen) operating with FlowJo 7.2 software (Tree Star, Inc.)

### **Isolation of exosomes**

For exosome production, cells were cultured in complete medium. This medium was depleted of contaminating vesicles and protein aggregates by overnight centrifugation at 100,000 g in OPTIMA™ MAX-E ultracentrifuge (Beckman Coulter). Recovery of 2.10<sup>6</sup> MEFs culture medium for exosomal analysis was done 24 hrs after a 10 Gy  $\gamma$ -irradiation (IBL637 irradiator Cs<sup>137</sup>). BMDCs were plated at 1.5 10<sup>6</sup> cells/ml with 100 nM Actinomycin D (Sigma) and 100  $\mu$ M zVAD-fmk (benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketon) (Sigma). Recovery of the BMDCs medium was done 6 hrs after treatment. The culture media were placed on ice, centrifuged at 450 g to sediment the cells and filtered on 0.22  $\mu$ M to remove cellular debris. Exosomes were separated from the supernatant by centrifugation at 100,000 g for 70 min at 4°C. The exosomes pellets were washed with a large volume of PBS, centrifuged at 100,000 g for 70 min and resuspended in 50  $\mu$ l of PBS. Exosomes (30 $\mu$ g) were further purified by a 16 hours ultracentrifugation at 100,000 g on a linear 0.25 M to 2.5 M sucrose gradient. Flotation of exosomes on a continuous gradient was performed in a TLA110 rotor. Fractions of the gradient (500  $\mu$ l) were diluted in 3ml of PBS and ultracentrifuged for 2 hours at 200,000 g. Pellets of each fraction were analysed by Western blot. The preparation of exosomes derived from the spleen cells were performed as described above for the other cellular systems. Pifithrin-alpha (Sigma) was used as p53 inhibitor at a concentration of 20  $\mu$ M prior to induction of the DNA damage.

### **Pathology, Hematology and blood biochemistry**

4 month-old mice, 6 TSAP6 KO and 6 WT of each sex, were subjected to systematic necropsy. Body weight and length, liver, kidney, spleen, heart and paragenital fat weight were recorded.

Organs were fixed 24 hrs in 4% buffered formaldehyde and embedded in paraffin. Hematoxylin and eosin-stained sections were prepared from tissues of 3 TSAP6 KO and 1 WT of each sex. Peripheral blood counts and blood biochemistry was analysed using standard procedures. Data were analyzed using unpaired Student t-test or repeated measures analysis of variance (ANOVA) with one between factor (genotype) and one within factor (time). Qualitative parameters (*e.g.* clinical observations) were analyzed using  $\chi^2$  tests. The level of significance was set at  $p < 0.05$ . For the osmotic fragility 4  $\mu$ l of peripheral blood were incubated 10 min at room temperature in 1 ml of hyperosmotic solution (Sucrose/ PBS from 400 mOsm to 1200 mOsM). Hemoglobin concentration in supernatant was measured at OD 535 nm after centrifugation.

**Primary MEFs** (Mouse Embryo Fibroblasts) were obtained from 12.5 days old embryos using established procedures.

**TUNEL analysis** was performed as described before <sup>2</sup>

**Reticulocytes.** Anemia was induced in mice in order to activate the production reticulocytes. For this purpose, mice were treated with 100  $\mu$ l phenylhydrazine at 6 mg/ml in 150 mM NaCl buffer for two consecutive days. After 4 days of recovery, total blood was collected from anemic mice in heparinized tubes by cardiac puncture. Reticulocytes were separated from erythrocytes on a Percoll gradient (1.1-1.123 g/ml). The reticulocytes were recovered at the top of the gradient, washed and seeded in RPMI medium containing 5 mM L-glutamine, 5 mM adenosine and 10 mM inosine. After 3 days culture at 37°C, the reticulocytes had differentiated into erythrocytes as assessed by cresyl blue coloration.

### **Antibodies**

Antibodies against the N-terminal peptide (MSGEMDKPLISRRLVDS DGS) of mouse TSAP6 were generated in rabbits, affinity-purified and used at 1/2000 for Western blotting. Other primary antibodies used: anti-PARP H250 (Santa Cruz) at 1/1000; anti-Tf-R H68.4 (Zymed) at 1/1000; anti-

Flotillin-1 (BD Biosciences) at 1/1000; anti-p21 F5 (Santa Cruz) at 1/500; anti-Actin I19 and anti-PCNA FL-261 (Santa Cruz) at 1/1000. Secondary antibodies: anti-mouse HRP-linked (Santa-Cruz), anti-goat HRP-linked (Calbiochem) and anti-rabbit HRP-linked (Calbiochem) were used at 1/5000.

### **Glycosylation and dimerization analysis**

Glycosylation analysis was performed using Glycoprotein deglycosylation kit (Calbiochem) following manufacturer's recommendations. For the dimerization analysis NIH3T3 cells were co-transfected with the mouse constructs TSAP6-Flag and TSAP6-GFP. 24 hrs after transfection cells were lysed in IP buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40). 200 µg of proteins were incubated overnight at 4°C with anti-Flag antibody coated agarose beads (mouse clone M2 Sigma). Mouse serum plus agarose beads were used as negative control. After 3 washes in IP buffer, beads were heated at 95 °C for 5 min in sample buffer and loaded on a SDS polyacrylamide gel and Western blots were performed and hybridized with anti-GFP antibodies (Santa Cruz).

### **siRNA**

Mouse TSAP6 RNA duplex were synthesized by Dharmacon: siRNA1: 3'-GACGTTCTACAGCCATACA-5', siRNA2: 3'-AGCCATACATTCGGAAAGA-5' and siRNA3: 3'-TCAGCACCGCCAGTCTAAT-5'. Human TCTP siRNA duplex was used as control.

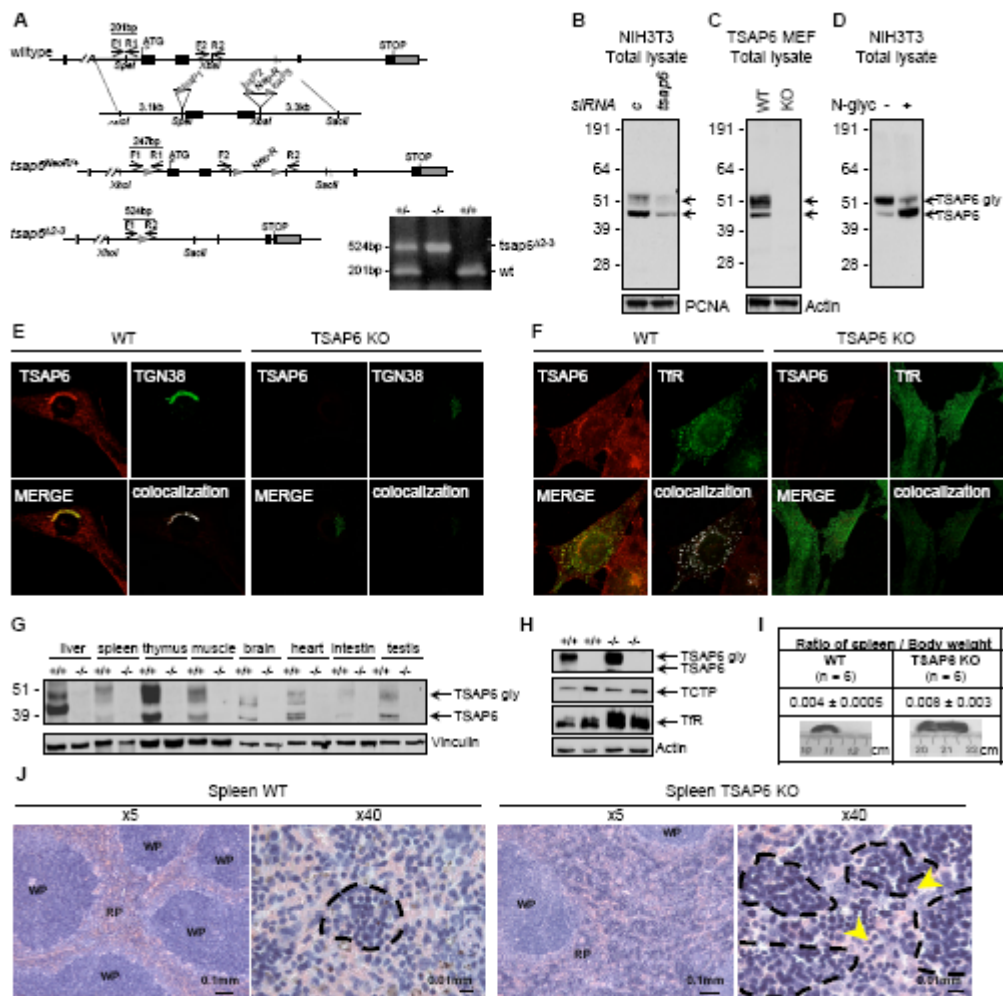
## References

1. Amson, RB, Nemani, M, Roperch, JP, Israeli, D, Bougueleret, L, Le Gall, I 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: 3953-7.
2. Roperch, JP, Alvaro, V, Prieur, S, Tuynder, M, Nemani, M, Lethrosne, F 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: 835-8.
3. Passer, BJ, Nancy-Portebois, V, Amzallag, N, Prieur, S, Cans, C, Roborel de Climens, A et al., (2003) The p53-inducible TSAP6 gene product regulates apoptosis and the cell cycle and interacts with Nix and the Myt1 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 2284-9.
4. Sanchez-Pulido, L, Rojas, AM, Valencia, A, Martinez, AC and Andrade, MA, (2004) ACRATA: a novel electron transfer domain associated to apoptosis and cancer. *BMC Cancer* 4: 98.
5. Ohgami, RS, Campagna, DR, Greer, EL, Antiochos, B, McDonald, A, Chen, J et al., (2005) Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet* 37: 1264-9.
6. Amzallag, N, Passer, BJ, Allanic, D, Segura, E, They, C, Goud, B et al., (2004) TSAP6 facilitates the secretion of translationally controlled tumor protein/histamine-releasing factor via a nonclassical pathway. *J Biol Chem* 279: 46104-12.
7. Rubartelli, A, Cozzolino, F, Talio, M and Sitia, R, (1990) A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *Embo J* 9: 1503-10.
8. Hughes, RC, (1999) Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1473: 172-85.
9. Nickel, W, (2003) The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur J Biochem* 270: 2109-19.
10. Pan, BT and Johnstone, RM, (1983) Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* 33: 967-78.
11. Johnstone, RM, (2005) Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood Cells Mol Dis* 34: 214-9.
12. Raposo, G, Nijman, HW, Stoorvogel, W, Liejendekker, R, Harding, CV, Melief, CJ et al., (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 183: 1161-72.
13. They, C, Zitvogel, L and Amigorena, S, (2002) Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol* 2: 569-79.
14. Gould, SJ, Booth, AM and Hildreth, JE, (2003) The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 10592-7.
15. Nguyen, DG, Booth, A, Gould, SJ and Hildreth, JE, (2003) Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem* 278: 52347-54.
16. Zitvogel, L, Regnault, A, Lozier, A, Wolfers, J, Flament, C, Tenza, D et al., (1998) Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 4: 594-600.
17. Yu, X, Harris, SL and Levine, AJ, (2006) The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein. *Cancer Res* 66: 4795-801.

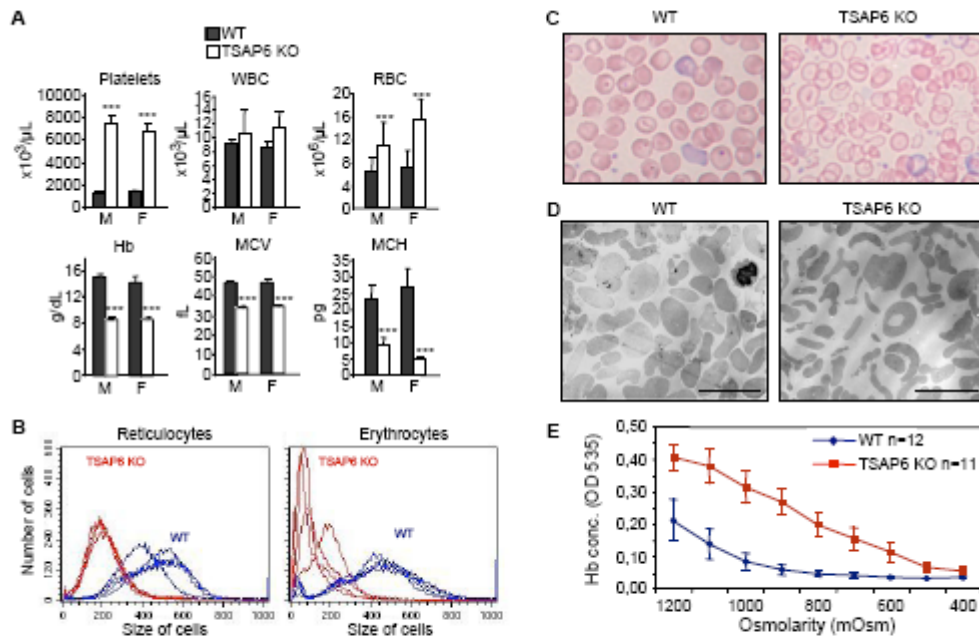
18. de Gassart, A, Geminard, C, Hoekstra, D and Vidal, M, (2004) Exosome secretion: the art of reutilizing nonrecycled proteins? *Traffic* 5: 896-903.
19. Ross, SR, Schofield, JJ, Farr, CJ and Bucan, M, (2002) Mouse transferrin receptor 1 is the cell entry receptor for mouse mammary tumor virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 12386-90.
20. Burzyn, D, Rassa, JC, Kim, D, Nepomnaschy, I, Ross, SR and Piazzon, I, (2004) Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by a retrovirus. *J Virol* 78: 576-84.
21. Aisen, P, (2004) Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 2137-43.
22. Vidal, M, Mangeat, P and Hoekstra, D, (1997) Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *J Cell Sci* 110 ( Pt 16): 1867-77.
23. Savina, A, Vidal, M and Colombo, MI, (2002) The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11. *J Cell Sci* 115: 2505-15.
24. Clayton, A, Turkes, A, Navabi, H, Mason, MD and Tabi, Z, (2005) Induction of heat shock proteins in B-cell exosomes. *J Cell Sci* 118: 3631-8.
25. Lancaster, GI and Febbraio, MA, (2005) Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *J Biol Chem* 280: 23349-55.
26. Vogelstein, B, Lane, D and Levine, AJ, (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-10.
27. Hollstein, M, Sidransky, D, Vogelstein, B and Harris, CC, (1991) p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53.
28. Dameron, KM, Volpert, OV, Tainsky, MA and Bouck, N, (1994) Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265: 1582-4.
29. Kunz, C, Pebler, S, Otte, J and von der Ahe, D, (1995) Differential regulation of plasminogen activator and inhibitor gene transcription by the tumor suppressor p53. *Nucleic Acids Res* 23: 3710-7.
30. Buckbinder, L, Talbott, R, Velasco-Miguel, S, Takenaka, I, Faha, B, Seizinger, BR et al., (1995) Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53. *Nature* 377: 646-9.
31. Komarova, EA, Diatchenko, L, Rokhlin, OW, Hill, JE, Wang, ZJ, Krivokrysenko, VI et al., (1998) Stress-induced secretion of growth inhibitors: a novel tumor suppressor function of p53. *Oncogene* 17: 1089-96.
32. Zou, Z, Gao, C, Nagaich, AK, Connell, T, Saito, S, Moul, JW et al., (2000) p53 regulates the expression of the tumor suppressor gene maspin. *J Biol Chem* 275: 6051-4.
33. Rodriguez-Boulan, E, Kreitzer, G and Musch, A, (2005) Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 233-47.
34. Delacour, D, Cramm-Behrens, CI, Drobecq, H, Le Bivic, A, Naim, HY and Jacob, R, (2006) Requirement for galectin-3 in apical protein sorting. *Curr Biol* 16: 408-14.
35. Thery, C, Boussac, M, Veron, P, Ricciardi-Castagnoli, P, Raposo, G, Garin, J et al., (2001) Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol* 166: 7309-18.
36. Bonifacino, JS, (2004) The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 23-32.
37. Mallet, WG and Maxfield, FR, (1999) Chimeric forms of furin and TGN38 are transported with the plasma membrane in the trans-Golgi network via distinct endosomal pathways. *J Cell Biol* 146: 345-59.



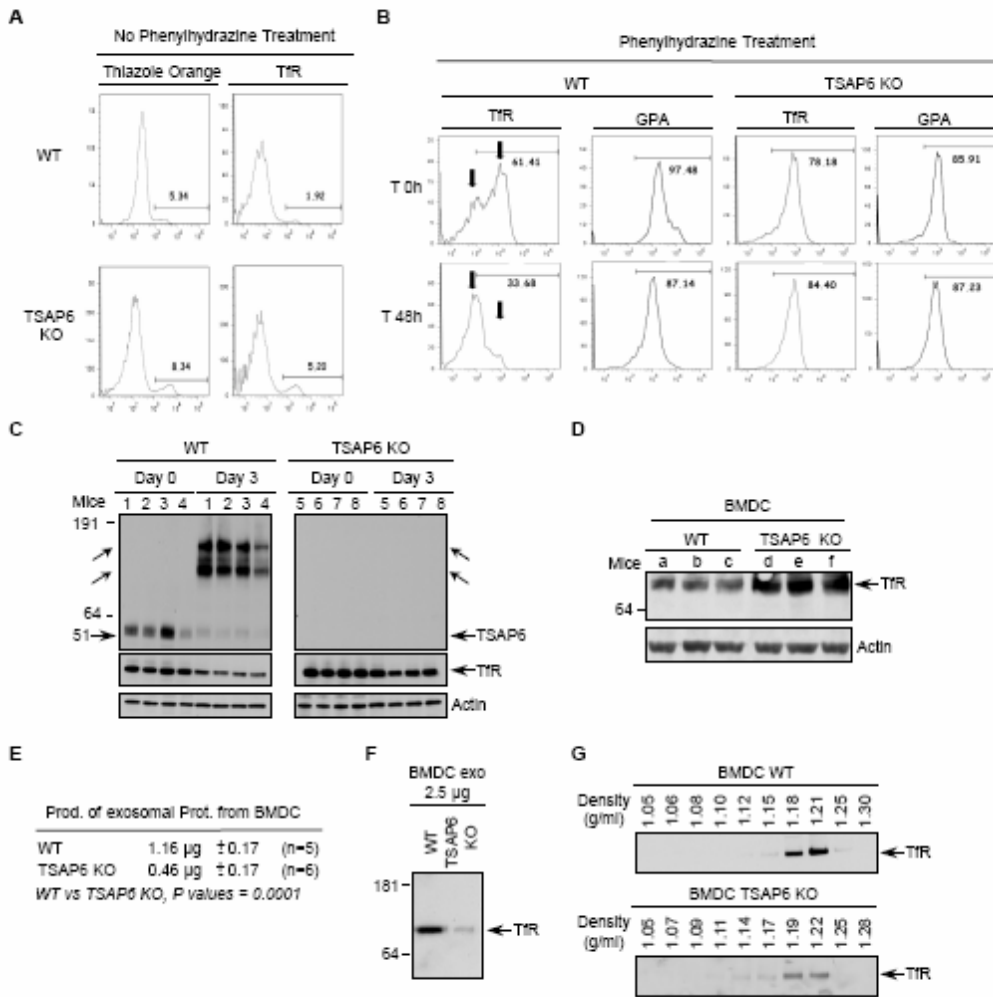
38. **Blot, G, Janvier, K, Le Panse, S, Benarous, R and Berlioz-Torrent, C, (2003) Targeting of the human immunodeficiency virus type 1 envelope to the trans-Golgi network through binding to TIP47 is required for env incorporation into virions and infectivity. J Virol 77: 6931-45.**



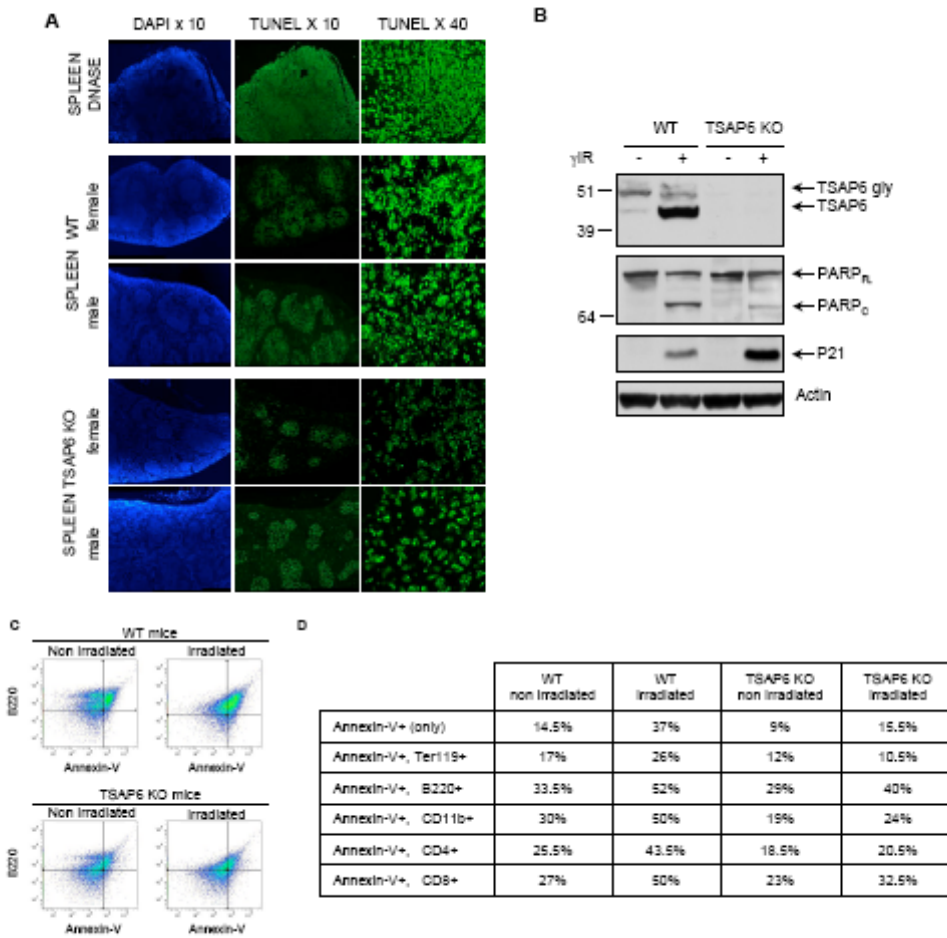
**Figure 1: TSAP6 protein and knockout mice.** **A:** Representation of the murine TSAP6 wild-type allele with the coding exons (black boxes) and the CRE-Lox targeting construct used to generate the TSAP6 KO mice. Two peptides were cloned into a PCR-amplified region of the *Tsap6* gene: One peptide containing a single LoxP site and another peptide containing the neomycin resistance gene flanked by LoxP sites. This construct was injected into ES cells and the recombinant clones were used to obtain mice lacking exons 2 and 3. F1, R1 and R2 are the primers used for genotyping. Insert: Three-primer PCR genotyping strategy performed on genomic DNA from wild type (+/+), heterozygous (+/-) and TSAP6 - null (-/-) mice. **B-D** Western blot analysis using anti-TSAP6 antibodies on protein lysates from **B:** NIH3T3 cells transfected with control (c) or TSAP6 siRNA (*tsap6*); anti-PCNA (proliferating cell nuclear antigen) is used as control for equal loading. **C:** wild type (WT) and TSAP6 knock out (KO) MEFs; anti-Actin is used as control for equal loading. **D:** NIH3T3 cells before and after treatment with N-glycosidase (N-glyc). Arrows: 46 and 52 kDa bands of the TSAP6 protein **E, F:** Immunofluorescence analysis of endogenous TSAP6 protein with anti-TSAP6 (red) and co-localization with TGN38 and Tf-R (green), “merge” in yellow and “co-localization” in white show a partial codistribution of TSAP6 with the trans-Golgi network and Tf-R in WT MEFs; each confocal microscopy image represents a similar plane through the cell. **G:** Western blot analysis of TSAP6 protein expression in different organs (30µg protein loaded). Anti-Vinculin is used as control for equal loading. **H:** Western blot analysis using anti-TSAP6, anti-TCTP, anti-Tf-R antibodies on splenocytes from from wild type (+/+) and TSAP6 KO (-/-) male (M) or female (F) mice. Anti-Actin is used as control for equal loading. **I:** Ratio of spleen to body weight in 6 WT and 6 TSAP6 KO female mice. **J:** Hematoxylin-eosin staining of spleen sections of WT and TSAP6 KO mice; extramedullar hematopoiesis sites are surrounded by dotted lines; yellow arrows: small erythrocyte precursors of variable size (White Pulp: WP; Red Pulp: RP).



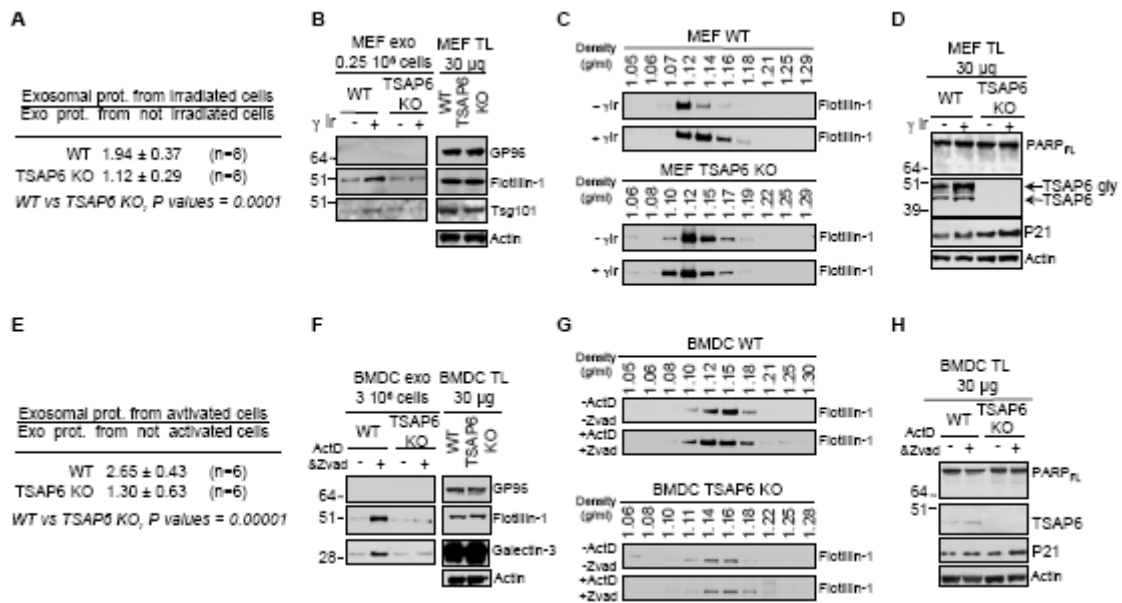
**Figure 2: Blood parameters in WT and TSAP6 KO mice.** **A:** Platelets, White Blood Cells (WBC), Red Blood Cells (RBC), Hemoglobin (Hb), Mean Cells Volume (MCV) and Mean corpuscular Hemoglobin (MCH). The results represent the medium values of 6 males and 6 females WT (black bars) vs. 4 males and 6 females TSAP6 KO (white bars). (\*) Statistical significance ( $p < 0.05$ ). **B:** FACS analysis of reticulocyte (left panel) and erythrocyte (right panel) size in 4 WT (blue line) and 4 TSAP6 KO (red line) mice. **C:** May-Grünwald-Giemsa staining of peripheral blood smears from WT and TSAP6 KO mice **D:** Electron microscopy analysis of WT and TSAP6 KO erythrocytes; bar: 10  $\mu$ m. **E:** Osmotic fragility analysis of peripheral RBC from TSAP6 KO and WT mice; n: number of mice analyzed



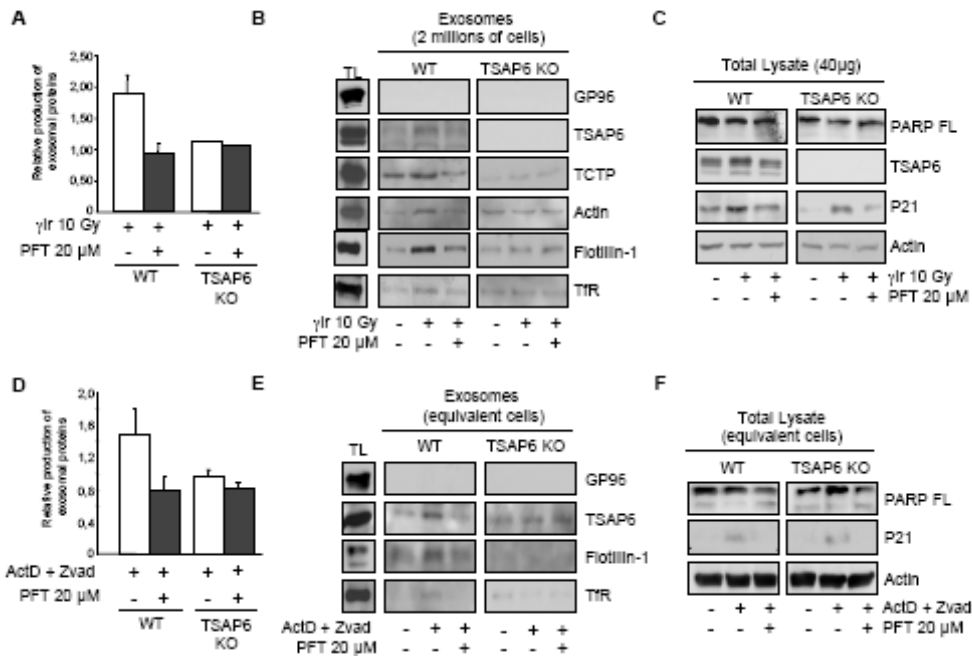
**Figure 3: Reticulocyte maturation assay with Tf-R expression, exosome production and Tf-R secretion in WT and TSAP6 KO mice. A:** FACS analysis with Thiazole Orange staining (left panel) and anti-TfR antibody of a blood sample from phenylhydrazine untreated WT and TSAP6 KO mice. **B:** After phenylhydrazine treatment of WT (left panels) or TSAP6 KO (right panels) mice, the presence of TfR and GPA were monitored by FACS analysis on freshly isolated reticulocytes (upper panel, T0h) and after 48h of maturation (lower panel, T48h). Arrows indicate changes in TfR expression during reticulocyte maturation. **C:** Western blot analysis with anti-TSAP6 and anti-Tf-R antibodies on the total lysate of purified reticulocytes from WT and TSAP6 KO mice. Differentiation into erythrocytes is analysed during 3 days. Oblique arrows show potential oligomers of TSAP6, straight arrow shows TSAP6 monomer; anti-Actin is used as control for equal loading. **D:** Western blot analysis with anti-Tf-R antibodies on the total lysate of bone marrow derived dendritic cells (BMDCs) from WT and TSAP6 KO mice. **E:** Quantitative analysis of exosomal proteins production from 106 BMDC during 6 hrs. P values for a significance level at 1%. **F:** Western blot analysis of the Tf-R content in 2.5  $\mu$ g of exosomal proteins from BMDCs. **G:** Western blot analysis with anti-Tf-R antibodies on fractions collected from 30  $\mu$ g of purified exosomes on a continuous sucrose gradient from BMDC in WT and TSAP6 KO mice.



**Figure 4: Apoptosis in spleens of irradiated TSAP6 WT and KO mice. A:** TUNEL assay on spleens of TSAP6 WT and KO mice after irradiation with 15 Gy. TUNEL positive cells are stained in green and all nuclei are stained in blue with DAPI. **B:** TSAP6 and P21 protein expression, and PARP cleavage in protein extracts from spleens of WT and TSAP6 KO irradiated mice; Arrows: PARP full length (FL) and PARP cleaved (c). Anti-Actin is used as control for equal loading. **C-D:** Apoptosis assay in spleens of irradiated WT and TSAP6 KO mice: 10 hours after irradiation, spleens isolated from WT or TSAP6 KO mice were grinded and cells were immunophenotyped by FACS analysis as described in Material and Methods. Apoptosis was determined in each population by Annexin-V positive labeling. **C** show the total % of Annexin-V positive cells in the spleen before and after irradiation in WT and TSAP6 KO mice. **D** shows % of increase of Annexin-V positive cells for different spleen lineages tested: red cells (Ter119), B-Lymphocytes (B220), granulocytes/monocytes (CD11b), T-Lymphocytes (CD4 and CD8), number of animals analyzed: 8



**Figure 5: Exosomal protein secretion in MEFs and BMDCs from wild-type and TSAP6 KO mice after DNA damage.** **A, E:** Quantitative analysis of exosomal protein production (by 106 MEFs (A) or BMDCs (E)). The results are presented as the ratio between exosomal protein production after irradiation (MEFs) or ActinomycinD treatment (BMDCs) vs. the exosomal protein production of untreated cells, ± the standard deviation; the difference in exosomal protein production between WT and TSAP6 KO is calculated for P values at a significance level of 1%. **B, F:** Western blot analysis of GP96 and Flotillin-1 and Tsg101 or Galectin-3 expression in the exosomes (exo) and total cell lysate (TL) from MEFs or BMDC without (-) and with (+) treatment (g-Ir at 10 Gy or 100nM ActD + 100 µM zVAD), 30µg of the total cell lysate and exosomal proteins derived from 0.25 10<sup>6</sup> MEFs or from 3x10<sup>6</sup> BMDC were loaded; anti-Actin is used as control for equal loading in the total cell lysate. **C, G:** Western blot analysis with anti-Flotillin-1 of a continuous sucrose gradient of proteins from purified exosomes secreted by MEFs (C) or BMDCs (G). **D, H:** Western blot analysis of PARP cleavage on MEFs (D) or BMDCs (H) total cell lysate without (-) and with (+) treatment (g-Ir or ActD + zVAD).



**Figure 6: Exosomal protein secretion in MEFs and splenocytes from wild-type and TSAP6 KO mice after DNA damage and Pifithrin-alpha treatment. A, D:** Quantitative analysis of exosomal protein production by respectively MEFs (A) or spleen cells (D) from WT and TSAP 6 KO mice. The results are presented as the ratio between exosomal protein production after g irradiation (MEFs) or ActD (spleen cells) treatment vs. the same cells not treated. B, E Western blot analysis of GP96, TSAP6, TCTP (for MEFs), Flotillin-1 and TfR expression in the exosomes of WT and TSAP6 KO cells treated by DNA damaging agents (-, +) and Pifithrin-alpha (-, +). C, F Western blot analysis of PARP cleavage, TSAP6, P21 and actin in the total cell lysate of WT and TSAP6 KO cells treated by DNA damaging agents (-, +) and Pifithrin-alpha (-, +).

## **G - TCTP protège les cellules de l'apoptose en inhibant Bax au niveau des mitochondries:**

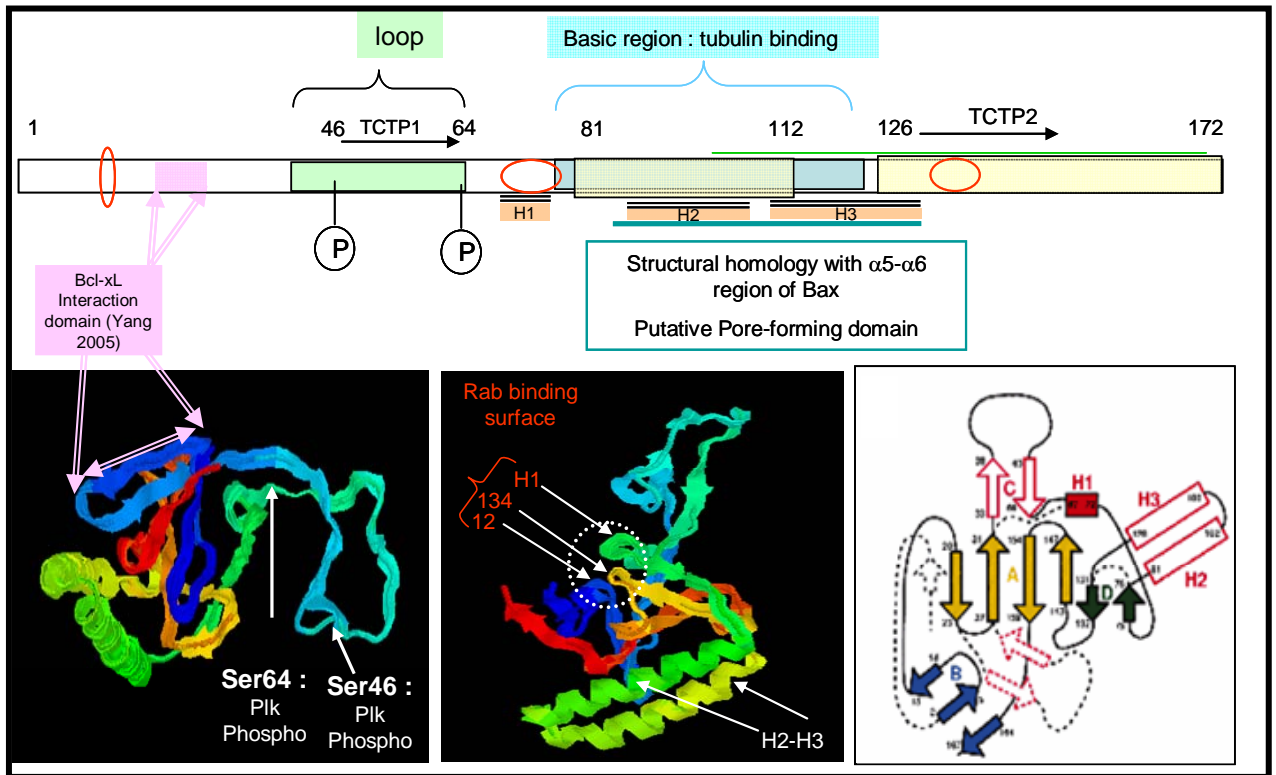
### **G - I - Homologie de structure entre les hélices H2-H3 de TCTP et les hélices H5-H6 de BAX :**

L Susini, S Besse, D Duflaut, A Lespagnol, C Beekman, G Fucci, AR Atkinson, D Busso, P Poussin, J-C Marine, J-C Martinou, J Cavarelli, D Moras, R Amson and A Telerman, **TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing Bax function**, Cell Death Differentiation, 2008.

Nous avons décidé de cristalliser TCTP car les expériences montrent que TCTP pourrait être une cible thérapeutique pour le cancer (Tuynder et al., 2004) et nous souhaitons réaliser une étude pour mettre en relation la structure de la protéine et sa fonction anti-apoptotique qui est pour nous impliquée dans son rôle dans la réversion tumoral ; pour en finalité cibler le domaine responsable par des molécules spécifiques pour TCTP.

La structure 3D de TCTP humain obtenue par rayon X à une résolution de 2.0Å par notre laboratoire est conforme à la structure commune des TCTPs définie à partir de la structure RMN de *S. pombe*. La structure de TCTP comprend 4 feuillets  $\beta$ , désignés de A-D, et de 3 hélices  $\alpha$ , désignées H1-H3. Ces hélices sont empaquetées contre la face opposée du feuillet A laissant apparaître une large face hydrophile exposée au solvant. L'hélice H2 est située contre l'hélice H3, formant une structure en épingle à cheveux. (Fig 23)





**Fig 23.Représentation de la structure 3D de TCTP.**

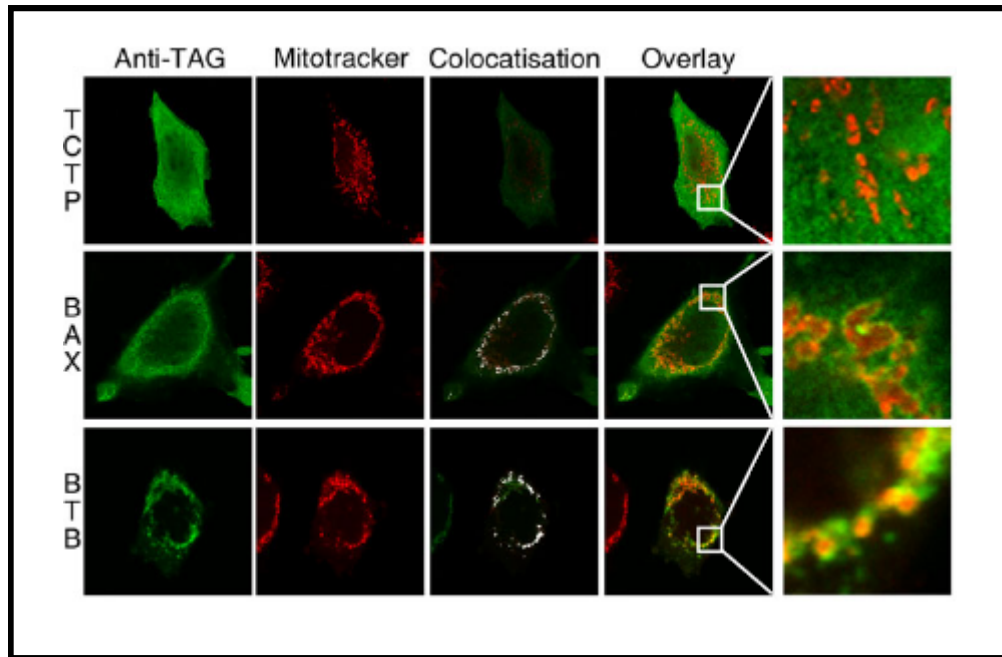
**A-D représente les feuilletts  $\beta$  . H1-H3 représente les hélices  $\alpha$ . La structure en épingle à cheveux formée par H2-H3 présente une forte homologie de structure avec les hélices  $\alpha 5$ — $\alpha 6$  de Bax**

Dans l'article de Susini et al, l'analyse du cristal de TCTP humain en utilisant le programme de comparaison de structure DALI., montre une homologie de structure entre les hélices H2-H3 de TCTP hum et le core d'hélices H5-H6 de Bax, membre de la famille Bcl-2. Cette homologie ressort à un score plus significatif que celui obtenu avec Mss4/Dss4.

Dans cet article, nous montrons que les hélices H2-H3 de TCTP ont à la fois une homologie de structure et de fonction avec les hélices H5-H6 de Bax, qui sont aussi présentes chez les autres membres, pro- ou anti-apoptotiques, de la famille Bcl-2 et qui jouent un rôle crucial dans la régulation de l'apoptose. Dans un premier temps, cette étude quantifie la forte activité anti-apoptotique de TCTP soit en induisant l'apoptose dans des cellules sur-exprimant TCTP soit par co-transfection de BAX et TCTP dans différents types cellulaires; et montre une forte implication des hélices H2-H3 dans cette activité anti-apoptotique. L'alignement de séquence entre les hélices H2-H3 de TCTP et les hélices H5-H6 de Bax présente des similarités au niveau de certains acides aminés. Les premières expériences de mutagenèse dirigée ont été focalisées pour TCTP sur la lysine 102 et l'isoleucine 109. Elles montrent que la mutation de la lysine 102 et la double mutation EK

diminuent fortement l'activité anti-apoptotique de TCTP, par contre la mutation ponctuelle de l'isoleucine montre un effet modéré. De plus, dans le but de vérifier que la structure en épingle à cheveux formée par H2-H3 porte une activité régulatrice de la mort cellulaire, une protéine chimère BTB pour Bax-TCTP-Bax, a été produite dans laquelle les séquences codantes des hélices de Bax H5-H6 ont été remplacées par les séquences codantes pour les hélices TCTP H2-H3. La protéine BTB surexprimée dans différents types cellulaires présente la même activité pro-apoptotique que la protéine Bax sauvage, ainsi qu'une co-localisation intracellulaire au niveau des mitochondries comparable (Fig 24). Les mutations ponctuelles en alanine des résidus E133-K126 et EK de la protéine chimère BTB (équivalent à E109 et K102 des hélices H2-H3 TCTP) induisent une diminution importante de la proportion de cellules en apoptose. Ces expériences suggèrent que la structure même des hélices H2-H3 de TCTP confère une activité régulatrice de l'apoptose dépendant de son environnement intra protéique.

Ensuite, par un système acellulaire où des extractions mitochondriales sont incubées avec nos protéines d'intérêt, nous montrons que TCTP inhibe les dommages induits par Bax au niveau des mitochondries. L'ensemble de ces résultats présenté dans l'article nous permet d'affirmer que les hélices H2-H3 sont fortement impliqués dans l'activité anti-apoptotique de TCTP hum et que TCTP agit en partie au niveau des mitochondries en inhibant l'activité pro-apoptotique de Bax. Cependant, il reste à savoir comment TCTP antagonise Bax, nous montrons que TCTP n'interagit pas directement avec Bax mais déstabilise toutefois sa dimérisation à la surface des mitochondries avec une forte implication des hélices H2-H3. De plus, TCTP s'ancre bien à la membrane des mitochondries mais de manière indépendamment de l'état des hélices H2-H3.



**Fig 24. Localisation de la protéine chimère BTB (Bax-TCTP-Bax).**

Les cellules HeLa sont transitoirement transfectées par des plasmides codant pour les protéines tagées : HA-Bax, HA-BTB et TCTP-flag. L'analyse d'immunofluorescence par microscopie confocale montre le marquage des mitochondries en rouge par du mitotracker (Molecular Probes), Bax - TCTP et BTB sont marqués en vert via un anticorps couplé au fluorochrome Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). Bax et BTB co-localisent avec la surface des mitochondries en rouge. BTB contrairement à Bax semble exclusivement localisé au niveau des mitochondries, ce qui se confirmera par western blot (Susini et al., 2008, fig1b online). TCTP ne montre pas de localisation intracellulaire particulière dans ces conditions expérimentales.

## **G - II - Analyses de modèles murins pour le gène *tpt-1***

### **G - II - 1 . Genè, pseudogènes et régulation de *tpt-1***

Fiucci G, Lespagnol A, Stumptner-Cuvelette P, Beaucourt S, Duflaut D, Susini L, Amson R, Telerman **Genomic organization and expression of mouse *Tpt1* gene**. *Genomics*. 2003 Jun; 81 (6):570-8. Article présenté en annexe I

Pour comprendre le rôle de TCTP *in vivo*, nous avons réalisé une lignée murine ko totale. La première difficulté qui s'est présentée fût l'identification du gène fonctionnel *tpt1* chez la souris. Dans cet article, nous déterminons la présence de plusieurs pseudogènes

potentiellement actif, localisés sur les chromosomes 6, 9 et 14. Nous montrons par Northern blot, RT-PCR semi-quantitative et par des fusions du promoteurs *tpt-1*/gène rapporteur luciférase, que le gène *tpt-1* fonctionnel est celui localisé sur le chromosome 14, qu'il a un promoteur actif et que seul un transcrite est exprimé de manière ubiquitaire dans tous les tissus.

### G - II - 2 . Les souris ko TCTP présentent un phénotype de mort embryonnaire

Susini et al, **TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function**, Cell Death and Differentiation, 2008

La construction réalisée pour produire les souris ko, a été conçue pour éliminer les exons 3 à 5 du gène *tpt1* du chromosome 14 par recombinaison homologue par l'enzyme Cre. Nous n'avons pas pu établir une lignée ko TCTP homozygote. Les animaux obtenus sont uniquement de génotype sauvage ou hétérozygote. L'analyse de l'expression de TCTP dans les tissus et les cellules embryonnaires de souris (mouse embryo fibroblasts : MEFs) (Fig 25) de génotype sauvage et hétérozygote, montre une plus faible quantité de protéine TCTP pour le génotype hétérozygote, ce qui signifie que le gène ciblé sur le chromosome 14 est bien celui codant pour TCTP chez la souris et qu'il n'y a pas à priori de compensation par les autres pseudogènes potentiellement fonctionnels localisés sur les chromosome 6 et 9. Aucune autre différence n'a été observée entre les tissus et les MEFs sauvages et hétérozygotes que ce soit au niveau de la prolifération et de la mort cellulaire intrinsèque et induite (UV,  $\gamma$ IR, doxorubicine..).

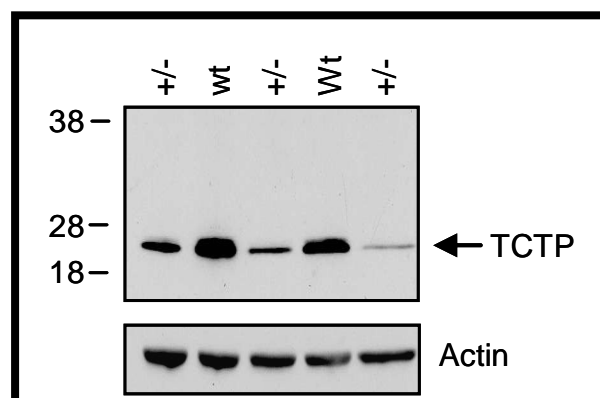


Fig 25. Analyses protéiques par western blot des MEFs issus d'embryons sauvages et hétérozygotes pour *tpt1*.

**Wt présente le génotype sauvage, +/- présente le génotype hétérozygote. 10µg de lysat total sont déposés sur un gel polyacrylamide SDS-Page. L'immunoblot de l'actin permet de contrôler l'équilibre des dépôts.**

Le phénotype principal observé est la mort au stade embryonnaire pour le génotype ko. Une étude de l'embryogenèse a été réalisée pour mieux comprendre ce phénotype. L'activité anti-apoptotique de TCTP et son implication dans la croissance cellulaire expliqueraient ce défaut du développement des embryons ko TCTP homozygote par de l'apoptose accrue non contrôlée et un défaut de la croissance. Les résultats présentés dans Susini et al., 2008, montrent une forte mortalité *in utero* des embryons entre 6,5 et 9,5 jours post-coit ainsi qu'un excès d'apoptose dans les embryons mutants au stade 6,5j. Aucun embryon n'est viable au-delà de 9,5j.

**G - III - Article II : TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing Bax function,**

Laurent Susini\*, Stéphanie Besse\*, Dominique Duflaut\*, Alexandra Lespagnol\*, C Beekman\*, G Fiucci, AR Atkinson, D Busso, P Poussin, J-C Marine, J-C Martinou, J Cavarelli, D Moras, Robert Amson and Adam Telerman, *Cell Death and Differentiation*, Feb 2008

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

# TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function

L Susini<sup>1,6</sup>, S Besse<sup>1,6</sup>, D Duflaut<sup>1,6</sup>, A Lespagnol<sup>1,6</sup>, C Beekman<sup>2,6</sup>, G Fiucci<sup>1</sup>, AR Atkinson<sup>3</sup>, D Busso<sup>3</sup>, P Poussin<sup>3</sup>, J-C Marine<sup>2</sup>, J-C Martinou<sup>4</sup>, J Cavarelli<sup>3</sup>, D Moras<sup>3</sup>, R Amson<sup>1,5</sup> and A Telerman<sup>\*,1,5</sup>

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<sup>6</sup>These authors contributed equally to this paper.

**Keywords:** TCTP; mitochondria; TCTP knockout mice

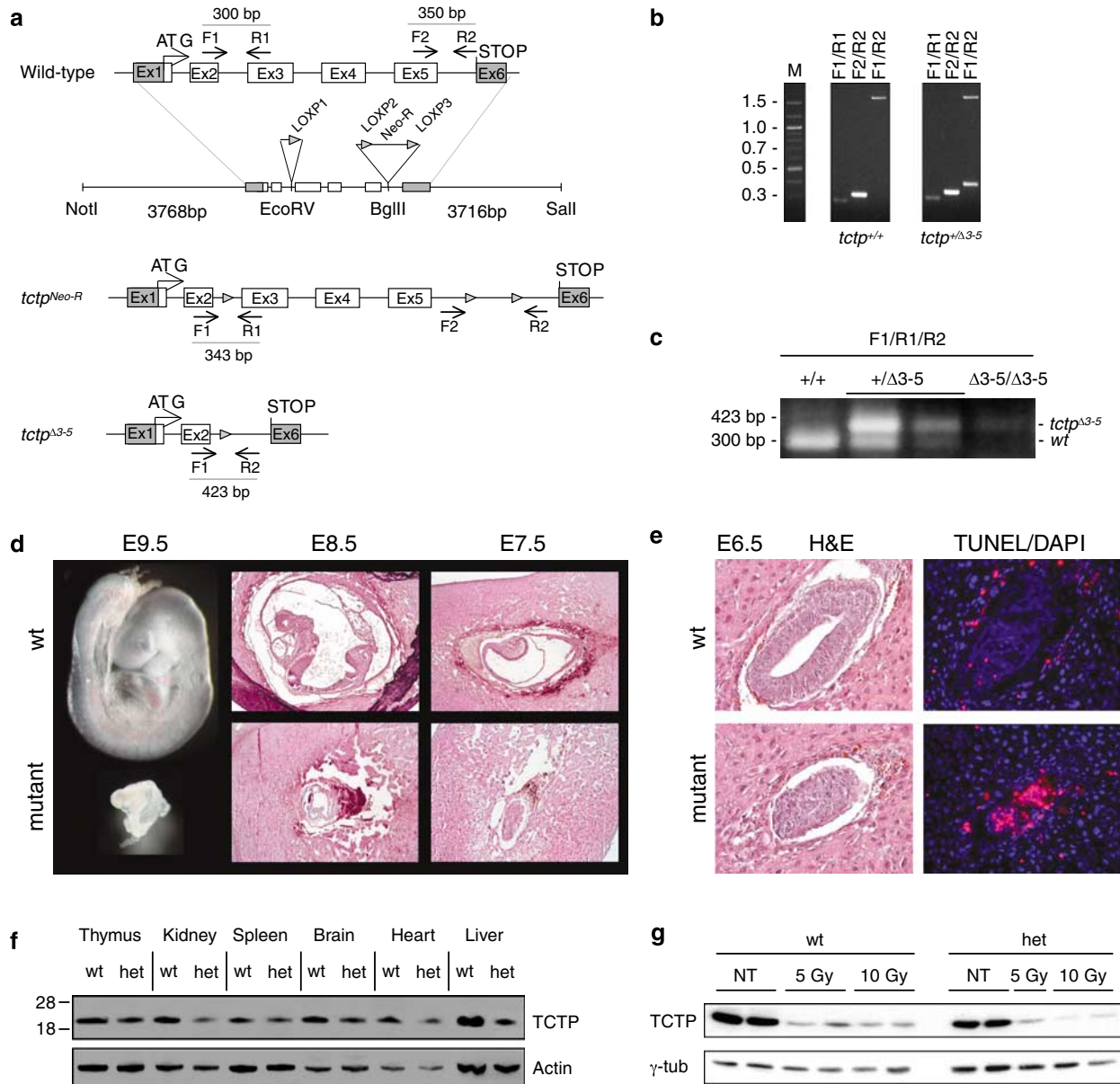
**Abbreviations:** TCTP, translationally controlled tumor protein; MEFs, mouse embryo fibroblasts; PARP, poly (ADP-ribose) polymerase; TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling; IVT, *in vitro* translation; TSC, tuberous sclerosis complex

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

functions as an antiapoptotic protein required for mouse embryonic development. Moreover, we solved the crystal structure of TCTP and found an interesting structural similarity to channel-forming helices<sup>17</sup> of the pro-apoptotic protein Bax.<sup>18</sup> This led us to explore one of the potential mechanism by which TCTP exerts its antiapoptotic function and to propose that this is occurring by insertion of TCTP into the mitochondrial membrane and inhibiting the dimerization of Bax.

## Results

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



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



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

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

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

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

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

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

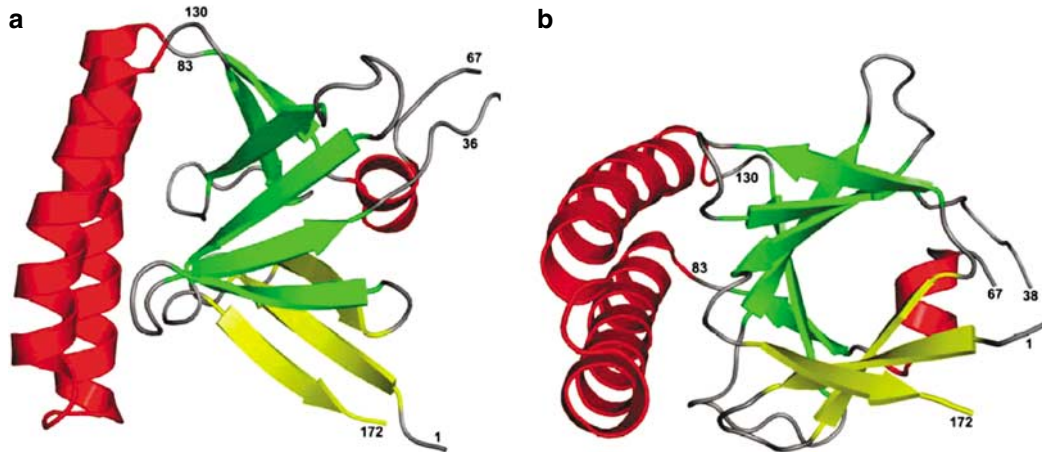
the survival and proper proliferation of cells during mouse embryonic development. Even if *tctp* levels are reduced in cells from heterozygous mice, *tctp* is not haploinsufficient in the control of cell proliferation and apoptosis. Finally, in response to DNA-damage, *tctp* steady state protein levels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

**The three-dimensional structure of human TCTP.** The X-ray structure of human TCTP has been solved and refined at 2.0 Å resolution (Supplementary Table 2). Phases were obtained by molecular replacement, using the coordinates of *Schizosaccharomyces pombe* (*S.pombe*) TCTP (PDB code: 1H7Y) as a probe. The crystallographic asymmetric unit contained four TCTP molecules and 508 water molecules. The X-ray structure of human TCTP confirms a common TCTP fold described previously for *S. pombe* TCTP.<sup>20</sup> The structure contains three  $\alpha$ -helices (H1, H2, H3) and nine  $\beta$ -strands arranged in two distorted  $\beta$ -sheets, forming two hydrophobic cores (Figure 2). A  $\alpha$ -helical hairpin is formed by the two long helices H2 and H3 and protects one face of the central  $\beta$ -sheet. In each subunit, a polypeptide encompassing residues 39–66 is not visible in the electron density map, but certainly protrudes out of the opposite side of the core  $\beta$ -sheet and is presumed to be disordered. In *S. pombe* TCTP, this portion was shown by NMR spectroscopy to be highly mobile.<sup>21</sup> As noted previously, the TCTP fold has structural similarities with two other proteins: the guanine nucleotide-free chaperone Mss4<sup>20</sup> and the methionine sulfoxide reductase gene B (MsrB).<sup>22</sup> However, the biological significance of these structural similarities remains unclear.

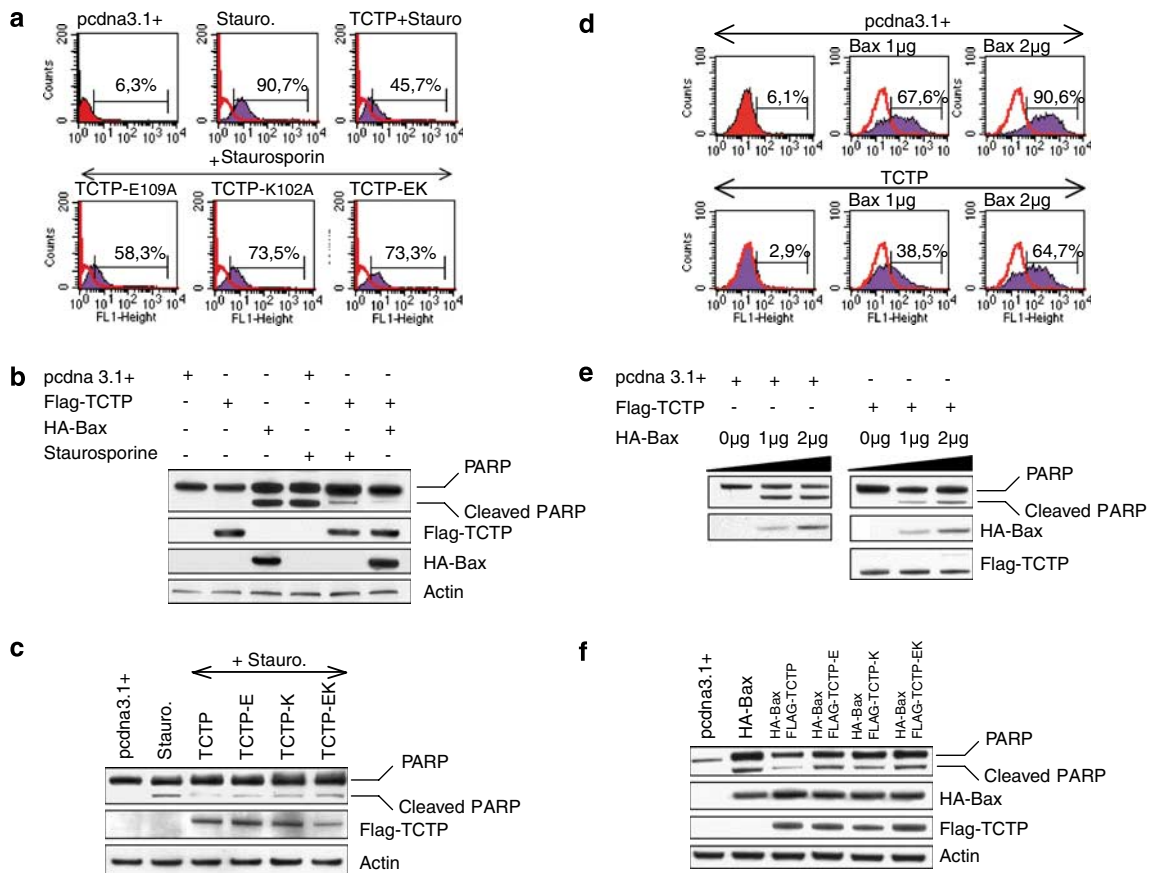
Comparison of the structure of human TCTP with those of proteins in the Protein Data Bank using DALI yielded a number of other interesting similarities. In particular, the pair of helices H2–H3 bear structural resemblance to the transmembrane domains of diphtheria toxin and bacterial colicins<sup>23</sup> and to the pair of helices H5–H6 in Bcl2 family proteins<sup>17,24–27</sup> such as Bax,<sup>18</sup> despite negligible amino acid homology. It should be noted that there is no striking amino acid homology between the members of the Bcl2 family in the domain encompassing these H5–H6 (or H6–H7) pore-forming helices but, only a structural similarity.

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

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



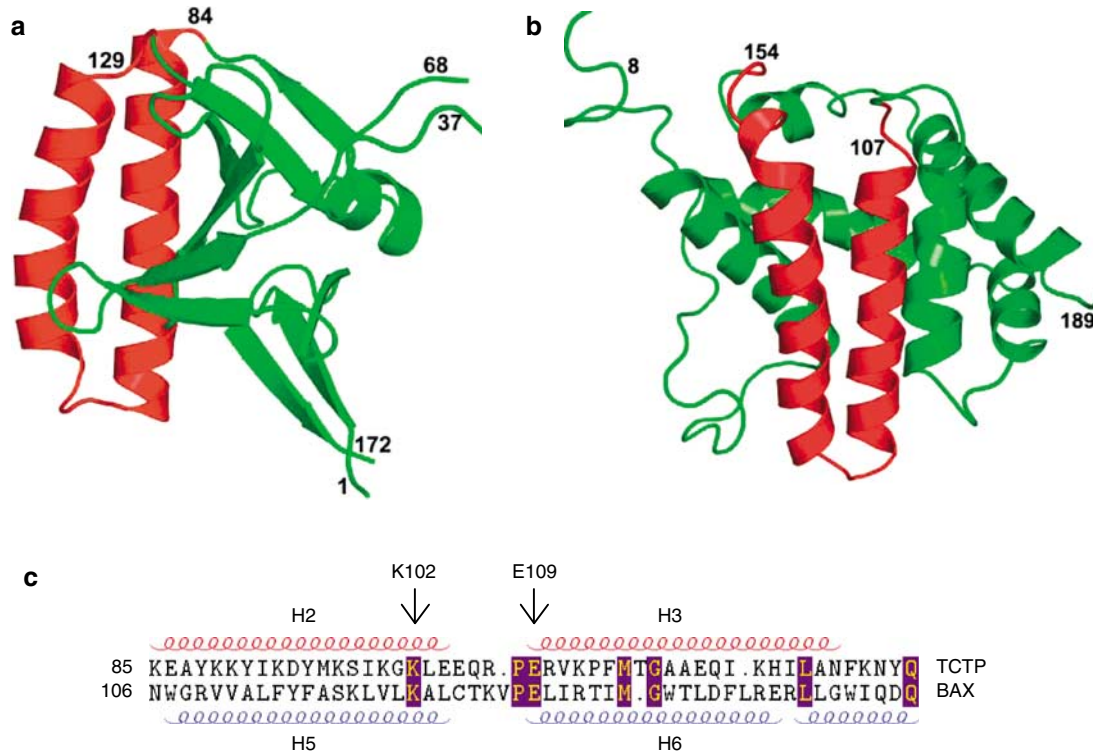
**Figure 2** The crystal structure of human TCTP. Two different orientations (a, b) of the molecule are presented showing the two distorted  $\beta$ -sheets in green and yellow and the three  $\alpha$ -helices in red. Residues 39–66 belong to a highly mobile polypeptide segment and are not visible in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



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

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

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



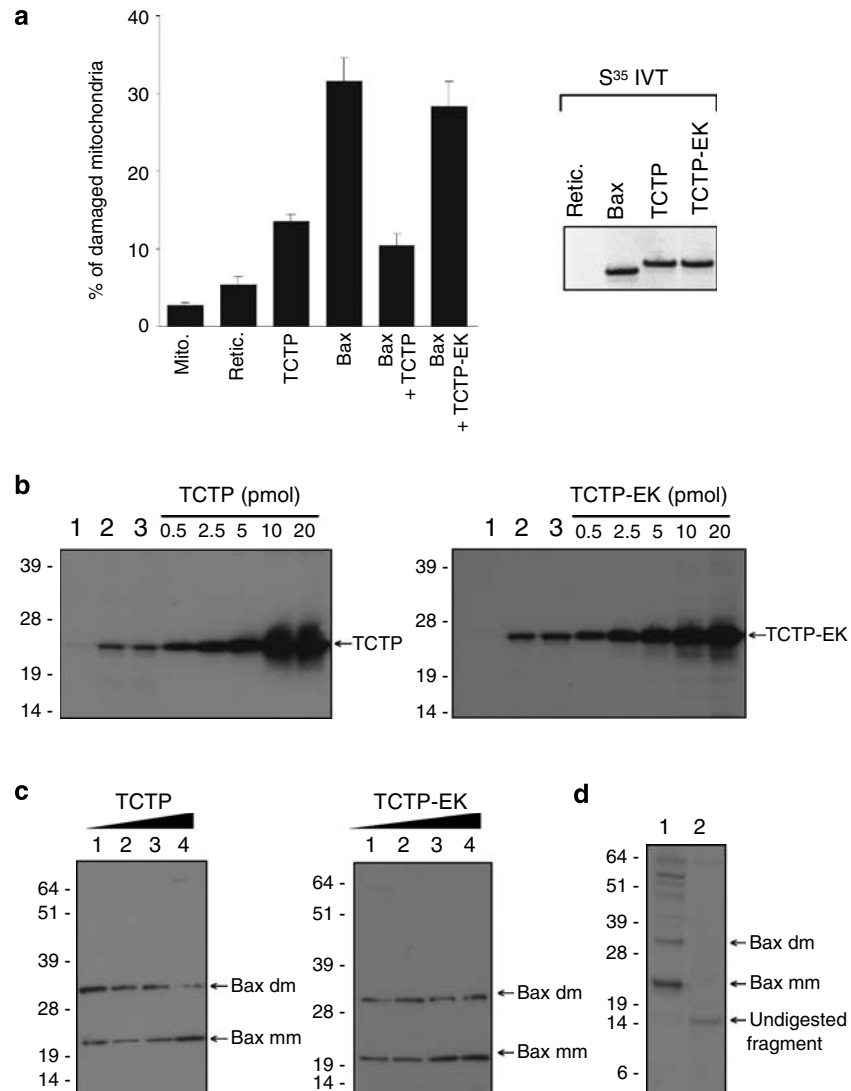
**Figure 4** The three-dimensional structures of (a) human TCTP and (b) the pro-apoptotic protein Bax (PDB code: 1F16). The  $\alpha$ -helical hairpin (shown in red) common to the two structures is displayed here in a similar orientation. (c) Alignment of the two helical hairpin residues of TCTP (H2,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

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

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

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

**TCTP anchors into the mitochondria and inhibits the dimerization of Bax.** We further tried to identify how TCTP would 'neutralize' the apoptotic effect of Bax. We first investigated whether wild-type or mutant TCTP binds directly or indirectly Bax. Neither a GST-IVT pull down nor a coimmunoprecipitation of endogenous or overexpressed Bax and TCTP yielded any positive results (data not shown), in agreement with previous reports suggesting that there was no direct interaction between TCTP and Bax.<sup>4,7</sup> To further evaluate the potential role of TCTP at the level of the mitochondria, we assessed the anchorage of TCTP into the mitochondrial membranes. For that purpose, freshly isolated mitochondria were incubated in the presence of recombinant TCTP and treated with  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , which eliminates loosely bound proteins and spares proteins that are anchored into the membranes. Figure 5b shows that approximately 0.25 pmol TCTP or TCTP-EK (lanes 2, 3) do anchor into 125  $\mu\text{g}$  of mitochondria. This amount represents less than 1% of the total amount of recombinant TCTP that was allowed to incubate in the presence of the mitochondria. 0.5–20 pmol TCTP were also loaded on the same western blot to allow a



**Figure 5** TCTP protects the mitochondria against Bax. **(a)** Analysis of the integrity of the outer mitochondrial membrane (rat liver). The cellular fraction of purified mitochondria was placed in the presence of the *in vitro translation* (IVT) products of TCTP, Bax, Bax and TCTP or Bax and TCTP-EK. Mitochondria alone (Mito). Retic. lysate alone (Retic). The oxidation of cytochrome *c* was used as a marker of mitochondrial damage. Inset: SDS-PAGE showing IVTs. **(b)** Anchorage of TCTP into the mitochondria. Western blot analysis of TCTP (left panel) and TCTP-EK (right panel) anchorage onto the mitochondria. Lane 1: mitochondria (125  $\mu$ g), lanes 2 and 3 mitochondria (125  $\mu$ g) incubated in the presence of 100 pmol TCTP (left panel) or TCTP-EK (right panel), washed and treated with  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Increasing amounts of TCTP (left panel) or TCTP-EK (right panel) were loaded to evaluate quantitatively the anchorage. **(c)** Bax dimerization. Western blot analysis of Bax anchorage into the mitochondria after treatment by increasing amounts of TCTP (left panel) or TCTP-EK (right panel). Lane 1: no treatment, lanes 2, 3 and 4 respectively treated with 5, 10 and 20 nM of TCTP (left panel) or TCTP EK (right panel). Arrows indicate Bax monomer (Bax mm) or Bax dimer (Bax dm). **(d)** Trypsin digestion assay. Western blot analysis of Bax anchorage into the mitochondria without (lane 1) or after trypsin digestion (lane 2)

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

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

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

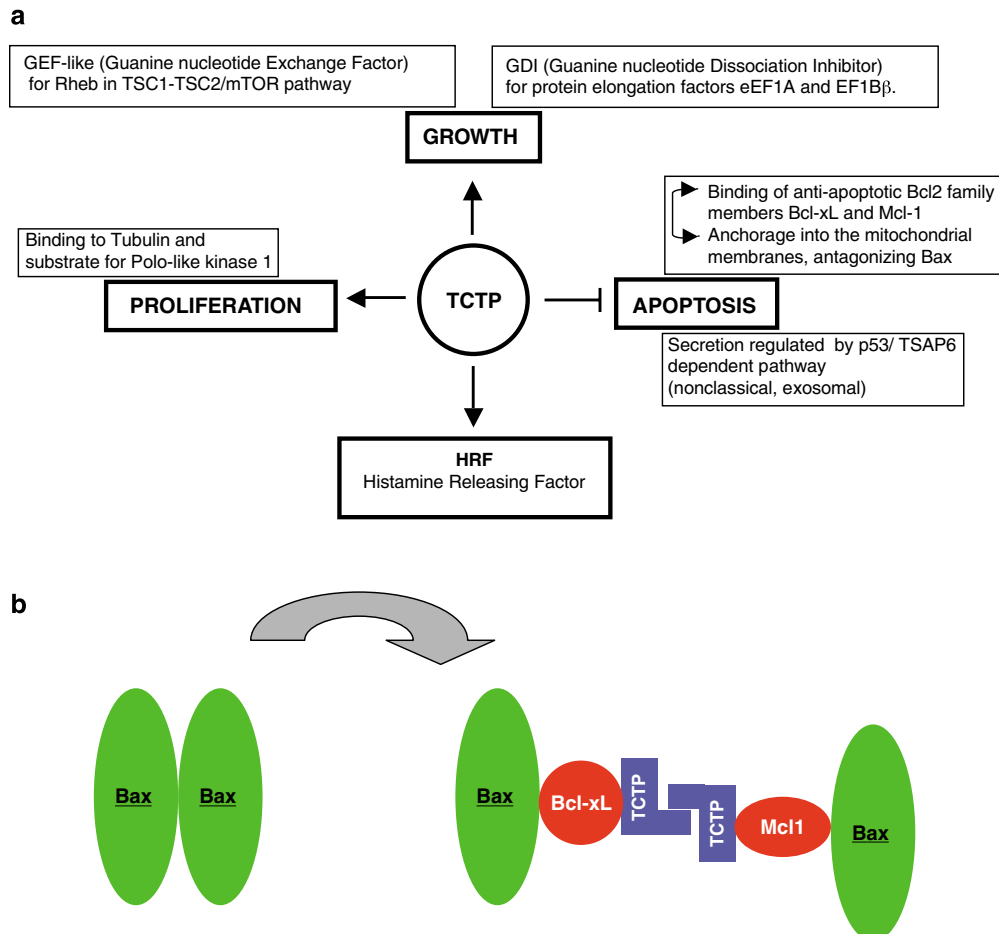
by this antibody which was directed against a synthetic peptide corresponding to amino acids 43–61 of human Bax (Figure 5d lane 2) (Lucken-Ardjomande S, Montessuit S, and Martinou JC. *Cell Death Differ* (in press)). Monoclonal anti-Bax antibodies directed against amino acids 3–16 of Bax do not recognize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

### Discussion

Since the discovery of TCTP by Yenofsky, it became clear that this protein is implicated in multiple biological processes (Figure 6a) such as cell growth, division, proliferation, and inhibition of programmed cell death.<sup>2–14,16</sup> It also functions as a histamine releasing factor<sup>15</sup> and is secreted through the non-classical exosome pathway interacting with TSAP6, a p53-regulated gene.<sup>30,31</sup> It seems that all these different functions of TCTP are related to specific association with various protein partners. The cell growth regulatory function of TCTP is related to its guanine nucleotide dissociation inhibitor

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

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



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

expected from the sequence homology.<sup>20</sup> As noted previously, TCTP shows structural homology to Mss4, a protein originally described as guanine nucleotide exchange factor for Rab proteins but later identified as a guanine nucleotide-free chaperone.<sup>33</sup> Mss4, however, lacks helices H2–H3, contains a zinc-binding site absent in TCTP and differs in the topological placement of a small  $\beta$ -sheet and a long mobile loop.<sup>20</sup> Despite a common core fold, these structural differences and the lack of any clear evidence for functional similarities weaken the suggestion that TCTP and Mss4 families of proteins are related. Similarly, the structural homology with MsrB<sup>22</sup> does not seem to extend to any common function, since the catalytic residues of MsrB are absent in TCTP.

Structural analysis of TCTP and members of the Bcl2 family yields some insight into possible mechanisms for the control of apoptotic processes. The structure of Bcl-xL<sup>25</sup> revealed a similarity between its H5–H6 and the channel-forming domains of diphtheria toxin and bacterial colicins A and E1.<sup>23</sup> With the determination of a number of structures of proteins from the Bcl2 family,<sup>17</sup> it has become clear that pro- and antiapoptotic members of the family have similar folds with the central core helices H5–H6 flanked by the other  $\alpha$ -helices and function as regulators of the mitochondrial membrane permeability where they would influence the opening of specialized pores.<sup>17,24–27</sup> It is presumed today that the balance between the pro-apoptotic and the anti-apoptotic will define the level of permeability of those pores rather than the helices creating the pores. The crystal structure of TCTP reveals a similar pair of helices and we have sought here to characterize the role of these helices in the antiapoptotic function of the protein.

It has been inferred that TCTP is antiapoptotic since decreasing its protein levels leads to apoptosis or reversion of malignant phenotypes.<sup>2–7</sup> Importantly, TCTP has been shown to bind to MCL1<sup>2,4,7</sup> and Bcl-xL,<sup>6</sup> both antiapoptotic members of the Bcl2 family. TCTP is therefore closely associated with apoptotic processes. We show here that loss of *tctp* expression results in a dramatic increase in apoptotic cell death during embryogenesis. This phenotype, together with the proliferation defect observed in these mutants, is sufficient to explain why the *tctp*-null mice die early during embryogenesis. Of note, another *tctp*-mouse model has recently been generated and the data reported<sup>34</sup> are in keeping with these observations. Together, these genetic data clearly highlight a critical role for *tctp* in the control of cell survival *in vivo*. Moreover, mutagenesis of residues in helices H2–H3 of TCTP reduces its antiapoptotic function. The creation of a chimeric protein, BTB, in which the helices H2–H3 of TCTP replace helices H5–H6 of Bax, does not disrupt the pro-apoptotic function of this Bcl2 family protein. Mutations in BTB corresponding to those made in TCTP do however disrupt this activity. Together these results show that the pair of helices function equally well in the context of a pro- or antiapoptotic protein, and that mutations diminish this activity. It may therefore be that the precise molecular event in which the pair of helices participates is similar in the context of TCTP or BTB. Sequence homology for these helices is low even between members of the Bcl2 family, although the helices are structurally and functionally conserved.<sup>17,24–27</sup> As a result, the

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

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

The 'rheostat' model suggests that the balance between pro- and antiapoptotic members of the Bcl2 family determines the fate of a cell. However, this model is not sufficient to explain our results because TCTP does not bind directly to Bax (Liu *et al.*, 2005<sup>4</sup>; Zhang *et al.*, 2002<sup>7</sup>; our results). We therefore propose that TCTP would bind antiapoptotic members of the Bcl2 family, as described for MCL1<sup>2,4,7</sup> and Bcl-xL,<sup>6</sup> and possibly arrange them in such a way into the mitochondrial membranes that their antiapoptotic action would be more efficient. We suggest that this is the 'enhancer' part of the model that would regulate the efficiency of the 'rheostat'. Furthermore, we suggest that TCTP would anchor into the mitochondrial membrane and inhibit the formation of dimeric Bax. One possible interpretation of this would be that TCTP, following its anchorage into the membrane, would separate and distance Bax homodimers (Figure 6b), but this necessitates further investigation.

## Materials and Methods

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

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

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

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

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

F1 5'-GAGTGACCACTCTCTCAGTCC-3'  
 R1 5'-AACACCGGTGACTACTGTGCTTTTCG-3'  
 F2 5'-GGGAGTGCAGCAGTATTCTTTGCC-3'  
 R2 5'-AAGGCACTGTCTCCACCAGTCCC-3'

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

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

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

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

**Crystallization and data collection.** Initial crystallization conditions were found by screening different precipitating agents. Different crystal forms were crystallized by the hanging drop vapor-diffusion method at 4°C using polyethylene glycol (PEG) 5000 MME as the crystallization agent. Crystallization trials were set up using equal volumes of protein (concentrated to 3 mg/ml) and reservoir. The best crystals were grown against a reservoir containing 25% PEG 5000 MME, 50 mM Bis Tris (Bis(2-hydroxyethyl) iminotris (hydroxymethyl) methane) buffer pH 6.2, 50 mM magnesium acetate and 3% 1,6-hexanediol. These crystals diffracted beyond 2.0 Å resolution at the European Synchrotron Radiation Facility ID14-1 beam line, and belong to the monoclinic space group P2<sub>1</sub>, with unit-cell parameters a = 63.8, b = 93.7, c = 70.4 Å, β = 114.9. A complete data set was obtained from a single crystal cooled to 140 K from 150 frames of 1° oscillation (wavelength of 0.934 Å, crystal-detector distance of 180 mm) using an ADSC Q4R CCD detector. The estimated V<sub>m</sub> of 2.3 Å<sup>3</sup>/Da indicates four molecules of TCTP in the asymmetric unit and corresponds to a solvent content of 47%, assuming a protein density of 1.22 g/cm<sup>3</sup>. Data were processed with the package HKL2000.<sup>35</sup>

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

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

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

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

BTB sequence:

MDGSQEQRGGGPTSSEQIMKTGALLQQFIQDRAGRMGGEAPELALDVPV  
 QDASTKKLS  
 ECLKRIGDELDSNMELQRMIAAVDTSPREVFFRVAADMFSDFGNFNTGKEYA  
 KKYIKDYM  
 KSIKGLLEEQRPERVKPFMTGAAEQIKHILRTGWIQDQGGWDGLLSYFGTPT  
 WQVTIVFV  
 AGVLTASLTIWKKMG\*

This BTB sequence corresponds to the following construction: BAX<sub>1–106</sub>, TG, TCTP<sub>85–126</sub>, RT, BAX<sub>150–192</sub>. The TCTP insert has been underlined in the BTB sequence above.

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

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

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

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

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

**Binding of TCTP to the mitochondria and cytochrome c oxidase assay.** Mitochondria were isolated<sup>28</sup> from normal rat liver using a mitochondria isolation kit (Sigma Aldrich). For mitochondrial targeting assays, [<sup>35</sup>S]Met-labeled proteins (GE Health Care) were synthesized from cDNAs using the TNT-coupled Transcription/Translation system (Promega, France). Radio-labeled Bax, TCTP, TCTP-EK, were incubated with isolated mitochondria (2.5 mg proteins/ml) at 30°C for 1 h in 40 μl of standard import buffer (250 mM sucrose, 80 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM malic acid, 8 mM succinic acid, 1 mM ATP-Mg<sup>2+</sup>, 20 mM MOPS, pH 7.5). Where indicated, <sup>35</sup>S-Bax was pre-incubated with radiolabeled TCTP or TCTP-EK for 30 min prior to incubation with mitochondria. The integrity of the outer membrane was assessed by measuring cytochrome c oxidase activity in mitochondrial membranes in the presence and absence of a detergent, *n*-dodecyl-D-maltoside, one of few detergents that allows the cytochrome c oxidase dimer to be maintained in solution at low detergent concentrations. The ratio between activity in the presence and absence of the detergent is a measure of the integrity of the mitochondrial outer membrane. The assay was performed using a cytochrome c oxidase assay kit (Sigma), according to the manufacturer's instructions. Alternatively, cytochrome c was detected in the supernatant of the mitochondria by western blot analysis using anti-cytochrome c antibodies.

**Anchorage assay of TCTP into the mitochondrial membrane.** Mitochondria were purified from rat liver by differential centrifugation. 125  $\mu$ g of freshly prepared mitochondria were incubated in the presence of 5–20 nM recombinant TCTP or TCTP-EK at 30°C for 10 min. Samples were washed and treated with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> followed by centrifugation at 100 000  $\times$  g for 1 h.<sup>29</sup>

**Bax dimerization assay.** Mitochondria preparation and incubation with TCTP (20 nM) or TCTP-EK (20 nM) were performed as above. Hereafter, recombinant tBid (5 nM) was added for 5 min at 30°C, followed by an incubation with recombinant Bax (10 nM) for 7 min at 30°C. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> treatment was performed as above followed by western blot analysis.

**Trypsin digestion assay.** 250  $\mu$ g of freshly prepared mitochondria were incubated in the presence of Bax (100 nM) and tBid (10 nM) for 10 min at 30°C and treated with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> as above. Samples were resuspended in 50  $\mu$ l KCl buffer and 10  $\mu$ g of trypsin was added. Digestion occurred for 2 h at 30°C and analyzed by western blot using the polyclonal rabbit antibody directed against the amino acids 43–61 of human Bax (Pharming) (Lucken-Ardjomande S, Montessuit S, and Martinou JC. *Cell Death Differ* (in press)). This antibody detects the undigested 15 kDa fragment of Bax dimers.

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

#### Competing interest statement

The authors declare that they have no competing financial interests.

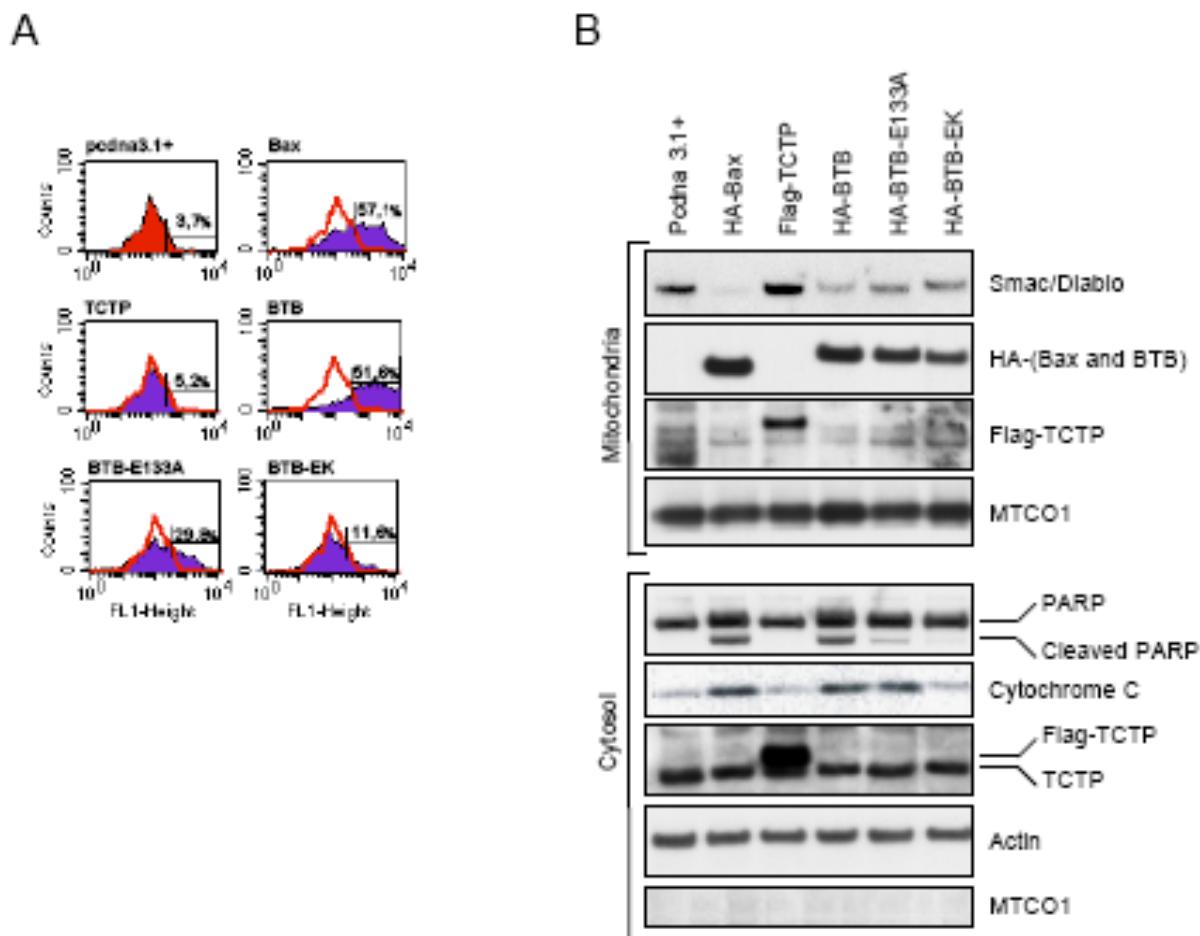
- Daniel NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; **116**: 205–219.
- Graidist P, Phongdara A, Fujise K. Antiapoptotic protein partners fortilin and MCL1 independently protect cells from 5-fluorouracil-induced cytotoxicity. *J Biol Chem* 2004; **279**: 40868–40875.
- Li F, Zhang D, Fujise K. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. *J Biol Chem* 2001; **276**: 47542–47549.
- Liu H, Peng HW, Cheng YS, Yuan HS, Yang-Yen HF. Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 3117–3126.
- Tuynder M, Susini L, Prieur S, Besse S, Fiucci G, Amson R *et al*. Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 14976–14981.
- Yang Y, Yang F, Xiong Z, Yan Y, Wang X, Nishino M *et al*. An N-terminal region of translationally controlled tumor protein is required for its antiapoptotic activity. *Oncogene* 2005; **24**: 4778–4788.
- Zhang D, Li F, Weidner D, Mnjoyan ZH, Fujise K. Physical and functional interaction between myeloid cell leukemia 1 protein (MCL1) and Fortilin. The potential role of MCL1 as a fortilin chaperone. *J Biol Chem* 2002; **277**: 37430–37438.
- Chitpatima ST, Makrides S, Bandyopadhyay R, Brawerman G. Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucleic Acids Res* 1988; **16**: 2350.
- Bommer UA, Lazaris-Karatzas A, De Benedetti A, Nurnberg P, Benndorf R, Bielka H *et al*. Translational regulation of the mammalian growth-related protein P23: involvement of eIF-4E. *Cell Mol Biol Res* 1994; **40**: 633–641.
- Yenofsky R, Cereghini S, Krowczynska A, Brawerman G. Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide. *Mol Cell Biol* 1983; **3**: 1197–1203.
- Norbeck J, Blomberg A. Two-dimensional electrophoretic separation of yeast proteins using a non-linear wide range (pH 3–10) immobilized pH gradient in the first dimension; reproducibility and evidence for isoelectric focusing of alkaline (pI > 7) proteins. *Yeast* 1997; **13**: 1519–1534.
- Hsu YC, Chem JJ, Cai Y, Liu M, Choi KW. Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. *Nature* 2007; **445**: 785–788.
- Gachet Y, Tournier S, Lee M, Lazaris-Karatzas A, Poulton T, Bommer UA. The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *J Cell Sci* 1999; **112** (Part 8): 1257–1271.
- Yarm FR. Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 6209–6221.
- MacDonald SM, Rafnar T, Langdon J, Lichtenstein LM. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science* 1995; **269**: 688–690.
- Tuynder M, Fiucci G, Prieur S, Lespagnol A, Geant A, Beaucourt S *et al*. Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 15364–15369.
- Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* 2004; **1644**: 83–94.
- Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 2000; **103**: 645–654.
- Fiucci G, Lespagnol A, Stumptner-Cuvelette P, Beaucourt S, Duflaut D, Susini L *et al*. Genomic organization and expression of mouse Tpt1 gene. *Genomics* 2003; **81**: 570–578.
- Thaw P, Baxter NJ, Hounslow AM, Price C, Waltho JP, Craven CJ. Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. *Nat Struct Biol* 2001; **8**: 701–704.
- Baxter NJ, Thaw P, Higgins LD, Sedelnikova SE, Bramley AL, Price C *et al*. Backbone NMR assignment of the 19 kDa translationally controlled tumor-associated protein p23fyp from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biomol NMR* 2000; **16**: 83–84.
- Lowther WT, Weissbach H, Etienne F, Brot N, Matthews BW. The mirrored methionine sulfoxide reductases of *Neisseria gonorrhoeae* pilB. *Nat Struct Biol* 2002; **9**: 348–352.
- Elkins P, Bunker A, Cramer WA, Stauffacher CV. A mechanism for toxin insertion into membranes is suggested by the crystal structure of the channel-forming domain of colicin E1. *Structure* 1997; **5**: 443–458.
- Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW *et al*. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 1997; **385**: 353–357.
- Muchmore SW, Sattler M, Liang H, Meadows RP, Harlan JE, Yoon HS *et al*. X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996; **381**: 335–341.
- Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M *et al*. Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 5113–5118.
- Matsuyama S, Schendel SL, Xie Z, Reed JC. Cytoprotection by Bcl-2 requires the pore-forming alpha5 and alpha6 helices. *J Biol Chem* 2005; **273**: 30995–31001.
- Cartron PF, Olivier H, Oliver L, Meflah K, Manon S, Vallette FM. Distinct domains control the addressing and the insertion of Bax into mitochondria. *J Biol Chem* 1998; **273**: 10587–10598.
- Eskes R, Desagher S, Antonsson B, Martinou JC. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 929–935.
- Amzallag N, Passer BJ, Allanic D, Segura E, Thery C, Goud B *et al*. TSAP6 facilitates the secretion of translationally controlled tumor protein/histamine-releasing factor via a nonclassical pathway. *J Biol Chem* 2004; **279**: 46104–46112.
- Amson RB, Nemani M, Roperch JP, Israeli D, Bougueleret L, Le Gall I *et al*. Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in p53-induced apoptosis: activation of the vertebrate homologue of the drosophila seven in absentia gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 3953–3957.
- Cans C, Passer BJ, Shalak V, Nancy-Portebois V, Crible V, Amzallag N *et al*. Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 13892–13897.
- Nuoffer C, Wu SK, Dascher C, Balch WE. Mss4 does not function as an exchange factor for Rab in endoplasmic reticulum to Golgi transport. *Mol Biol Cell* 1997; **8**: 1305–1316.
- Chen SH, Wu PS, Chou CH, Yan YT, Liu H, Weng SY *et al*. A knockout mouse approach reveals that TCTP functions as an essential factor for cell proliferation and survival in a tissue- or cell type-specific manner. *Mol Biol Cell* 2007; **18**: 2525–2532.
- Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol* 1997; **276**: 307–326.
- Collaborative Computational Project. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1994; **50**: 760–763.
- Brunger AT, Adams PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P, Grosse-Kunstleve RW *et al*. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1998; **54** (Part 5): 905–921.
- Kleywegt GJ, Jones TA. Efficient rebuilding of protein structures. *Acta Cryst* 1996; **D52**: 829–832.
- Laskowski RA, Mac Arthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structure. *J Appl Crystallogr* 1993; **26**: 283–291.
- Wodak SJ, Pontius J, Vaguine A, Richelle J. *Validating Protein Structures. From Consistency Checking to Quality Assessment*. SERC Daresbury Laboratory: Warrington, UK, 1995.

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

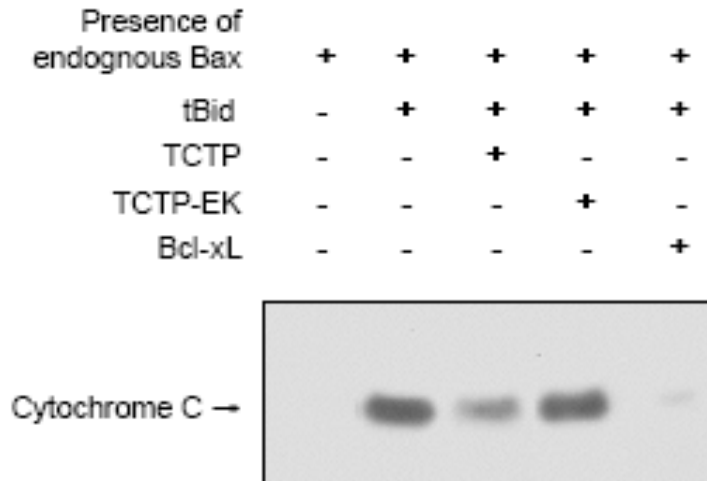


**G-III-1-1. Figures et Tables supplémentaires**

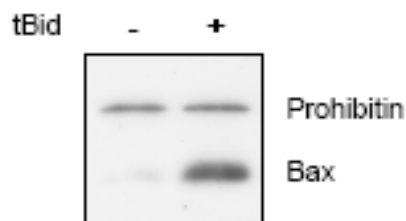
Présentées sur le site internet de Cell Death and Differentiation



**Suppl. Fig 1 : Effects of the chimeric protein BTB on apoptosis..** **A.** TUNEL analysis of 293T cells transfected with Bax, TCTP, BTB or BTB mutants. **B.** Western blot analysis of 293T cell extracts following induction of apoptosis by Bax, BTB or BTB mutants. Actin was used to evaluate equal loading and MTCO1 as a marker of fractionation between mitochondria and the cytosol.



**Suppl. Fig 2: Effect of TCTP and TCTP EK on the Cytochrome C release from mitochondria:** Western blot analysis of Cytochrome C on the supernatant of mitochondria (250  $\mu$ g) purified from HeLa cells. Activation of endogenous Bax was obtained by tBid. Incubation was performed in the absence (-) or presence (+) of t-Bid (10 nM) and in the absence (-) or presence (+) of TCTP (1  $\mu$ M) or TCTP EK (1  $\mu$ M). BclxL (1  $\mu$ M) is used as a positive control for inhibition of apoptosis.



**Suppl. Fig 3: Bax activated by tBid anchors into the mitochondrial membranes:** Western blot analysis of Bax and Prohibitin. Purified rat liver mitochondria (100  $\mu$ g) were incubated with Bax (100 nM), in the absence (-) or presence (+) of tBid (10 nM), washed and treated with  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Endogenous Prohibitin was used as control for equal loading of mitochondria.

Suppl. Table 1

Stage	No. of Litters	Total No.	+/+	+/-	-/-	-/- (%)	Abnormal	Abnormal (%)
E 6.5	2	12	ND	ND	ND		2	17
E 8.5	3	18	ND	ND	ND		5	28
E 9.5	2	11	3	5	3	27	3	27
F2	14	99	29	70	0	0	0	0

ND: Not Determined

Suppl. Table 2

Table 1 Data collection and refinement statistics

	Crystal 1 name
<b>Data collection</b>	
Space group	P2 <sub>1</sub>
Cell dimensions	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	63.8, 93.7, 70.4Å
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90., 114.9, 90.
Resolution (Å)	2.0
<i>R</i> <sub>merge</sub> (%)	4.0 (15.4)
<i>I</i> / <i>σI</i>	24.5 (7.2)
Completeness (%)	98.3 (98.3)
Redundancy	2.8 (2.6)
<b>Refinement</b>	
Resolution (Å)	25-2.0
No. reflections	49288
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub>	0.191 / 0.238
No. atoms	
Protein	4778
Water	508
<i>B</i> -factors (Å <sup>2</sup> )	
Protein	29.0
Water	38.0
R.m.s deviations	
Bond lengths (Å)	0.008
Bond angles (°)	1.4

<sup>1</sup> The values for the highest resolution shell are given in parentheses.

## **H - TCTP, une nouvelle cible thérapeutique**

Tuynder M, Fiucci G, Prieur S, Lespagnol A, Geant A, Beaucourt S, Duflaut D, Besse S, Susini L, Cavarelli J, Moras D, Amson R, Telerman A. **Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion.** PNAS 2004 Oct 26; 101 (43):15364-9

### **H - I - Des antihistaminiques à la sertraline et la thioridazine**

Dans la même lignée des exemples de nouvelles molécules présentées dans le chapitre traitements des cancers, TCTP a été identifié comme une cible potentielle thérapeutique anticancéreuse. Les analyses d'expression différentielle ont montré que l'expression TCTP est fortement diminuée dans la majorité des cellules révertantes par rapport aux cellules cancéreuses correspondantes (Tuynder et al., 2002). De plus, la diminution de l'expression de TCTP par des expériences d'ARN interférences (siRNA) et d'ANDc anti-sens, induit l'apoptose et la réversion tumorale. Au vu des caractéristiques remarquables de TCTP, notre laboratoire a initié le projet de formuler des molécules ciblant spécifiquement TCTP dans le but de traitements anticancéreux.

#### **H - I - 1. Corrélation entre l'effet cytotoxique de molécules et l'expression de TCTP**

TCTP est connu pour être un facteur de libération de l'histamine (HRF), l'hypothèse d'approche émise par notre équipe est que l'utilisation de molécules inhibitrices de la voie de l'histamine pourrait inhiber la fonction HRF de TCTP et par cette manière avoir un effet anticancéreux. Dans l'article de Tuynder (Tuynder et al., 2004), nous montrons que des molécules antihistaminiques (hydroxyzine et prométhazine) et d'autres molécules ayant une homologie de structure (thoridazine : neuroleptique et sertraline : antidépresseur) ont un effet cytotoxique sur les cellules humaines de leucémie U937. L'effet cytotoxique de ces drogues s'accompagne d'une diminution du taux de TCTP dans les cellules. De plus, ces molécules réduisent la croissance des tumeurs implantées dans des souris scid/scid. Ces résultats suggèrent que ces drogues ont un effet anticancéreux par la réduction directe ou indirecte du niveau intracellulaire de TCTP.

TCTP apparaît donc comme une cible thérapeutique de la réversion tumorale. A la suite de ces résultats prometteurs, des essais cliniques en phase I/II initiés par MEL et finalisés par

CEREP, ont été réalisés avec une de ces molécules CER227185 sur des patients réfractaires ou en rechute atteints de leucémie myéloblastique aigue (LMA). Ces essais cliniques ont montré que 5 patients sur 16 ont connu un allongement significatif de leur temps de vie, soit de 250 jours à presque 1 an, lorsqu'une population de malades atteints de LMA au stade de rechute ou réfractaire à d'autres traitements, a une durée de vie moyenne de 90j. L'analyse des cellules sanguines de ces patients traités par CER227185 montre une diminution du taux de TCTP intracellulaire (résultats non publiés). Ces essais confortent la stratégie thérapeutique anticancéreuse par induction de la réversion tumorale. Toutefois, ils ne seront pas poursuivis à cause des effets secondaires dus à l'indication thérapeutique originale de cette molécule.

### **H - I - 2 . Mécanisme d'action de la sertraline et de la thioridazine**

Les études qui ont suivi afin de découvrir un inhibiteur de TCTP sont réalisées avec les molécules de thioridazine et sertraline car elles montrent la meilleure cytotoxicité avec la plus forte baisse de TCTP et un effet anti-tumorale chez les souris, le tout avec les concentrations les plus basses (Tuynder et al., 2004). Il reste malgré tout à comprendre le mécanisme d'action de ces molécules pour faciliter le développement de nouvelles drogues en se basant sur leur structure moléculaire.

La première étape fut de contrôler que ces deux molécules se lient directement à TCTP. Cela a été vérifié par la technique de BIAcore et par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) (Fig 26). Les coefficients de dissociation obtenus sont les suivants : Kd de 125 $\mu$ M pour la sertraline et un Kd de 59 $\mu$ M pour la thioridazine, les drogues ont une affinité relativement faible pour TCTP, ce qui n'empêche pas une efficacité importante (Tuynder et al., 2004). L'analyse au Biacore, nous a aussi permis de vérifier que la stochiométrie est d'une molécule de drogue pour une molécule de TCTP, qui présage d'un site unique de liaison aux drogues et non une fixation aspécifique. Des tests d'interaction *in vitro* avec les molécules marquées au tritium incubées avec de la protéine recombinante, font apparaître après migration des échantillons sur un gel de polyacrylamide sans agent réducteur des ponts disulfure, des formes de plus haut poids moléculaire supérieur à 38kDa ressemblant à une échelle et une forme de taille 18 kDa inférieure à la protéine native qui migre à 20kDa dans nos conditions expérimentales (Fig 27). L'apparition de l'échelle suggère que les drogues induisent l'agrégation ou l'oligomérisation de TCTP. La forme de TCTP migrant à 18kDa

indique un changement de conformation de la protéine. Ni l'ajout de sel sous forme de NaCl ni l'ajout de calcium ne modifie le profil de migration obtenu. On émet l'hypothèse que le changement de conformation implique des interactions intramoléculaires suffisamment stables pour ne pas être perturbées par la présence de sel et que le site de liaison aux drogues est différent du site de liaison au calcium. A moins que ce soit la fixation des drogues qui modifie la conformation du site de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  qui l'empêcherait de s'y loger.

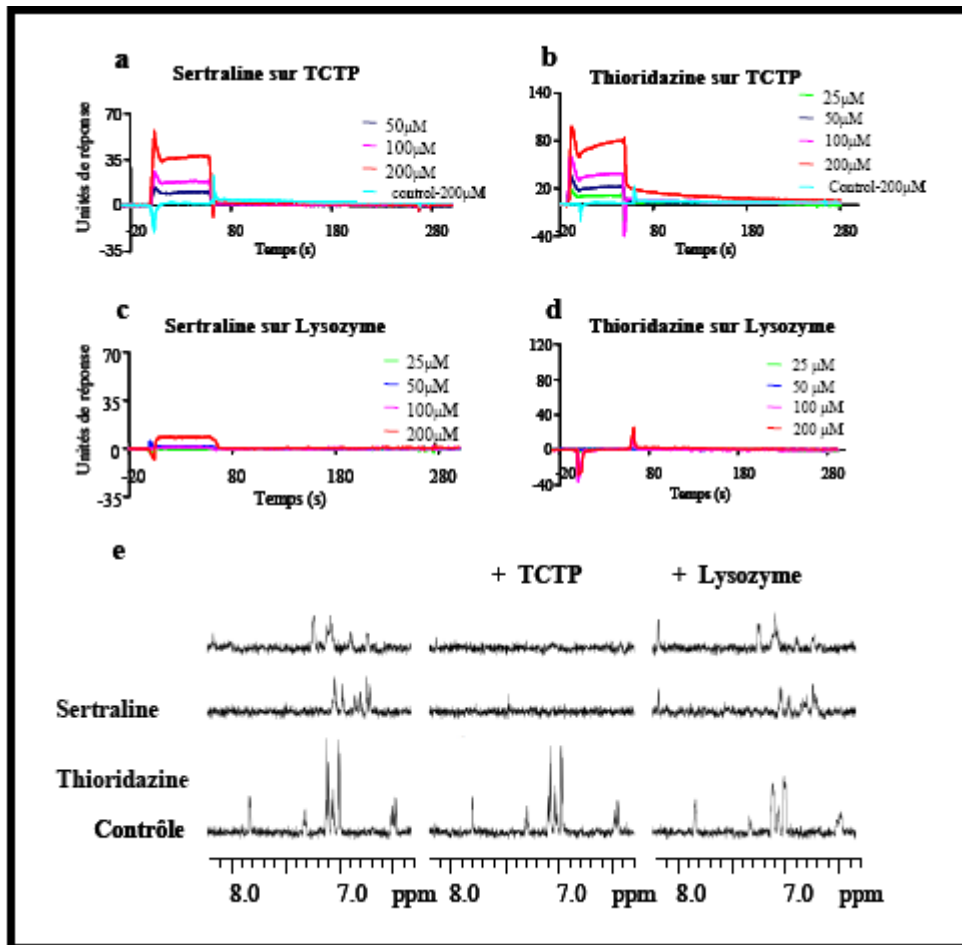


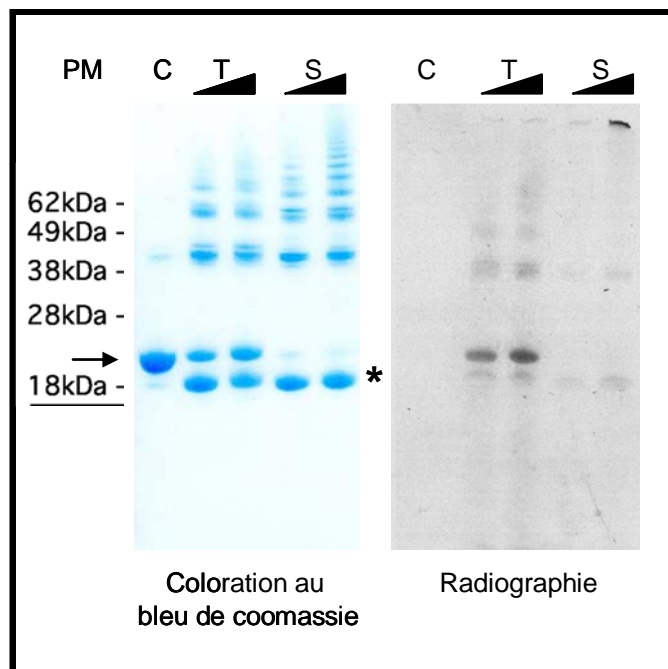
Fig 26. Liaison directe entre les drogues, thioridazine et sertraline, sur TCTP.

a-d analyse de l'interaction entre drogue et TCTP par Biacore. Les protéines TCTP (a, b) et lysosyme (c, d) sont covalamment fixées sur les sensor chips. Le lysosyme est utilisé comme témoin négatif de l'interaction et l'histamine est utilisée en contrôle. Différentes concentrations de drogues 50 à 200  $\mu\text{M}$  pour la sertraline (a, c) et de 25 à 200  $\mu\text{M}$  pour la thioridazine (b, d), sont passées sur les sensor chips, en présence de 40mM de NaCl. a, b : la sertraline et la thioridazine se lient sur TCTP de manière dépendante de la concentration injectée. c, d : les drogues ne se lient pas au contrôle lysozyme. e : analyse de l'interaction des drogues sur TCTP par RMN. En présence de 100  $\mu\text{M}$  de TCTP, les spectres de la sertraline et la thioridazine

disparaissent ce qui n'est pas le cas en présence de la même quantité de lysozyme. Ceci témoigne de la fixation des drogues sur TCTP et non sur notre protéine témoin le lysozyme. L'histamine est utilisée en contrôle. Méthodes détaillées dans le chapitre matériels et méthodes.

**Fig 27.Effet des drogues sur la structure de TCTP.**

10 $\mu$ M de TCTP humain recombinant est incubé avec 1 ou 2 $\mu$ l équivalent à 33 et 66  $\mu$ M de drogues, avec 100 $\mu$ Ci/ $\mu$ l pour thioridazine (T), et 74  $\mu$ Ci/ $\mu$ l pour sertraline (S), soit avec du dmsO (C) à 37°C pendant 24h dans un tampon Tris 50mM pH7,5. Les drogues sont marquées au tritium (Amesharm). Chaque incubation est déposée et migre dans un gel de polyacrylamide non réducteur (sans DTT). Le gel obtenu est coloré au bleu de coomassie puis séché, il est exposé sur un film photosensible pour obtenir une radiographie. La coloration en bleu de coomassie montre la migration normale de TCTP à 20kDa, indiquée par une flèche ; une forme de poids inférieure à 18kDa, indiquée par une étoile et des formes de tailles plus grandes formant comme une échelle de plus haut poids moléculaire (PM) de 40kDa et au-delà. Il est remarquable que l'incubation avec la sertraline fait quasiment disparaître la forme native (20kDa) de TCTP. La forme de 18kDa suggère que les drogues induisent un changement de conformation de TCTP et l'échelle laisse supposer que TCTP est oligomérisé. La radiographie nous montre que la forme native (20kDa) de TCTP est marquée par la radioactivité de la thioridazine ce qui indique clairement la fixation de la molécule.



Reste à savoir comment se fait la réduction du niveau de TCTP dans la cellule. Nous avons testé la voie de dégradation des protéines par le protéasome en utilisant des inhibiteurs tels que la l-lactacystine et le MG132, sans résultats positifs. On constate que le niveau de sécrétion de TCTP dans le surnageant de culture de différents types cellulaires est augmenté après incubation avec la sertraline ou la thioridazine, (voir en exemple les cellules MEFs (Fig 28 b)). Contrairement à ce qu'on aurait pu supposer, ni la quantité d'exosomes sécrétés ni la concentration de TCTP dans ces exosomes ne sont augmentées en présences de ces drogues, ces expériences ont été réalisées avec des MEFs (Fig 28 c). Notons toutefois, que lorsque le niveau de TCTP est diminué dans le lysat total, l'expression de TSAP6 est augmentée (Fig 28 a). Par des analyses au BIAcore, on confirme l'interaction entre TCTP et TSAP6 (Fig 29 a, b), la constante de formation du complexe est de l'ordre de  $1\mu\text{M}$  et cette liaison est inhibée par la présence de thioridazine ou de sertraline (Fig 29 c), sans interagir directement avec TSAP6 (Fig 29 d). La thioridazine a un effet plus important que la sertraline.



**Fig 28. Sécrétion de TCTP sous l'influence des drogues par les cellules MEFs.**

3.10<sup>6</sup> cellules sont mises en culture la veille du traitement. A 60% de confluence, le tapis cellulaire est rincé en PBS. Puis les cellules sont incubées 24h avec la sertraline (S) ou la thioridazine (T) et sont ensuite récoltées et lysées pour extraire la totalité des protéines sous forme de lysat total (LT). L'analyse par western blot montre une diminution du niveau de TCTP et une augmentation du niveau de TSAP6 dans le lysat des cellules incubées avec les drogues. Le contrôle négatif est le solvant des drogues (dms0) à concentration égale à celle utilisée pour chacune des molécules. b : les cellules sont incubés durant 3h dans un milieu de culture sans sérum avec les molécules et leurs surnageants de culture sont récupérés et centrifugés à 2000rpm pour les débarrasser de tous débris cellulaires puis concentrés sur des membranes calibrées à 5kDa (ne laisse passer que les protéines de poids inférieure à 5kDa). L'analyse par western blot de ces surnageant montre une augmentation de la sécrétion de TCTP en présence des drogues. L'immunoblot avec l'anticorps anti-GP96, qui est une protéine du réticulum endoplasmique (Wolfers et al., 2001) permet de vérifier l'absence de contaminations d'origine cytosolique. L'alpha-1 anti-trypsin est une protéine constitutivement sécrétée (Hafeez et al., 1992) et sa détection permet de vérifier l'équilibre des dépôts. c : 5µg d'exosomes produits par les cellules incubées 24h avec les drogues ne montrent pas de variation pour le taux de TCTP, de même pour TSAP6. L'immunoblot de la flotillin-1 permet de vérifier l'équilibre des dépôts. Méthode de purification des exosomes décrite dans l'article Lespagnol et al. soumis à publication.

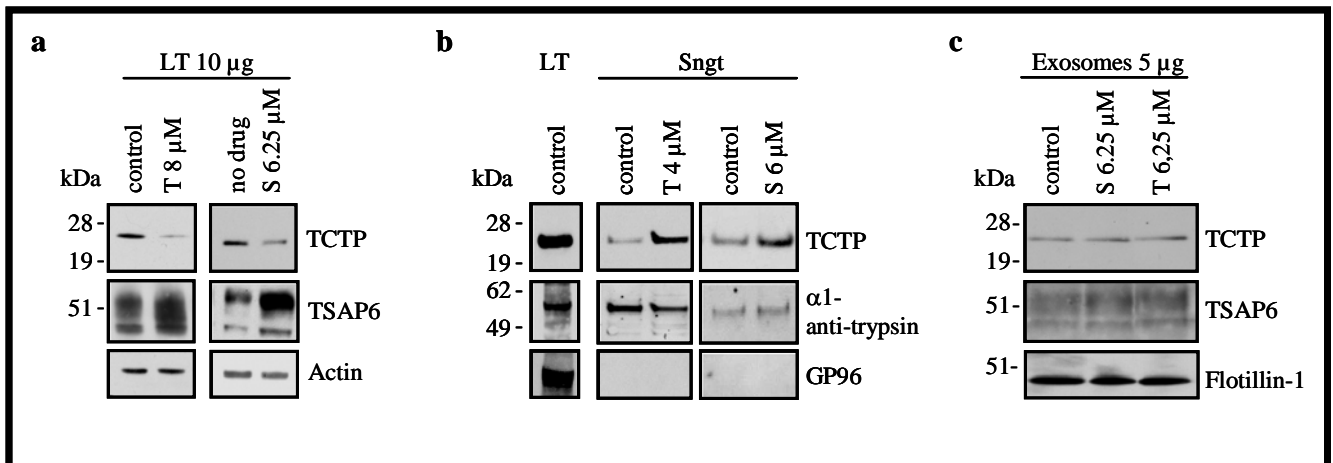
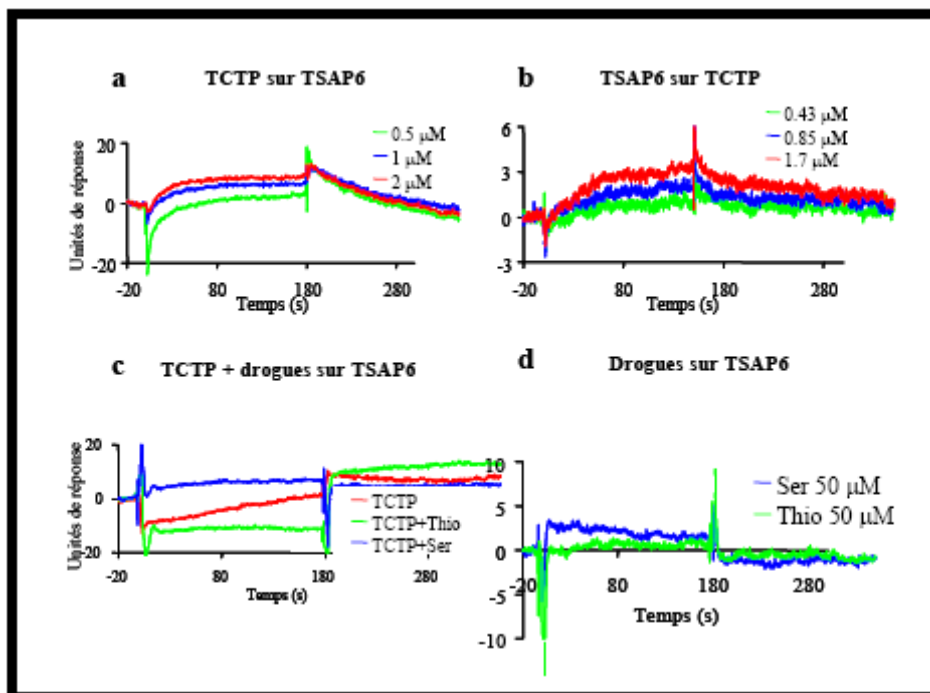


Fig 29.Effet des drogues, sertraline et thioridazine, sur l'interaction TCTP-TSAP6.

a, b : observation de l'interaction entre TCTP et TSAP6, en a TSAP6 est immobilisé sur les sensor chips, en b TCTP est immobilisé sur les sensor chips. La première partie de la courbe en arc de cercle jusqu'à 180sec montre l'association entre les deux protéines qui varie avec la quantité croissante injectée (vert 0,5 $\mu$ M, bleu 1 $\mu$ M, rouge 2 $\mu$ M) et la seconde partie montre la phase de dissociation. c : 1 $\mu$ M de TCTP est pré-incubé avec 50 $\mu$ M de thioridazine (vert) ou sertraline (bleu). L'ajout des drogues empêche la liaison entre TCTP et TSAP6, les courbes correspondantes sont planes. d : la même concentration de drogues est passée sur TSAP6, et ne montre aucune interaction entre les molécules et TSAP6. Méthode dans le chapitre correspondant.



**H - II - Article III: Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion.**

Tuynder M, Fiucci G, Prieur S, Lespagnol A, Geant A, Beaucourt S, Duflaut D, Besse S, Susini L, Cavarelli J, Moras D, Amson R, Telerman A

PNAS 2004 Oct 26;101(43):15364-9

# Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion

Marcel Tuynder\*, Giusy Fiucci\*, Sylvie Prieur\*, Alexandra Lespagnol\*, Anne Géant\*, Séverine Beaucourt\*, Dominique Duflaut\*, Stéphanie Besse\*, Laurent Susini\*, Jean Cavarelli†, Dino Moras†, Robert Amson\*\*‡, and Adam Telerman\*\*§

\*Molecular Engines Laboratories, 20 Rue Bouvier, 75011 Paris, France; and †Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 1 Rue Laurent Fries, 67404 Illkirch Cedex, France

Communicated by Georges Charpak, European Organization for Nuclear Research, Geneva, Switzerland, September 10, 2004 (received for review June 22, 2004)

By analyzing the gene expression profile between tumor cells and revertant counterparts that have a suppressed malignant phenotype, we previously reported a significant down-regulation of translationally controlled tumor protein (TCTP) in the revertants. In the present study, we derived, by using the H1 parvovirus as a selective agent, revertants from three major solid cancers: colon, lung, and melanoma cell lines. These cells have a strongly suppressed malignant phenotype both *in vitro* and *in vivo*. The level of TCTP is decreased in most of the revertants. To verify whether inhibition of TCTP expression induces changes in the malignant phenotype, in the classical, well established model of "flat reversion," v-src-transformed NIH3T3 cells were transfected with anti-sense TCTP. By inhibiting the expression of TCTP, the number of revertant cells was raised to 30%, instead of the reported rate for spontaneous flat revertants of  $10^{-6}$ . Because TCTP encodes for a histamine-releasing factor, we tested the hypothesis that inhibitors of the histaminic pathway could be effective against tumor cells. We show that some antihistaminic compounds (hydroxyzine and promethazine) and other pharmacological compounds with a related structure (including thioridazine and sertraline) kill tumor cells and significantly decrease the level of TCTP. All together, these data suggest that, with tumor reversion used as a working model, TCTP was identified as a target and drugs were selected that decrease its expression and kill tumor cells.

A "target" in cancer can be defined as a protein whose expression or biological function is different between normal and tumor cells. Such a modification will be harmful to the normal cell, leading to transformation, and thus targeting it and changing its activity could lead to the suppression and/or reversion of the malignancy.

The general approach used so far to identify such target proteins was to analyze the difference between normal and cancer cells, thus answering the question of how a normal cell becomes malignant. We have suggested a different approach, namely to analyze what causes a malignant cell to revert (1–4). One of the advantages of such a strategy is that the revertant cell has acquired the molecular knowledge of how to escape malignancy. We suggested that in such revertant cells the molecular mechanisms to override cancer are present (1–4). The understanding of how this reversion happens may lead to the identification of targets that were not disclosed by comparing normal and tumor cells.

The premises of tumor reversion were discovered in the mid-1960s, when investigators established a cell line of normal mouse fibroblasts, NIH3T3, and the first studies pointed toward a sensitivity to contact inhibition in culture. This sensitivity was caused by a reversible arrest of growth in  $G_1$  (5). After infecting this cell line with polyoma virus, or simian virus 40 (SV40), there was a loss of sensitivity to contact inhibition, and the NIH3T3 grew in clusters and multilayers. In 1968, Pollack, Green, and Todaro (6) described for the first time the selection of sublines of NIH3T3 infected with polyoma or SV40 that had regained an increased sensitivity to contact inhibition and, most importantly,

a decreased tumor-producing ability. They called these cells "revertants." Later studies led to the discovery of K-rev, a 21-kDa protein with revertant-inducing activity on Kirsten sarcoma virus-transformed NIH3T3 cells (7, 8). These experiments focused at obtaining revertants by interfering specifically with a single oncogene-induced tumor. In contrast, our studies in which revertants were derived from human tumor cell lines originating from patients' material harboring the full range of abnormalities present in the tumor cell provide a more comprehensive approach of tumor reversion.

We have previously described translationally controlled tumor protein (TCTP) as a gene down-regulated in tumor reversion (4). It was initially identified (9) as one of four mRNA that occur predominantly as untranslated, partially suppressed messenger ribonucleoprotein particles in mouse sarcoma ascites cells and further characterized as p23/p21 (10, 11). TCTP is a house-keeping gene expressed in several nontumoral cells, including erythrocytes (12). The first overexpression experiments in the analysis of TCTP showed its binding to tubulin (13, 14).

Besides these intracellular functions for TCTP, this molecule has been identified as a histamine-releasing factor (HRF) (15). More recently, the solution structure of TCTP suggests a strong homology with Mss4, a chaperone binding GDP/GTP free G protein (16). TCTP also interacts with TSAP6, translation elongation factor eEF1A, and its guanine nucleotide exchange factor eEF1B- $\beta$  (17–19).

In the present study we extend the analysis of reversion to some of the major cancers. We further demonstrate that down-regulation of TCTP can, by itself, induce tumor reversion, and we describe drugs that decrease the level of TCTP and kill tumor cells.

## Materials and Methods

**Revertant Cells.** The tumor cells lines DLD-1, A549, WM115 and 266-4, SK-MEL28, and Hs852T were obtained from the American Type Culture Collection. For the isolation of revertants we applied the same technology as described (4). Different concentrations of H1 parvovirus were used to infect tumor cells with a multiplicity of infection of 10–1,000 plaque-forming units per cell. Surviving colonies were isolated by using collagenase/dispase (Roche Diagnostics). Growth of isolated colonies and parental tumor cell lines was tested in soft agar (agar-noble, Difco). A total of  $10^7$  cells per site were injected in *scid/scid* mice for *in vivo* tumorigenicity tests, and statistical analysis on the growth was performed as described (3). H1 parvovirus DNA was

Freely available online through the PNAS open access option.

Abbreviations: TCTP, translationally controlled tumor protein; HRF, histamine-releasing factor.

\*R.A. and A.T. contributed equally to this work.

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

© 2004 by The National Academy of Sciences of the USA

amplified by using the following primers: 5'-CTAGCAACTCT-GCTGAAGGAACTC-3' and 5'-TAGTGATGCTGTTGCTG-TATCTGATG-3'.

**Antibodies.** For Western blot analysis the following antibodies were used: antihistamine-releasing factor (TCTP) (Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japan) and antiactin (Santa Cruz Biotechnology). For immunofluorescence analysis, phalloidin-FITC (Sigma), anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma), anti-mouse CY3, and 4',6-diamidino-2-phenylindole were used. Anti-H1-parvovirus virions antibodies were generated in rabbits by injecting  $5 \times 10^9$  plaque-forming units per cell per rabbit of UV-inactivated H1 parvovirus (Agro-Bio, La Ferté St. Aubin, France).

**Flat Revertant Cells.** NIH3T3 cells were transformed with v-src. Foci were isolated and maintained in culture for 4 weeks before the isolation of flat revertants. The antisense TCTP was generated by cloning the cDNA corresponding to the coding region of tpt1/TCTP 3'-5' in pBK-RSV (Stratagene). Transfection of v-src-transformed NIH3T3 cells with antisense TCTP was performed by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), clones were selected with G418 (600  $\mu$ g/ml), and further subclones were isolated.

**Pharmacological Compounds.** All pharmacological compounds were purchased from Sigma, except sertraline and paroxetine, which were purchased from Sequoia Research Products (Oxford, U.K.) and Apin Chemicals (Oxon, U.K.), respectively.

**Cell Viability Assays.** The cytotoxicity of the pharmacological compounds was measured on U937 cells by treating the cells for 6 days with various concentrations of the compounds. ATP level was measured by a luminescent cell viability assay. Celltiter-glo (Promega) was used following the manufacturer's instructions and read on a Victor2 plate reader (PerkinElmer).

**In Vivo Evaluation of Antitumor Effect of Pharmacological Compounds.** Subcutaneous tumors from MDA-MB231 and U937 cells were induced by injecting  $10^7$  cells into the right flank of *scid/scid* mice. Treatment (promethazine at 22.5 mg/kg, sertraline at 18.0 mg/kg, and thioridazine at 6.75 mg/kg) started 2 days before the injection of the tumor cells in the early-stage protocol, or when tumors reached a palpable volume (4 mm<sup>3</sup>) for late-stage treatment. For U937-derived tumors, mice were treated once a day with an i.p. injection over a period of 28 days and monitored over a period up to 80 days. For the MDA-MB231 tumor-bearing animals the same treatment lasted 60 days, and they were monitored for 80 days.

## Results

**Identification of Revertants from Colon, Lung, and Melanoma Cancer Cell Lines.** Our previous conclusion on revertants was based on cells derived from two leukemia cell lines (K562 and U937) and three breast cancer cell lines (BT20, T47D, and MDA-MB231). To consolidate the concept of tumor reversion it was important to have other models of reversion, especially for solid tumors. We then derived revertants from colon, lung, and melanoma tumor cells. DLD-1 is a colorectal adenocarcinoma cell line, A549 is a lung carcinoma cell line, and WM-266-4, WM-115, SK-MEL-28, and Hs852T are melanoma cell lines.

To obtain these revertants, we used the approach as described (1, 2, 4): the tumor cells were infected with H1 parvovirus that kills preferentially the malignant cells (20, 21), while sparing their normal counterparts and cells that are resistant to the cytopathic effect of the virus. Resistant clones were isolated, and their phenotype was assessed by measuring anchorage depen-

dence in a soft agar assay (Fig. 1A) and their tumorigenicity in *scid/scid* mice (Fig. 1B).

The colon cancer cells DLD-1 form a large number of colonies in soft agar, whereas the two revertant clones, CL-4 and CL-16, display anchorage dependence and hardly grew under the same conditions (Fig. 1A). *In vivo* tumorigenicity in *scid/scid* mice showed a three-time reduced tumor volume at the end of the study compared with the parental cell line. The two revertants from the lung carcinoma A549 were isolated; CL-46 showed strong anchorage dependence in soft agar (Fig. 1A) and strongly reduced growth in *scid/scid* mice (Fig. 1B). The other revertant, CL-1, did not grow at all under the same conditions (Fig. 1A).

These CL-1 cells totally reverted, showing a complete suppression of their malignant growth. Four melanoma cell lines were used. WM-115 and WM-266-4 both were derived from the same patient; WM-115 was from the primary tumor and WM-266-4 was from a metastasis. SK-MEL-28 and Hs852T were the other melanoma cell lines. All four melanomas were highly susceptible to the killing effect of the H1 parvovirus. We show the reduced tumorigenicity of the revertant clone obtained from WM-266-4 (Fig. 1A and B).

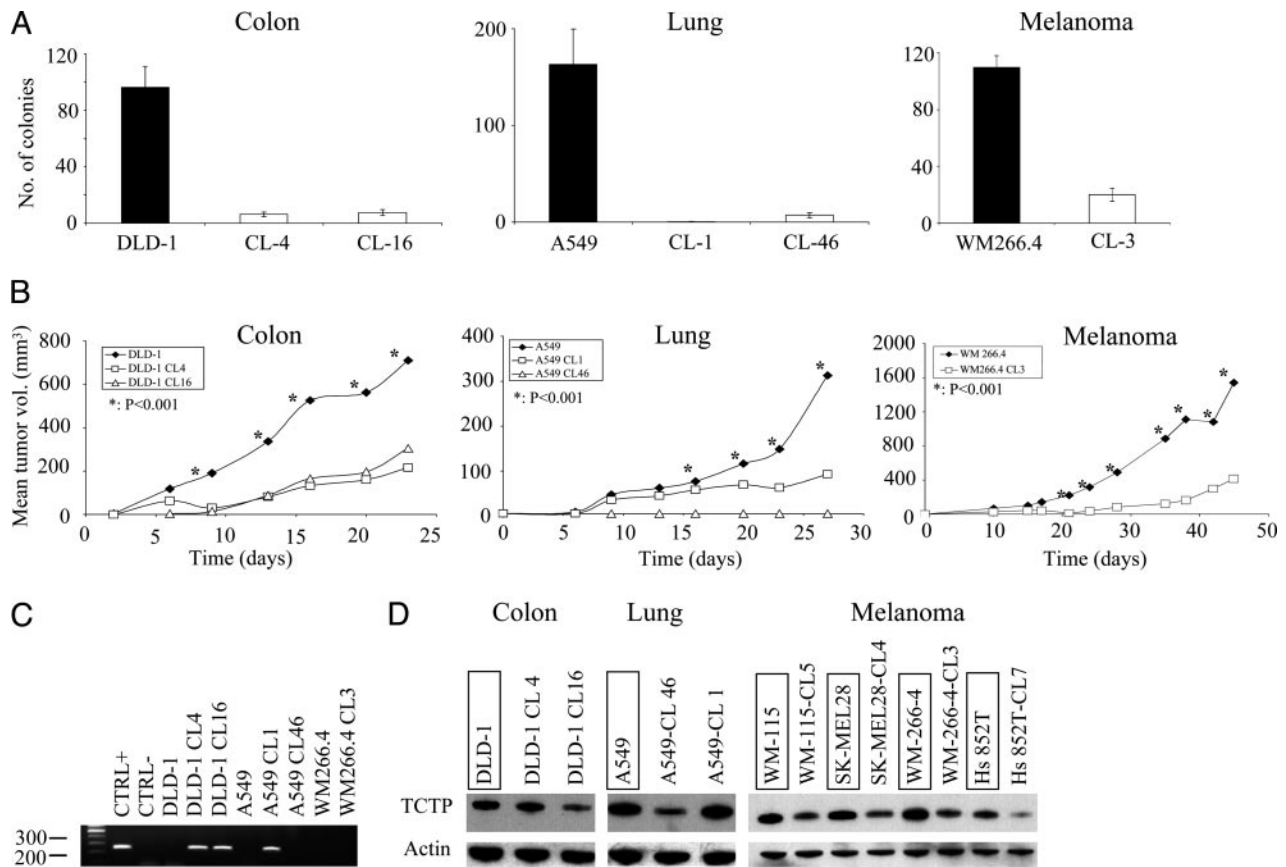
## Persistent Infection and Expression of H1 Parvovirus Is Not Necessary for Maintaining the Suppressed Malignant Phenotype.

An important question to answer was whether the suppressed malignant phenotype in the revertants is caused by continuous production of the H1 parvovirus. Our previous experiments indicated that both revertants derived from the leukemia cell lines (K562 and U937) continue to be H1 parvovirus-positive for years after the initial infection (1, 2). For the breast cancer cell lines, the revertants derived from BT20 and T47D do not produce any virus at all anymore, whereas the revertants derived from MDA-MB231 continue to produce parvovirus (4). These results suggested that persistent H1 parvovirus infection is not necessary for maintaining the suppressed malignant phenotype in all of the revertants. The PCR analysis shows that both revertants of DLD-1, one of the two revertants from A549, and none of the melanoma revertants are H1-positive (Fig. 1C). The tumor cells DLD-1, A549, and WM-266-4 and their isolated revertants were thus analyzed for the presence of H1 virions by fluorescence-activated cell sorting (Fig. 4A, which is published as supporting information on the PNAS web site). Low amounts of the revertant cells from DLD-1 and A549 tumor cells stained positive for H1 viral particles, suggesting that only a small percentage of these revertants produces infectious virus. Interesting to note is that the DLD-1 revertant CL-16 produces infectious virus capable of replicating in SV40-transformed newborn human kidney cells, but cannot induce plaque formation on the same indicator cells. Conversely, the DLD-1 revertant CL-4 harbors a host range mutant of the virus that lost its ability to induce lysis of the indicator cell line NBE (Fig. 4B).

The limiting dilution assay of A549 parental and revertant clone CL-1 shows that 32% of the revertant cells produce infectious H1 particles (Fig. 4B). The melanoma revertant WM266-4-C14 was found to be negative in fluorescence-activated cell sorting analysis for viral particles (Fig. 4A) and for producing infectious virus (Fig. 4B).

These data confirm that the virus by itself is not sufficient for maintaining the suppressed malignant phenotype.

**TCTP Expression in the Revertant Cells.** In the study of reversion, we observed that the gene that is the most strongly down-regulated is TCTP, and we partially correlated the process of reversion to inhibition of TCTP expression (4). We found that decreasing TCTP by antisense cDNA in U937 cells promotes apoptosis, whereas knocking down its expression in breast carcinoma cell lines induces a reorganization by forming ductal/acinar structures similar to those structures described by Bissell's group (22).



**Fig. 1.** Tumor revertants for colon, lung, and melanoma cell lines. (A) *In vitro*, soft agar growth for colon (DLD-1), lung (A549), melanoma (WM266.4), and corresponding revertants reported as number of colonies. (B) *In vivo* tumorigenicity after injection of  $10^7$  tumor or revertant cells, measured as mean tumor volume. (C) PCR analysis to detect the presence of H1 parvovirus. (D) Western blot analysis for TCTP expression in tumor (control cell lines are boxed) and revertant cells. Actin is used as loading control.

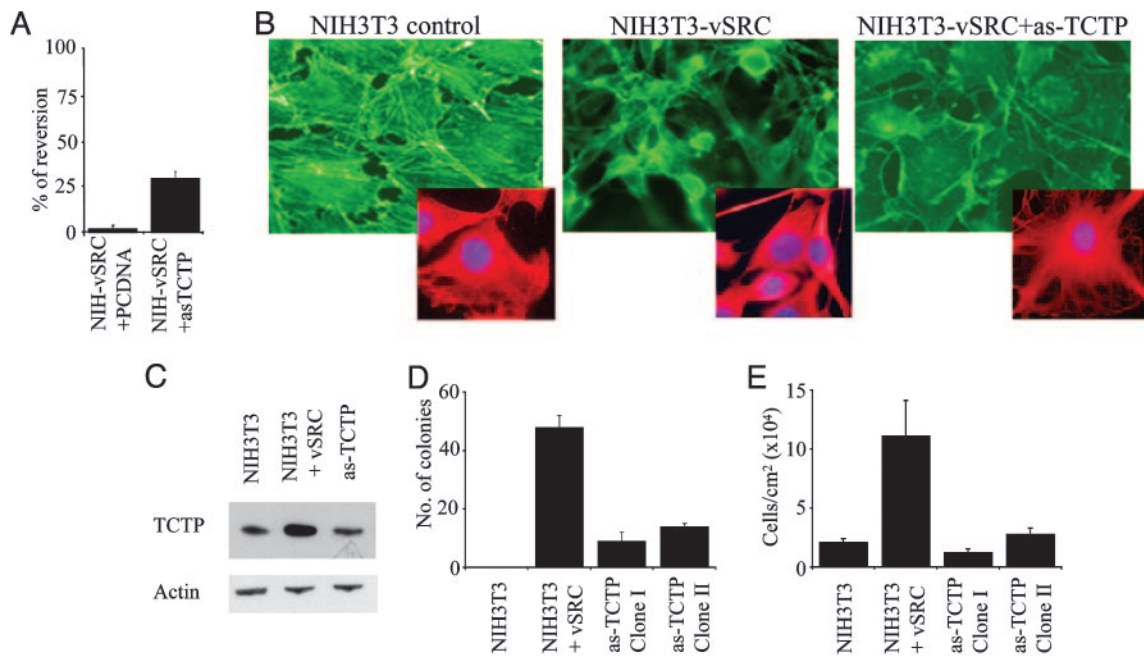
In the present study, we checked the level of TCTP expression. In one of the two colon revertant models (DLD-1 CL-16), one of the lung (A549 CL-46) revertant models, and all of the melanoma revertant models, the level of the protein is significantly reduced (Fig. 1D). These results, taken together with the previous data (4) obtained from revertants, suggest that in the majority of cases there is a down-regulation of TCTP expression during the process of tumor reversion.

**Induction of Flat Revertants in v-src-Transformed NIH3T3 by Inhibition of TCTP Expression.** To position our data on TCTP and its role in reversion into the classical framework of “flat reversion” carried out in the late 1960s, we investigated how v-src-induced transformation could be influenced by the level of expression of TCTP. The transformation of NIH3T3 by v-src induces foci formation on cell monolayer and colony formation in soft agar. The flat revertant cells are generally defined as a variant of a malignant cell in which the characteristic high-saturation density and piled-up morphology have reverted to the flatter morphology associated with nontransformed cells.

Of relevance is the fact that in NIH3T3 transformed by v-src, the expression of TCTP is highly increased and the use of a TCTP antisense cDNA, although reducing the TCTP expression, strongly increases the percentage of reversion up to 30% (Fig. 2A and C). This increase is extremely high when compared with the spontaneous rate of reversion that was previously established as being one upon  $10^6$  (6). The morphology of v-src-transformed NIH3T3 is typically piled up, whereas the antisense TCTP gives rise to flat revertants (Fig. 2B) and is able to restore contact

inhibition and anchorage-dependent growth (Fig. 2D). The cell density at confluence is another parameter we tested to better define the flat revertants derived by inhibition of the expression of TCTP. This density is also strongly decreased when the expression of TCTP is inhibited (Fig. 2E). These results suggest that targeting TCTP and decreasing its level of expression in v-src-transformed NIH3T3 leads to strong reversion of the malignant phenotype.

**Identification of Chemical Compounds Killing Tumor Cells and Down-Regulating the Expression of TCTP.** Once we established that TCTP is a valid target in tumors and an important molecule in tumor reversion, we tried to find molecules that could inhibit its expression. TCTP is also known as a HRF (15), so we hypothesized that compounds inhibiting the histaminic pathway also could inhibit the function of HRF and have an anticancer effect. We then searched for chemical compounds already known to antagonize the histaminic pathway. Brompheniramine, hydroxyzine, promethazine, and dexchlorpheniramine are known to be effective antihistaminic drugs. We tested the *in vitro* effect of these drugs on human leukemia U937 (Fig. 3A). Incubation of the cells with the drugs at different concentrations for 6 days revealed that hydroxyzine and promethazine had a significant cytopathic effect. Conversely, brompheniramine and dexchlorpheniramine, both part of the same chemical group of alkylamines, did not have any significant cytopathic effect. We then investigated whether structurally related molecules would have a cytopathic effect on cancer cells. Thioridazine, sertraline, perphenazine, chlorpromazine, paroxetine, and flupenthixol,



**Fig. 2.** Flat revertants induced by antisense TCTP in v-src-transformed NIH3T3 cells. (A) Percentage of tumor reversion in NIH3T3 v-src and NIH3T3 v-src transfected with antisense TCTP. (B) Phalloidin (green) and  $\alpha$ -tubulin (red) staining in the indicated cell lines. (C) Western blot to measure TCTP expression. (D) Soft agar analysis of NIH3T3, NIH3T3 v-src, and two flat revertants. (E) Maximum reachable cell density at confluence.

generally with no pronounced antihistaminic properties, showed higher cytotoxicity at lower concentrations (Fig. 3A).

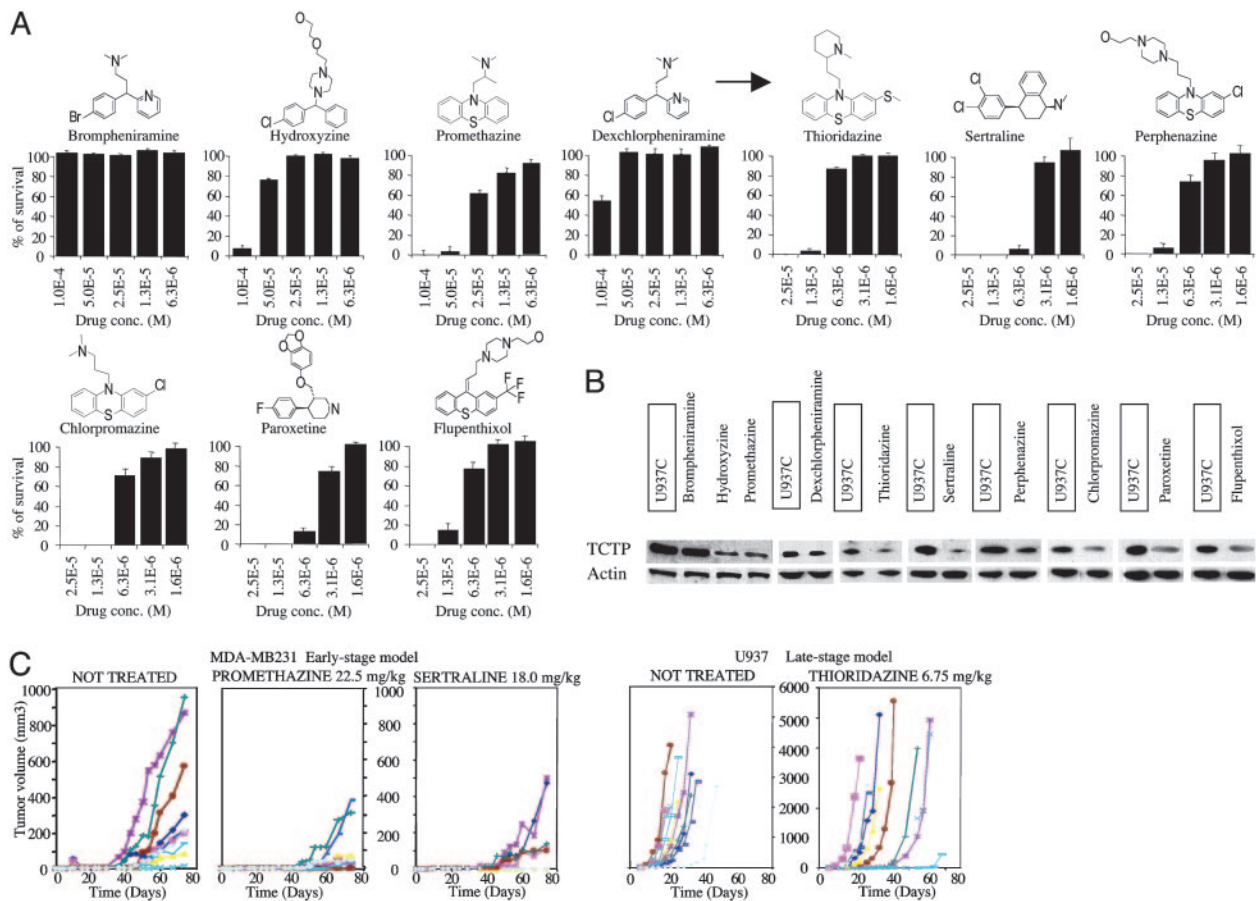
We checked the effect of these drugs on TCTP expression (Fig. 3B and Fig. 5, which is published as supporting information on the PNAS web site). A correlation between the cytopathic effect and inhibition of the expression of TCTP can be observed. The down-regulation of the protein does not seem to be caused by inhibition of transcription or protein degradation caused by cell death. On the contrary, the results indicate an increase in the expression level of TCTP mRNA after drug treatment (Fig. 6, which is published as supporting information on the PNAS web site). The compounds also were used *in vivo* on breast cancer MDA-MB231 and monocytic leukemia U937 cell lines (Fig. 3C). The volume of the tumors generated by injection of the cell lines into *scid/scid* mice was consistently reduced by drug treatment. Administration of drugs 2 days before the injection of the tumor cells (early-stage model) highly reduced the growth of the tumor in the animal (Fig. 3C). Administration of drugs when tumors reached a palpable volume (4 mm<sup>3</sup>) (late-stage treatment) also inhibited growth (Fig. 3C). For all drugs tested in the animals at the concentrations described here, there was no weight loss or any other general signs of toxicity present. These results suggest that these drugs have an anticancer effect by reducing directly or indirectly the level of TCTP.

## Discussion

The aim of this study was to provide a stronger basis for tumor reversion as a biological process that ultimately would lead to the discovery of additional targets for the treatment of cancer. We described three sets of experiments. In the first one, biological models of tumor reversion were derived from three solid tumor cell lines. In the second, we asked the question of whether TCTP is a target protein by analyzing its capacity to modify the malignant phenotype in the framework of the experiments describing flat revertants, which initiated the whole field of tumor reversion (6). In the last set of experiments, we showed pharmaceutical agents reducing the level of TCTP and killing tumor cells.

We initiated our work on tumor reversion by asking the question of whether human leukemia cells would have the capacity to revert. In an earlier paper (1), we described these revertants, derived from the human erythroleukemia cell line K562. These KS cells (K562 Suppressed) were selected by using as a tool the H1 parvovirus that kills preferentially the tumor cells while sparing their “normal counterparts” (21, 23). These normal counterparts were unique cells among the leukemia cells (a frequency of  $10^{-5}$  to  $10^{-6}$  in further experiments). There was not a single sign of terminal differentiation and almost no spontaneous apoptosis (<1%) in the KS clones analyzed. However, they were not normal cells at all, the KS having an abnormal number of chromosomes and other molecular abnormalities found in this kind of tumor (1). They just lost their tumorigenicity. These experiments later were reproduced by deriving other revertants from the monocytic leukemia cell line U937. Here, too, the rate of reversion was very low, and no terminal differentiation was detected (2). Later, we derived revertants from solid tumors in the breast cancer cell lines, BT20, T47D, and MDA-MB231 (4).

We suggested then that tumor reversion is a biological process, with the capacity to override the oncogenic events to yield revertant cells. Some of these revertants lost almost their entire capacity to grow in soft agar and to form tumors after injection into *scid/scid* mice. In the revertants described in the present study and derived from colon, lung, and melanoma cell lines, we found the same characteristic loss of the malignant phenotype, with some of the clones barely growing. Because both the K562- and U937-derived revertants (KS and US) continued to produce H1 parvovirus, we thought that expression of the viral proteins was necessary for maintaining pressure on the cells, which would lead to a suppressed malignant phenotype. We were surprised to observe that in the revertants derived from the breast cancer cell lines (4) only one (MDA-MB231S) continued to produce the virus. This finding also seems true for the colon and lung revertants, where only one of the two revertant clones from lung and both colon revertants continued to produce the H1 parvovirus, whereas the melanoma-derived revertants did not produce



**Fig. 3.** Pharmacological compounds killing tumor cells and decreasing TCTP level. (A) U937 cell plus control solvent viability at different concentrations of the indicated drug, expressed as percentage of survival after 6 days of treatment. The arrow indicates a second generation of compounds. (B) Western blots showing TCTP expression in U937 cells after drug incubation (U937 plus control are boxed). (C) *In vivo* tumor formation in *scid/scid* mice during drug treatment. (Left) MDA-MB231 treated with promethazine or sertraline by using an early-stage protocol. (Right) U937 treated with thioridazine by using a late-stage protocol. (Each curve represents the tumor formation in a different mouse.) Treatment with promethazine or sertraline for the early stage models and thioridazine for the late-stage models results in a highly significant tumor-growth delay, with some of the animals treated displaying no tumor growth at all anymore.

it at all. These experiments led us to conclude that continuous infection with H1 parvovirus is not mandatory for maintaining the suppressed phenotype. H1 parvovirus functions as a selective agent with some clones continuing to produce it, whereas others did not produce it at all; this presence of H1 parvovirus does not change the parameters of the reversion. It remains possible, however, that during the selection procedure the virus induces the reversion process.

With a large-scale screening analysis (4) for the differentially expressed genes between the parental tumor cells and the revertants, among the 263 candidates, TCTP had the most striking differential expression. In MEGASORT analysis, the results showed 248 signals for TCTP detected in the malignant cell line U937, but only two signals in the revertant US4 cells. This differential expression for a gene is the strongest we have ever detected. Further experiments showed that the down-regulation of TCTP by antisense cDNA or RNA interference induces an increase of apoptosis in U937 cells (up to 15%) but, most strikingly, leads to the reorganization of the breast cancer cell into ductal/acinar structures (22).

The analysis of the primary sequence of TCTP, so far, does not lead to any possible interpretation of its function. The NMR structure of the *Schizosaccharomyces pombe* TCTP has been reported (16). The DALI search for homologous protein folds detected mainly two structural homologs, the guanine nucleotide exchange factor Mss4 and the MsrB peptide methionine sulfox-

ide reductase (Msr) fragment pilB (24). The guanine nucleotide-free chaperone Mss4 and its yeast homologue, Dss4, interact with the transient GDP/GTP-free form of the Rab. The Rab binding site on MSS4 coincides with the regions of highest sequence conservation in the TCTP family. The structural homology with the methionine-R-sulfoxide reductase (MsrB) is at the level of two antiparallel  $\beta$  sheets. Msrs protect against oxidative damage: Msr domains (MsrA and MsrB) of the pilB protein from *Neisseria gonorrhoeae* each reduce different epimeric forms of methionine sulfoxide. The structural homology between TCTP and pilB allows us to propose that the surface-exposed face of the four-stranded  $\beta$  sheets may constitute the site of interaction between TCTP and its biological partners. However, none of the amino acids located in pilB putative active site are structurally conserved in TCTP, and therefore no further biological insight can be revealed.

We confirmed that TCTP is down-regulated in one of the two colon cancer revertants, one of the two lung cancer revertants, and all of the melanoma revertants. Together with the KS (4) there are thus only three revertant clones where TCTP is not down-regulated. This finding makes sense because the analysis of tumors directly derived from patients also shows an increase of TCTP in most of the cancers analyzed, although not in all of them (4). These results suggest that all of the pathways of reversion would not involve the inhibition of TCTP. The decrease in TCTP level in most of the revertants together with the



antisense experiments in U937 cells and the reorganization experiments with RNA interference in breast cancer cells argue in favor of TCTP being a reasonable target for reversion.

To validate TCTP as a target we went back to similar experiments as the ones carried out in the mid-1960s where flat revertants of NIH3T3-transformed cells were, for the first time, identified. The data presented in this article suggest that down-regulation of TCTP by antisense induces a high amount of flat revertants in v-src-transformed NIH3T3 cells and strengthens the idea that TCTP is a valuable target for tumor reversion.

We have described the effect of pharmacological compounds on decreasing the level of TCTP and killing cancer cells. Because TCTP corresponds to HRF and because it has to be down-regulated to induce tumor reversion, we hypothesized that this effect could be mimicked by using antihistaminic drugs. Hydroxyzine is part of the piperazines, and promethazine is part of the phenothiazines. They both are antihistaminic by antagonizing the H1 receptor and also act on the CNS. The role of histamine in its antitumor activity is controversial. Promethazine inhibits the effect of histamine on endotoxins against certain solid tumors (25). Another report suggests that certain H1 antagonists increase the growth rate of melanoma and fibrosarcoma cell lines (26). In any case it is now well documented by animal studies and clinical data that H1 receptor antagonists do not promote tumor formation (27). We found that structurally related drugs, whether neuroleptics or antidepressive agents, have a cytophatic effect on U937 and MDA-MB231 cells. Antihistaminics and neuroleptics are widely used in patients with cancer, as antiallergic, antidepressive, or antiemetic agents. Their use, as a potentially effective single anticancer agent, is not well established in clinical assays. *In vitro* studies have revealed that some phenothiazines, including promethazine, thioridazine, perphenazine, and chlorpromazine, had an antiproliferative effect (28–30).

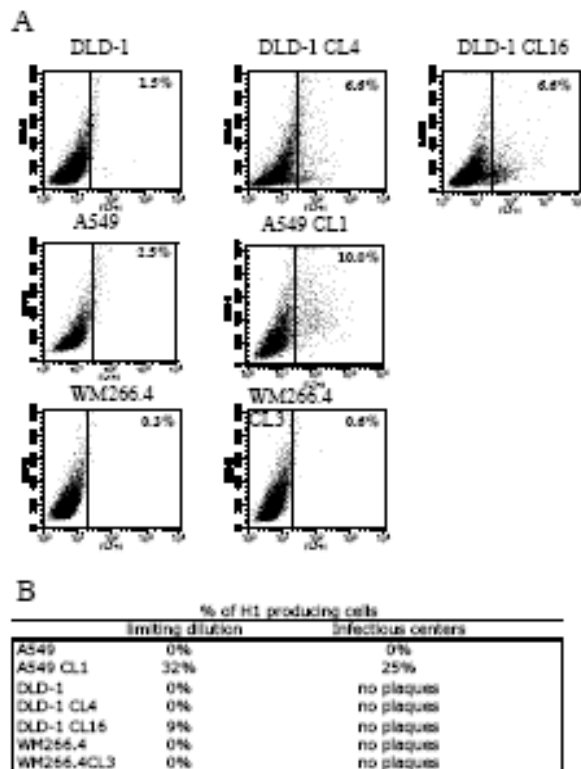
Thioridazine inhibits cell growth of MCF7 and MDA-MB231 tamoxifen-resistant cells (31), by blocking p170mdr-1 (32). Phenothiazines act either on H1 or dopamine receptors. Here, we propose that, at least in part, these drugs act through down-regulation of TCTP at the protein level. The fact that the mRNA level of TCTP is up-regulated by sertraline and thioridazine indicates that the transcription machinery is unaffected and may compensate for the diminution of TCTP. The drugs used at the concentration described here, which is high, do not induce in the mice any general signs of toxicity but kill the cancer cells and delay tumor formation. The fact that in one of the protocols we started the treatment 2 days before inoculating the tumor cells and that such an approach results in decreased tumor formation may suggest that these drugs could have a preventive effect on tumor formation. Whether TCTP is a direct or an indirect target of these drugs remains to be investigated. The most simple explanation would be provided if the drugs directly bind TCTP. However, it is equally important to know whether these drugs affect TCTP indirectly by, for example, acting on some of the TCTP interactor proteins. In such a situation the function or subcellular distribution of TCTP would be modified, which could ultimately lead to a significant decrease in TCTP levels.

In conclusion, our approach, which identified TCTP as a key player in the process of tumor reversion, also leads to the identification of a series of pharmaceutical compounds able to diminish its expression and kill malignant cells. This strategy may contribute to new alternatives in cancer treatment.

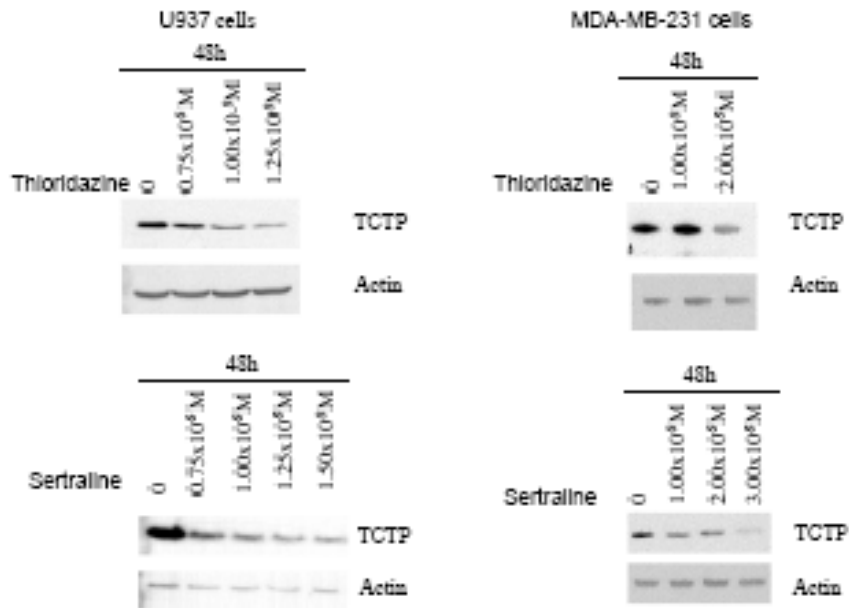
We thank Françoise Rohfritsch for technical assistance; David Hangauer and Werner Bollag for precious advice and providing an additional list of compounds after our first experiments with antihistaminic drugs; Franck Sturtz for his help and support during the entire study; Philippe Genne for carrying out the animal studies; and Pierre Chardin for helpful discussion and the v-src plasmid.

1. Telerman, A., Tuynder, M., Dupressoir, T., Robaye, B., Sigaux, F., Shaulian, E., Oren, M., Rommelaere, J. & Amson, R. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8702–8706.
2. Nemani, M., Linares-Cruz, G., Bruzzoni-Giovanelli, H., Roperch, J. P., Tuynder, M., Bougueleret, L., Cherif, D., Medhioub, M., Pasturaud, P., Alvaro, V., *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9039–9042.
3. Roperch, J. P., Alvaro, V., Prieur, S., Tuynder, M., Nemani, M., Lethrosne, F., Piouffre, L., Gendron, M. C., Israeli, D., Dausset, J., *et al.* (1998) *Nat. Med.* **4**, 835–838.
4. Tuynder, M., Susini, L., Prieur, S., Besse, S., Fiucci, G., Amson, R. & Telerman, A. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14976–14981.
5. Nilausen, K. & Green, H. (1965) *Exp. Cell Res.* **40**, 166–168.
6. Pollack, R. E., Green, H. & Todaro, G. J. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **60**, 126–133.
7. Noda, M., Kitayama, H., Matsuzaki, T., Sugimoto, Y., Okayama, H., Bassin, R. H. & Ikawa, Y. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 162–166.
8. Kitayama, H., Sugimoto, Y., Matsuzaki, T., Ikawa, Y. & Noda, M. (1989) *Cell* **56**, 77–84.
9. Yenofsky, R., Bergmann, I. & Brawerman, G. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5876–5880.
10. Bohm, H., Gross, B., Gaestel, M., Bommer, U. A., Ryffel, G. & Bielka, H. (1991) *Biomed. Biochim. Acta* **50**, 1193–1203.
11. Chitpatima, S. T., Makrides, S., Bandyopadhyay, R. & Brawerman, G. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**, 2350.
12. Sanchez, J. C., Schaller, D., Ravier, F., Golaz, O., Jaccoud, S., Belet, M., Wilkins, M. R., James, R., Deshusses, J. & Hochstrasser, D. (1997) *Electrophoresis* **18**, 150–155.
13. Gachet, Y., Tournier, S., Lee, M., Lazaris-Karatzas, A., Poulton, T. & Bommer, U. A. (1999) *J. Cell Sci.* **112**, 1257–1271.
14. Bommer, U. A. & Thiele, B. J. (2004) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 379–385.
15. MacDonald, S. M., Rafnar, T., Langdon, J. & Lichtenstein, L. M. (1995) *Science* **269**, 688–690.
16. Thaw, P., Baxter, N. J., Hounslow, A. M., Price, C., Waltho, J. P. & Craven, C. J. (2001) *Nat. Struct. Biol.* **8**, 701–704.
17. Amzallag, N., Passer, B. J., Allanic, D., Segura, E., Thery, C., Goud, B., Amson, R. & Telerman, A. (September 21, 2004) *J. Biol. Chem.*, www.jbc.org/cgi/reprint/M404850200v2.
18. Cans, C., Passer, B. J., Shalak, V., Nancy-Portebois, V., Crible, V., Amzallag, N., Allanic, D., Tufino, R., Argentini, M., Moras, D., *et al.* (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 13892–13897.
19. Langdon, J. M., Vonakis, B. M. & MacDonald, S. M. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1688**, 232–236.
20. Toolan, H. W. & Ledinko, N. (1968) *Virology* **35**, 475–478.
21. Mousset, S. & Rommelaere, J. (1982) *Nature* **300**, 537–539.
22. Weaver, V. M., Petersen, O. W., Wang, F., Larabell, C. A., Briand, P., Damsky, C. & Bissell, M. J. (1997) *J. Cell Biol.* **137**, 231–245.
23. Toolan, H. W., Rhode, S. L., III, & Gierthy, J. F. (1982) *Cancer Res.* **42**, 2552–2555.
24. Holm, L. & Sander, C. (1996) *Science* **273**, 595–603.
25. Bloksma, N., van de Wiel, P., Hofhuis, F., Kuper, F. & Willers, J. (1984) *Cancer Immunol. Immunother.* **17**, 33–37.
26. Brandes, L. J., Warrington, R. C., Arron, R. J., Bogdanovic, R. P., Fang, W., Queen, G. M., Stein, D. A., Tong, J., Zaborniak, C. L. & LaBella, F. S. (1994) *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 770–775.
27. Hardman, J. G. & Limbird, L. E., eds. (1996) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (McGraw-Hill, New York).
28. Strobl, J. S., Kirkwood, K. L., Lantz, T. K., Lewine, M. A., Peterson, V. A. & Worley, J. F., III (1990) *Cancer Res.* **50**, 5399–5405.
29. Gil-Ad, I., Shtaf, B., Levkovitz, Y., Dayag, M., Zeldich, E. & Weizman, A. (2004) *J. Mol. Neurosci.* **22**, 189–198.
30. Zhelev, Z., Ohba, H., Bakalova, R., Hadjimitova, V., Ishikawa, M., Shinohara, Y. & Baba, Y. (2004) *Cancer Chemother. Pharmacol.* **53**, 267–275.
31. Strobl, J. S. & Peterson, V. A. (1992) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **263**, 186–193.
32. Yu, D., Liu, B., Jing, T., Sun, D., Price, J. E., Singletary, S. E., Ibrahim, N., Hortobagyi, G. N. & Hung, M. C. (1998) *Oncogene* **16**, 2087–2094.

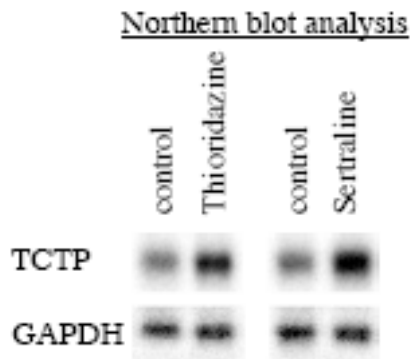
Figures supplémentaires présentées sur le site internet PNAS



**Fig. 4.** H1 parvovirus detection. (A) Fluorescence-activated cell sorting analysis to detect the H1 parvovirus expression in tumor and revertant cells. The tumor cells DLD-1, A549, and WM266.4 and their isolated revertants were fixed and permeabilized according to the FIX & PERM protocol (Caltag, South San Francisco, CA). Cells were stained with an anti-H1-virion antibody revealed with anti-rabbit Alexa Fluor 488 and analyzed on a FACScan (Becton Dickinson). (B) Percentage of H1-producing cells analyzed by limiting dilution and by infectious center assays. After limiting dilution, cells were grown for 1 week, and supernatants were incubated with SV40-transformed newborn human kidney cells for 5 days and scored for lysed NBE cells. In the infectious centers assay, tumor and revertant cells were seeded on NBE indicator cells and overlaid with medium containing agar (BactoAgar, Difco). Plaques were scored after 5 days with neutral red and corrected for plating efficiency.



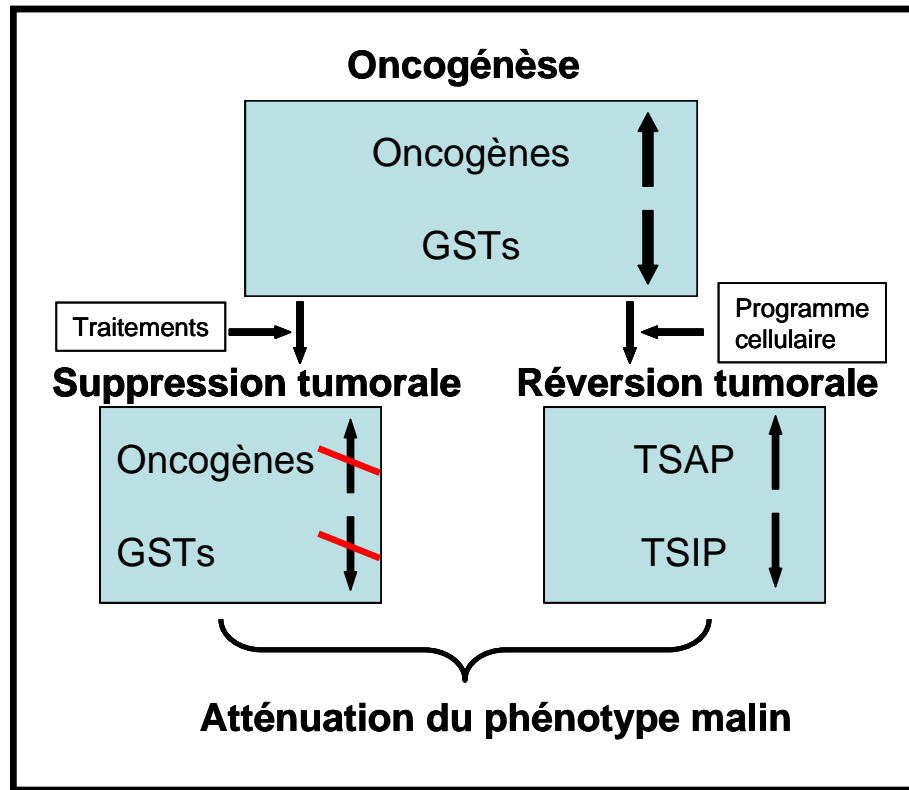
**Fig. 5.** Expression level of TCTP in U937 and MDA-MB-231 cells after treatment with the indicated concentrations of sertraline or thioridazine.



**Fig. 6.** Thioridazine and sertraline induce increased TCTP mRNA levels. Northern blot analysis from U937 cells after 18 h of incubation with  $1 \times 10^{-5}$  M sertraline and thioridazine. Solvents of drugs were used as controls. Blots were hybridized with a TCTP coding sequence probe. GAPDH was used as control for equal loading.

## Discussion et perspectives

### I - Discussion du concept de réversion tumorale



L'objectif principal de notre laboratoire est de découvrir de nouvelles molécules pour une thérapeutique anti-tumorale, en ciblant les principaux acteurs de la réversion tumorale. La réversion tumorale est un processus biologique de fréquence rare par lequel une cellule cancéreuse retrouve un phénotype tumoral atténué (Pollack et al., 1968) et qui intervient après la transformation maligne. Adam Telerman et Robert Amson ont mis au point une méthode de sélection des cellules révertantes en utilisant la propriété cytotoxique du parvovirus H1 pour les cellules cancéreuses (Telerman et al., 1993). Les cellules révertantes sont des cellules isogéniques de leurs cellules tumorales sœurs. Ces cellules ont perdu quelques caractéristiques des cellules cancéreuses telles que l'indépendance d'ancrage pour la croissance cellulaire, la capacité à former des tumeurs dans des souris immunodéficientes et la sensibilité au parvovirus H1 (Tuynder et al., 2002). Différents processus biologiques sont modulés lors de la réversion tumorale comme le cycle cellulaire, la réplication de l'ADN, la

régulation de la transcription, l'apoptose, le métabolisme, la croissance cellulaire et autres (Tuynder et al., 2002). Plusieurs gènes ont montré leur forte implication dans la réversion, ce sont les gènes présiniline 1, siah-1, tsap6 et tpt-1 codant pour la protéine TCTP (Roperch et al., 1998, Roperch et al., 1999, Amson et al., 1996, Tuynder et al., 2002).

Par ailleurs, la suppression d'un phénotype malin se fait en agissant sur les gènes impliqués dans l'oncogénèse, par restauration des gènes suppresseurs de tumeurs ou par inhibition des oncogènes soit par l'apport externe d'informations génétiques soit par des molécules telles que le Glivec ou les nutlins (Vassilev et al., 2005). La réversion tumorale aboutit aussi à la suppression du phénotype malin mais par d'autres mécanismes choisis par la cellule elle-même. Les gènes clé modulés par la cellule sont spécifiques de la réversion tumorale. Les gènes siah-1 et tsap6 sont des gènes pro-apoptotiques car leur surexpression induit l'apoptose et la suppression du phénotype malin (Nemani et al., 1996, Passer et al., 2003). Et tpt-1 est un gène anti-apoptotique car son inhibition par antisens ou siRNA induit l'apoptose et une perte de certaines caractéristiques des cellules tumorales (Tuynder et al., 2004). Les modifications au niveau du génome qui induiraient la réversion tumorale, sont certainement d'ordres épigénétiques (Esteller et al., 2007) car nous n'avons pas observé la présence de mutations dans les séquences codantes des principaux gènes impliqués dans la réversion (résultats non publiés).

En conclusion, il y a différentes manières d'obtenir une suppression ou atténuation du phénotype malin. D'abord, en modulant les événements qui mènent à la transformation d'une cellule normale en cellule tumorale, c'est-à-dire en inhibant l'action des oncogènes ou en augmentant l'action des gènes suppresseurs de tumeurs.

De manière encore différente, nous pouvons agir sur la réversion tumorale, c'est-à-dire le programme cellulaire qui suit la transformation tumorale et par lequel une cellule va perdre en partie son phénotype malin. Ainsi, en augmentant l'action de gènes comme les TSAP (ex SIAH) ou en inhibant des TSIP comme la PS1 ou le TCTP, nous pouvons aussi obtenir une suppression ou atténuation du phénotype malin. Une analyse systématique des gènes impliqués dans la réversion montre qu'ils sont différents de ceux impliqués dans la transformation (oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs). Néanmoins la réversion tumorale, tout comme la transformation, « emploient » les grandes voies régulatrices de la cellule telles que l'apoptose, le cycle ou encore la différenciation terminale.

## J - Discussion des résultats

L'analyse de l'expression différentielle des gènes au cours de la réversion tumorale (Tuynder et al., 2002) a permis de mettre en évidence la forte implication de trois gènes dans ce processus : *siah-1*, *tpt-1* et *tsap6* (Tuynder et al., 2002, Passer et al., 2003, Susini et al., 2001). Au cours de mon doctorat, mon travail a consisté à l'étude structurale et fonctionnelle de ces gènes (Fiucci et al., 2003, Fiucci et al., 2004, Susini et al., 2008), dans cette thèse, sont présentés les résultats obtenus pour le gène *tsap6* et *tpt-1*. L'étude fonctionnelle de ces protéines, s'accompagne d'une stratégie d'élaboration de modèles d'animaux, la collaboration avec l'Institut Clinique de la Souris de l'IGBMC à Strasbourg, a aboutit à la réalisation de souris déficientes pour TCTP et TSAP6.

TSAP6 a été détectée à l'origine surexprimé dans le système cellulaire LTR6 (Michalovitz et al., 1990, Yonish-Rouach et al., 1991) dans lequel le changement de température de 37 à 32°C induit l'apoptose par la production de p53 sous sa forme active, d'où son appellation *Tumor Suppressor Activated Pathway*. Le promoteur de TSAP6 contient un élément de réponse activable par p53 et sa surexpression induit l'apoptose et bloque la transition du cycle cellulaire en G2/M en association avec les protéines Nix et Myt1 (Passer et al., 2003). De plus, TSAP6 interagit avec TCTP et facilite sa sécrétion via les exosomes (Amzallag et al., 2004).

Les souris TSAP6 ko obtenues présentent une anémie microcytaire qu'on explique par un défaut de maturation des réticulocytes dû à une mauvaise élimination de la TfR par les exosomes. Oghami et ses collaborateurs ont aussi montré que TSAP6 était responsable du phénotype des souris mutante nm1054 présentant aussi une anémie microcytaire (Oghami et al., 2005) et expliquent ce phénotype par l'activité ferric-réductase de TSAP6 (Oghami et al., 2005). L'obtention des souris TSAP6 ko, en plus de confirmer l'implication de TSAP6 dans l'apoptose et le cycle cellulaire, nous a permis de démontrer *in vivo* que la sécrétion des exosomes inductible par p53 est dépendante de TSAP6 (Lespagnol et al., sousmis 2008). La dépendance de la voie exosomale à p53 a aussi été montrée par Yu au niveau cellulaire de manière qualitative. (Yu et al., 2006). Compte tenu du fait que les exosomes sont utilisés comme des vaccins acellulaires contre le cancer et qu'ils pourraient être impliqués dans la biogenèse et la propagation du VIH, il est important de comprendre leur régulation. Les résultats présentés offrent la première démonstration génétique que la formation d'exosomes est un processus étroitement contrôlé par TSAP6 et inductible par p53.

Les exosomes sont sécrétés par différents types cellulaires, les réticulocytes (Géminard et al., 2002), les plaquettes, les lymphocytes T cytotoxiques (Denzer et al., 2000), les cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) (Théry et al., 2002, Denzer et al., 2000). Les exosomes dérivés des CPAs ont des cibles physiologiques potentielles avec une possible utilité dans l'immunothérapie des cancers (Denzer et al., 2000, Théry et al., 2002, Stoorvogel et al., 2002, Farsad et al., 2002). Ces exosomes ont la capacité de stimuler les lymphocytes T *in vitro* (Raposo et al., 1996, Zitvogel et al., 1998, Segura et al., 2005) et d'induire une réponse immune anti-tumorale (Zitvogel et al., 1998, Théry et al., 2002, Denzer et al., 2000, Escudier et al., 2005). André et ses collaborateurs ont trouvé que les effusions malignes de patients atteints de différents cancers contiennent une quantité abondante de vésicules membranaires qui ont des caractéristiques communes avec les exosomes (Andre et al., 2002). Ces exosomes sont une source d'antigènes pour le rejet des tumeurs (Wolfers et al., 2001, André et al., 2002). On peut aisément imaginer que la sécrétion de ces vésicules est entre autre, un moyen de communication entre les cellules tumorales par transfert de membrane comme il a été montré pour d'autres types cellulaires (revue Théry et al., 2002).

TCTP aussi appelé HRF ou fortilin, a montré dans plusieurs travaux une activité anti-apoptotique dans divers systèmes cellulaires et animal (Li et al., 2001, Liu et al., 2005, Tuynder et al., 2002, Hsu et al., 2007). Dans l'article de Susini et al 2008, nous démontrons que l'activité anti-apoptotique de TCTP est portée par ses hélices H2-H3 et que cette fonction se fait par interférence avec l'activité pro-apoptotique de la protéine Bax au niveau des mitochondries. De nombreuses souris déficientes en protéines pro- ou anti-apoptotique présentent un phénotype de mort embryonnaire, comme pour les caspases 3-7-8 et 9 (Zheng et al., 1999), Bclx (Motoyama et al., 1995), Bak et Bax conjointement (Lindsten et al., 2000), et le cytochrome c (Li et al., 2000). Toutefois, l'élimination de protéines fortement impliquées dans l'apoptose n'induit pas systématiquement une létalité embryonnaire, comme pour Bak et Bax séparément (Lindsten et al., 2000), Bad (Ranger et al., 2003), les caspases 1-2-6 et 11 (Bergeron et al., 1998, Zheng et al., 1999), Smac/Diablo (Okada et al., 2002) et Bid (Yin et al., 1999) (pour revue voir Ranger et al., 2001). C'est pour ces raisons que nous avons tenté de générer des souris ko TCTP total en éliminant les exons 3 à 5 par le système de recombinaison Cre/LoxP. Il s'avère que les souris ko TCTP présentent un phénotype de létalité embryonnaire précoce qui serait lié à une dérégulation de l'apoptose et de la

croissance cellulaire. Les embryons à 6,5 jours post coïtal (E6.5) montrent de l'apoptose accrue et les embryons TCTP  $-/-$  de E7,5, E8,5 et E9,5 sont de plus petite taille et ont une morphologie différente. Rinkenberger et son équipe ont généré des souris déficientes pour Mcl-1, TCTP interagit avec Mcl-1 et stabilise son activité anti-apoptotique (Liu et al., 2005). Ces animaux présentent une mort embryonnaire au stade préimplantatoire (Rinkenberger et al., 2000). Chen et ses collaborateurs ont aussi tenté de générer des souris ko TCTP par élimination des exons 3 et 4 (Chen et al., 2007). L'étude de ces souris montre aussi une mort embryonnaire précoce au stade E10,5. Les embryons TCTP $nul$  se développent de manière désorganisée, sont de taille plus petite et présentent une apoptose accrue au stade E6,5 et une réduction de la croissance cellulaire au stade 5,5j. De plus les cyclines nécessaires à l'entrée en phase S (cycline D, E) sont sous exprimées dans ces embryons au stade 9,5j. Un retard important de la croissance cellulaire est décrit chez la drosophile dont l'expression de TCTP est atténuée (Hsu et al., 2007). Les auteurs expliquent ce phénotype par l'implication de TCTPd dans la voie d'activation mTor, en montrant que TCTPd active Rheb, une protéine GEF, qui est un régulateur positif de la croissance cellulaire via mTor. Chen et ses collaborateurs ont testé l'hypothèse dans laquelle TCTP intervient de la même manière chez la souris, mais les essais avec les MEFs TCTP $-/-$  n'ont montré aucune activation de Rheb ou la protéine kinase S6, impliqués dans la voie mTor. Les auteurs concluent sur le fait que TCTP soit indispensable au développement précoce embryonnaire mais ils suggèrent qu'il n'est pas a priori nécessaire à la prolifération normale ou à la survie des cellules comme les MEFs. Ces conclusions sont amenées après avoir montré que des MEFs TCTP $-/-$  ont une prolifération cellulaire comparable aux MEFs sauvages et sont insensibles à divers stimuli apoptotique. En effet, les principales études montrant l'effet de TCTP sur la prolifération ou la survie cellulaire ont été réalisées dans des systèmes hautement prolifératives tels que les cellules cancéreuses ou transformées, les ovocytes et la drosophile (Li et al., 2001, Liu et al., 2005, Tuynder et al., 2002, Tuynder et al., 2004, Hsu et al., 2007).

Plusieurs études récentes présentent TCTP fortement impliqué dans la maturation des ovocytes et son rôle important dans le processus de re-programmation au cours de transfert de noyaux somatiques dans les oocytes. Le profil protéique de la maturation des ovocytes murins fait apparaître une différence d'expression de 12 protéines entre le stade germinale et métaphase II, TCTP en fait partie et son expression est augmentée. (Vitale et al., 2007). De même, Lo (Lo et al., 2007) montre une évolution de l'expression de TCTP au cours du



développement ovarien chez la crevette. Les oocytes sont reconnus pour avoir des facteurs permettant de reprogrammer les noyaux de cellules somatiques après transfert. TCTP est décrit comme étant l'un de ces facteurs dans les oocytes bovins (Tani et al., 2007). La transfection de TCTP phosphorylé augmente le niveau de vèlage à partir des blastocytes transfectés et diminue le taux d'avortement, le tout sans modifier le développement blastocyttaire. Enfin, Koziol (Koziol et al., 2007) montre que TCTP active la transcription d'Oct4 et Nanog dans les noyaux de cellules somatiques transplantés dans des ovocytes. Oct4 et Nanog sont des facteurs de transcription dont le rôle essentiel est de permettre la prolifération des cellules souches. Oct4 est un gène uniquement exprimé dans les cellules pluripotentes de type embryonnaire. Cette protéine n'est pas produite dans les cellules somatiques mais est activée au cours de transfert nucléaire dans les oocytes ou dans les cellules souches embryonnaires. L'augmentation de son expression est le signe de la reprogrammation cellulaire des noyaux somatiques transplantés.

Le développement de souris déficientes en TCTP au niveau de tissus spécifiques est nécessaire pour passer outre la létalité embryonnaire induit par la perte de TCTP trop tôt au cours du développement. Dans un premier temps, il faudrait cibler des tissus fortement prolifératifs tels que le thymus, les intestins (El Marjou et al., 2004) et les tissus hématopoïétiques comme la rate et la moelle osseuse ; pour observer un effet de TCTP ; puis poursuivre par le foie où la protéine est la plus présente (Susini et al., 2008, Schuler et al., 2004). On pourrait aussi cibler les tissus pour lesquels le niveau de TCTP est augmenté dans leurs équivalents tumoraux (Tuynder et al., 2002) et voir dans ces tissus s'ils restent sensibles à des agents mutagènes et tester l'évolution de tumeurs au sein des tissus TCTP<sup>-/-</sup>. En suivant l'exemple des souris conditionnelles Bcl-x (Wagner et al., 2000), protéine anti-apoptotique de la famille Bcl-2, qui sont générées par le système Cre/LoxP par excision au niveau temporel et spatial en utilisant les souris MMTV-Cre qui exprime la Cre recombinase dans plusieurs tissus sécréteurs et le système hématopoïétique (Wagner et al., 1997). La perte totale du gène au niveau de l'animal total suivant une stratégie classique conduit à une létalité embryonnaire (Motoyama et al., 1995). Par cette technique, les auteurs ont pu obtenir des souris conditionnelles déficientes en Bcl-x dans les précurseurs hématopoïétiques. De cette façon, ils ont pu étudier l'implication de Bcl-x sur la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire des érythrocytes matures et immatures.

Au vu des caractéristiques remarquables de TCTP, notre laboratoire a initié le projet de formuler des molécules spécifiques ciblant TCTP dans le but d'élaborer de nouveaux traitements anticancéreux. Il existe une catégorie de molécules se liant à TCTP qui ont un effet sur des cellules cancéreuses, ce sont les dérivés d'artémisinine (Chen et al., 2003). Ces molécules inhibent la croissance de différentes lignées cellulaires tumorales et inhibent l'angiogénèse in vitro. L'artémisinine est une drogue pour le traitement de la malaria pour les malades présentant une résistance aux traitements à la chloroquine et au sulphadoxine-pyriméthamine (Ridley et al., 2002). L'artémisinine se lie directement au TCTP du parasite *Plasmodium falciparum* (Jinsun Chae et al., 2006, Bhisutthibhan et al., 1998, Bhisutthibhan et al., 2001). Mais l'interaction entre cette molécule et TCTP ne serait pas responsable de l'activité anti-malaria (Eckstein-ludwig et al., 2003).

Nous avons abordé le projet en suivant l'hypothèse selon laquelle l'utilisation de molécules inhibitrices de la voie de l'histamine aurait un effet anti-cancéreux en inhibant TCTP/HRF. Par homologie de structure, nous avons identifié des molécules montrant une activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses et induisant la baisse de l'expression de TCTP. Nous montrons que la sertraline et la thioridazine induisent l'augmentation de TSAP6, la baisse de TCTP dans le lysat cellulaire et augmente la sécrétion de TCTP et sa quantité d'ARNm. On comprend bien l'effet de cette diminution sur la cellule, car la perte de TCTP implique la perte d'activité anti-apoptotique intracellulaire donc une induction supposée de l'apoptose d'où la mort cellulaire (Tuynder et al., 2002, Tuynder et al., 2004), cet effet est renforcé par une augmentation de TSAP6. En effet, Passer a montré que la surexpression de TSAP6 induit l'apoptose et que cette induction passe par la protéine pro-apoptotique NIX avec laquelle elle interagit directement (Passer et al., 2003).

La thioridazine est un neuroleptique de la famille des phénothiazines. Son mode d'action est relativement complexe, il bloquerait l'action de nombreux neurotransmetteurs au niveau cérébral. La thioridazine (TZD) a déjà montré des effets anticancéreux (Zhelev et al., 2003). Il inverse complètement la multi résistance des cellules de carcinome KB humain aux drogues suivantes : doxorubicine, vinblastine, dactinomycine et daunorubicine (Akiyama et al., 1986). C'est aussi le cas pour la résistance des cellules leucémie de souris à la vincristine (Barancik et al., 1994) et pour les cellules du sarcome 180 à la doxorubicine (Efferth et al.,

1993). TZD a montré un effet cytotoxique sur des cellules tumorales par induction de l'apoptose (Gil-ad et al., 2004, Gil-ad et al., 2006), et inhibe la croissance des cellules MCF-7 et MDA-MB du cancer du sein (Strobl et al., 1992, Strobl et al., 1990 ; Sutherland et al., 1987). TZD bloque la protéine p170MDR qui est impliqué dans la résistance au taxol des cellules du cancer du sein (Yu et al., 1998). Les dérivés de phénothiazine interagissent avec la membrane mitochondriale et sont décrits comme inhibiteurs mitochondriaux (Rodrigues et al., 2002, Brown et al., 2000, Ruben et al., 1981, Gallagher et al., 1965).

La sertraline est un antidépresseur inhibiteur de la re-capture de la sérotonine (Guthrie et al., 1991, De Vane et al., 2002). La sérotonine est l'un des principaux neuromédiateurs du système nerveux central. La sertraline interagit avec le cytochrome P450 (CYP) causant son inhibition ou induction (Skinner et al., 2003, Sproule et al., 1997). CYP est impliqué dans le métabolisme des drogues dont l'inhibition induit les interactions médicamenteuses (De leon et al., 2006). Les effets des SSRI (selective serotonin reuptake inhibitors) sur le cytochrome P450 sont discutés dans la revue de Perskorn (Preskorn et al., 1998). En outre, la sertraline stimule l'expression de CREB chez le rat (Nibuya et al., 1996), CREB étant un facteur de transcription pour TCTP (Andree et al., 2005). Ceci pourrait expliquer l'augmentation de l'ARNm de TCTP sous l'effet de la sertraline (Tuynder et al., 2004). L'augmentation des transcrits en parallèle de la baisse du niveau protéique, suggère l'existence d'une boucle d'autorégulation pour TCTP.

TCTP est une protéine sécrétée via la voie des exosomes et sa sécrétion est facilitée par la protéine TSAP6 qui interagit directement avec TCTP (Amzallag et al., 2004). Nous avons montré précédemment que la voie exosomale est régulée par p53 via TSAP6. Nous montrons que la sertraline et la thioridazine déplacent l'interaction entre TCTP et TSAP6. Des résultats préliminaires montrent que la sécrétion d'exosomes n'est pas la voie empruntée pour éliminer TCTP en présence des drogues. Mais, il existe d'autres voies de sécrétion dite non-classiques, insensibles à la brefeldine A, inhibiteur du système réticulum/golgien, l'avancement des données relatif à ces voies est présenté dans la revue de Walter Nickel (Nickel et al., 2003).

Voici une présentation non exhaustive de protéines empruntant des voies de sécrétion non-classiques autres que les exosomes. HMGB1 (high mobility group) une protéine nucléaire, l'interleukine IL1b et l'Hsp70 (heat shock protein) sont sécrétées par la voie de sécrétion impliquant l'exocytose des lysosomes par les monocytes (Gardella et al., 2002,

Andrei et al., 1999, Hunter-Lavin et al., 2004, revue Blott et al., 2002). Des analyses par chromatographie d'affinité dans notre laboratoire ont montré que TCTP se lie à Hsp70, ces résultats ont été confirmés par des essais de co-immunoprécipitation (données non publiées). Les transporteurs ABC (ATP-binding cassette) sont des canaux dépendants de l'ATP capables de transporter une grande variété de substrat, de la petite molécule comme des ions aux grandes protéines comme la protéine MIF (macrophage migration inhibitory factor) (Schmitt et al., 2002, Flieger et al., 2003). Les FGFs (fibroblast growth factor) qui jouent un rôle important dans la régulation de processus cellulaires clés tels que l'angiogénèse, la morphogénèse, la différenciation et la croissance tumorale ; sont libérés dans le milieu extracellulaire par translocation à travers la membrane plasmique associés à un complexe multiprotéique. Ce mécanisme n'est pas encore totalement élucidé (Rajalingam et al., 2007, Schafer et al., 2004). Certaines protéines utilisent plusieurs voies, c'est le cas de la métalloendopeptidase EC3.4.24.15 qui libérée de manière constitutive par voie non-classique encore non déterminée et de manière régulée par voie classique (Jeske et al., 2004). Depuis, il a été montré en outre que l'expansion du virus HIV passe par les exosomes (Nguyen et al., 2003, Gould et al., 2003). Ainsi que le pathogène intracellulaire *Leishmania* dont la protéine HASPB est expulsé de la cellule hôte par retournement direct de la membrane plasmique (mécanisme du flip-flop), utilise aussi plusieurs voies de sécrétion non-classiques (Silverman et al., 2008).

Il est évident que pour réorienter TCTP vers une autre voie d'expulsion il faut qu'il y ait des interconnexions entre les différents accès existants. Dans cette thèse, nous montrons que la protéine TSAP6 est glycosylée et est localisée au niveau du réseau trans-golgien, de la membrane plasmique et des endosomes précoces. Ces résultats suggèrent un lien entre le système de sécrétion classique réticulum/golgi et la voie des exosomes. Dans les cellules K562, le réseau trans-golgien contribue à la biogénèse des corps multivésiculaires (MVBs), compartiments de formation et de libération des exosomes (Savina et al., 2002). Les auteurs suggèrent que la coordination du trafic du TfR entre les MVBs et le trans-Golgi est modulée par la GTPase Rab11. Les MVBs sont au carrefour des voies endosomal/lysosomal (Gruenberg et al., 1995, Denzer et al., 2000) et sont aussi reliés au trans-golgi (Savina et al., 2002). On peut facilement imaginer une déviation des protéines empruntant la voie des exosomes vers les lysosomes ou une autre voie. Une autre piste d'interconnexion entre la voie des exosomes et le système réticulo-golgien est l'association des protéines ARF (ADP-

ribosylation factor) et Rab4 dans la libération des exosomes au cours de la maturation des réticulocytes (Vidal et al., 1993). Les protéines ARF sont impliquées dans le trafic intracellulaire des protéines cargo au niveau du transport antérograde et rétrograde au niveau réticulum endoplasmique et de l'appareil de golgi et ces protéines sont aussi impliqués dans la voie endosomale (Nie et al., 2006, Memon et al., 2004).

Mais quel est le signal pour induire la ré-orientation de TCTP ? Yoon et son équipe ont montré que TCTP de rat a la capacité de se dimériser (Yoon et al., 2000). La région impliquée est localisée à l'extrémité Cterminal du résidu 126 à 172. Nous avons aussi pu le constater au sein de notre équipe par les mêmes techniques de purification en FPLC, de test d'interaction protéine-protéine *in vitro* en GST pull-down et *in vivo* en double hybride en levure (méthodes décrites dans Amazallag et al., 2004). Les essais *in vitro* suggèrent une oligomérisation de TCTP sous l'effet des drogues. Ce changement d'état pourrait être le signal de déviation de la voie exosomale vers une autre voie de sécrétion et aussi vers la dégradation par les lysosomes. Les lysosomes seraient un lieu commun de dégradation et de sécrétion (Blott et al., 2002). Vidal et ses collaborateurs montrent que la réorientation du complexe TfR-Tf de sa voie de recyclage à la membrane plasmique vers l'expulsion par les exosomes se produit par agrégation de ce complexe (Vidal et al., 1997). D'autres mécanismes pas encore identifiés mais toujours indépendants du système réticulo-golgien et insensibles aux inhibiteurs connus des voies non-classiques et insensibles à la température, permettent la sortie de protéines ayant une mauvaise conformation (Tanudji et al., 2002). Nous avons uniquement testé des inhibiteurs du protéasome en présence des drogues sans obtenir de résultats. Fujita montre que la déhydroartémisinine (DHA, un métabolite de l'artémisinine) réduit le niveau protéique intracellulaire de TCTP malgré l'activation du gène au niveau de sa transcription (Fujita et al., 2008). Les auteurs montrent que la DHA réduit la demi-vie de TCTP en augmentant son ubiquitination et sa dégradation via le protéasome. Kubiak montre aussi que TCTP est dégradé via le protéasome (Kubiak et al., 2008). Dans notre cas, il faudrait ajouter un inhibiteur des lysosomes comme la chloroquine ou le monensime (El Khissin et al., 1999) en même temps que les drogues pour contrôler si une partie de la baisse de TCTP n'est pas due aussi à sa dégradation dans les lysosomes. Les dérivés phénothiazine sont des réactifs lysomotropiques (Schneider et al., 1997), ces molécules s'accumulent dans les lysosomes, il en résulte une distribution particulière de ces drogues dans le corps, elles s'accumulent dans les tissus riche en lysosome comme le foie ou le cortex cerebral (Daniel et al., 1999, Daniel et

al., 2001, Daniel et al., 2002, Daniel et al., 2003). Ces molécules ainsi que la sertraline inhibe la séquestration lysosomale appelée *lysosomal trapping*, ce mécanisme est important pour la distribution et la pharmacocinétique d'interaction entre les psychotropes. La thioridazine inhibe les enzymes lysosomals suivants la cathépsin B et la phosphatase acide (Kuratomi et al., 1986). TCTP complexé aux drogues pourrait être dévié dans les lysosomes pour y être dégradé ou sécrété.

La sécrétion des lysosomes est sensible au calcium (Blott et al., 2002), la thioridazine et la sertraline ont montré des effets reliés au calcium. La thioridazine (TDZ) est un inhibiteur de la calmoduline. Cette action prévient des méfaits de la sérotonine sur la peau chez le rat et du ionophore calcique A23187 sur la glycolyse du cytosquelette des cellules NIH3T3 (Ashkenazy-Shahar et al., 1997, 1999). La calmoduline est une protéine ubiquitaire capable de fixer quatre ions calcium présents dans le cytosol, une fois complexé au calcium la protéine adopte sa conformation active lui permettant d'interagir avec ses protéines cibles pour en moduler l'activité (Carafoli et al., 2002). De plus TDZ inhibe la libération de l'histamine par les mastocytes dans un milieu extracellulaire pauvre en calcium (Peachell et al., 1989), ces auteurs suggèrent une action en antagonisant la calmoduline. TDZ bloque les canaux calciques de type T à hauteurs de 25% pour une concentration de 10 $\mu$ M dans les cellules neuronales de rat et les cellules thyroïdiennes humaines (Enyeart et al., 1992, Mousavizadeh et al., 2002). Des molécules de la famille des phénothiazines à laquelle appartient la thioridazine, stimulent une légère augmentation du transport du calcium par la pompe calcique du réticulum à une concentration inférieure à 150 $\mu$ M (Vale et al., 1985). La sertraline a aussi un effet relié au calcium. Elle inhibe les canaux calciques (Kalyoncu et al., 1999, Becker et al., 2004), ainsi que le courant calcique de type L dans les myocytes ventriculaires de rat (Park et al., 1999). A priori, l'inhibition des canaux calciques, voie d'entrée du calcium extracellulaire dans le cytosol, contribuerait à la diminution du taux de calcium cytosolique mais on peut supposer le contraire en considérant que le blocage de la calmoduline aurait l'effet de libérer du calcium. D'ailleurs la sertraline a été montré capable d'induire le taux de calcium intracellulaire dans les plaquettes (Helmeste et al., 1995) et les auteurs suggèrent l'hypothèse d'inhibition de la calmoduline pour expliquer cet effet.

## **K - Conclusion et perspectives**

L'étude du processus original de réversion tumorale a permis de révéler une cible thérapeutique à fort potentiel pour le cancer : TCTP. De plus l'un de ses partenaires biologiques, TSAP6 facilite sa sécrétion via les exosomes et peut potentialiser l'effet de la diminution de TCTP dans les cellules. Le développement de molécules interférant avec l'activité anti-apoptotique de TCTP et son niveau intracellulaire a fait rapidement ses preuves d'intérêt et d'efficacité dans les essais clinique de phase I/II malgré un contexte biologique délicat conféré par le stade très avancé de la maladie des patients traités. TCTP est clairement une nouvelle cible présentant un très fort potentiel pour le traitement des cancers.

Comprendre les mécanismes d'actions de la sertraline et la thioridazine, nos permettraient de mettre en place un test de criblage cohérent pour de nouvelles molécules, en corrélant l'activité cytotoxique avec la sécrétion et le déplacement de la liaison TCTP-TSAP6. La détermination du domaine impliqué dans l'association de TCTP et TSAP6 pourrait nous orienter sur la localisation du site de liaison des drogues, en supposant que les drogues bloquent directement cette interaction, et non que ce soit le changement de conformation induit par les drogues qui déstabilise cette interaction.

TSAP6 est démontré indispensable pour la sécrétion d'exosomes induite par p53, cette voie de sécrétion est en outre impliquée dans le processus de propagation virale et la sensibilisation du système immunitaire, ce qui laisse aussi présager une voie d'accès thérapeutique anti-cancéreuse. Les résultats obtenus par l'étude des souris ko tsap6 sont les premières preuves génétiques de l'implication de ce gène et de p53 dans la voie de sécrétion exosomale. P53 en plus d'être un régulateur du cycle cellulaire et de l'apoptose, régule aussi une voie de sécrétion. TSAP6 peut être une nouvelle voie d'approche en aval de p53. On peut envisager d'aborder TSAP6 comme une cible thérapeutique en stabilisant le niveau intracellulaire de la protéine pour induire l'apoptose en inhibant sa sécrétion par les exosomes qui sont un moyen de communication entre les cellules. Bloquer cette voie de communication pourrait de plus être accès de traitement, pour vérifier cette hypothèse, il faudrait évaluer

l'évolution de tumeurs dans lesquelles le gène *tsap6* est désactivé. Pour se faire, l'utilisation de tissus issus de souris ko conditionnelles pour *tsap6* peut être envisagé.

Une autre alternative pour cibler TCTP serait une molécule qui bloque directement l'activité anti-apoptotique en se focalisant sur les hélices H2-H3 pour déstabiliser l'association hypothétique entre TCTP et Bax. Les expériences à venir sont envisagées pour déterminer le partenaire de TCTP qui lui permet d'inhiber la dimérisation de Bax et par conséquent inhiber l'apoptose induit par Bax. Il est envisagé entre autre de réaliser des co-cristaux entre TCTP/Mcl-1/Bcl-xL et Bax, partenaires fortement supposés être impliqué dans la fonction anti-apoptotique de TCTP (Liu et al., 2005, Yang et al., 2005). Qui sera suivie par la mise en place un test de criblage de molécules qui déstabiliseraient cette interaction, sur le même schéma que les molécules nutlins. Un modèle murin est toutefois nécessaire pour juger l'impacte de la fonction anti-apoptotique de TCTP *in vivo*. Le développement de souris déficientes en TCTP au niveau de tissus spécifiques est nécessaire pour passer outre la létalité embryonnaire induit par la perte de TCTP trop tôt au cours du développement.



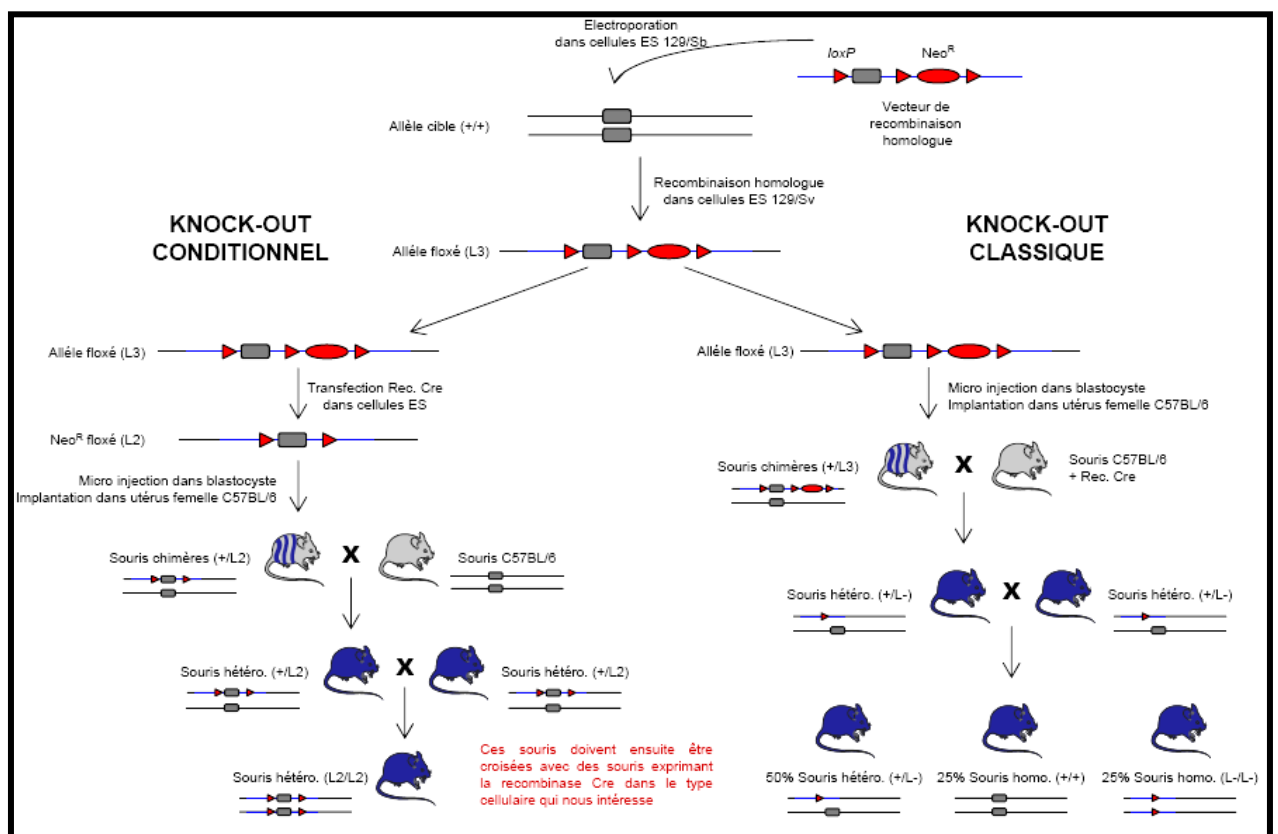
## Matériels et Méthodes

### L - Principe de réalisation de souris knock-out (ko)

Voir livre : Panthier, Montagutelli, Guénet, les organismes modèles génétique de la souris, édition Belin

Au sein du laboratoire, nous avons choisi de mener de front deux stratégies de production de souris knock-out (ko) une classique et une conditionnelle (Fig 30). Dans le but à la fois de rapidité pour l'obtention des animaux ko classiques et pour parer à un éventuel phénotype léthal au niveau embryonnaire grâce aux animaux ko conditionnels. Le principe de réalisation de ces souris par le système Cre/LoxP est décrit dans le chapitre matériels et méthodes.

Fig 30. Génération de knock-out de gène conditionnel versus classique



### **L - I - 1 . Mutagenèses ciblées**

Il s'agit de modifier un gène cible grâce aux propriétés de la recombinaison homologe. Cela consiste non pas à ajouter un gène qui s'intègre n'importe où dans le génome, ce qui peut avoir des conséquences imprévisibles pour la cellule, mais à le faire se placer au locus voulu dans le génome. Cette méthode permet de muter ou activer un gène cible dans des souris, on parle de « knock-in de gène » ou de désactiver ce gène cible dans des souris en éliminant une partie du gène, il s'agit de « knockout de gène classique ». Il est également possible par cette méthode désactiver un gène cible dans un organe spécifique à un stade du développement choisi par avance dans des souris, il s'agit alors de « knock-out de gène conditionnel ».

### **L - I - 2 . Recombinaison homologue**

À la différence de la recombinaison illégitime ou non homologue où un fragment d'ADN s'intègre au hasard à la faveur d'une cassure double-brin dans le génome d'une cellule, la recombinaison homologue implique la reconnaissance de l'homologie entre l'ADN exogène transfecté et le locus cible. Il s'agit d'un échange de fragments entre deux molécules d'ADN au niveau des séquences nucléotidiques homologues. C'est ce qu'il se passe lors de crossing over à la méiose entre les chromatides des paires de chromosomes.

### **L - I - 3 . Knock-out et knock-in de gène**

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

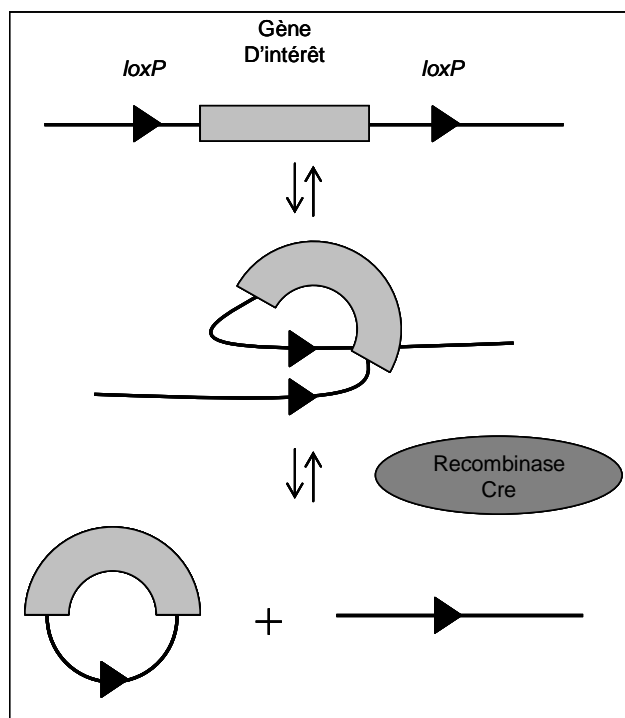
### **L - I - 4 . Knock-out de gène conditionnel**

Dans certaines conditions, la perte de fonction d'un gène dans l'ensemble des cellules de l'animal entraîne un phénotype complexe et ne permet pas de définir clairement la fonction

du gène correspondant. Dans d'autres conditions, cela entraîne une létalité embryonnaire. Pour parer ces inconvénients, il est possible de générer des souris knock-out conditionnels. Ces knock-out se font de la même manière que les souris knock-out classiques sur la base de la recombinaison homologue, mais dans la construction nous insérons un système *Cre/LoxP* permettant de supprimer la fonction de notre gène d'intérêt *in vivo* seulement dans un tissu spécifique et/ou à un moment voulu.

#### **L - I - 5 .    Système Cre/loxP**

La recombinaise Cre, reconnaît une séquence spécifique *loxP* de 34pb (ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT) présente dans le génome du bactériophage P1. Cette séquence comprend deux motifs inversés de 13pb de part et d'autre d'une séquence de 8pb qui donne au site *loxP* son orientation. La recombinaise Cre catalyse la recombinaison conservatrice réciproque entre deux sites *loxP* (Fig.28). Lorsque ces deux sites *loxP* sont orientés dans le même sens, la recombinaison induit la délétion du fragment d'ADN contenu entre les deux sites. Dans le cas d'orientation en sens inverse, la recombinaison induit l'inversion du fragment d'ADN compris entre ces deux sites. Pour être active chez la souris, la recombinaise Cre doit être localisé dans le noyau des cellules de mammifères. Ce système permet d'étudier la perte de fonction de n'importe quel gène dans n'importe quel tissu à condition d'avoir la lignée de souris transgénique qui exprime la recombinaise Cre dans le tissu en question. À ce jour, il est possible d'étudier la délétion d'un gène dans de nombreux type cellulaires comme les cellules de l'épiderme, les cellules du cerveau, les cellules du muscle squelettique ou du muscle lisse, les cellules germinales mâles, les hépatocytes, les adipocytes... (Metzger et al., 1999). Ce système *Cre/loxP* peut également être utilisé pour d'autres applications comme déclencher l'expression d'un transgène dans des cellules filles, supprimer les cassettes de sélection NeoR dans les knock-out ou les knock-in ou encore induire des translocations chromosomiques.



**Fig 31. Principe de la réaction catalysée par la recombinaise Cre. Excision du fragment d'ADN compris entre les deux séquences loxP orientées dans le même sens.**

## **M - Méthodes des figures 26 et 29**

### **Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (Figure 26):**

Dans tous les spectres, 128 transferts des points 16K ont été collectés, avec un délai de 3 secondes entre chaque transfert et une largeur de spectre de 7500 Hz. La fixation des ligands candidat à TCTP ou au lysosyme a été réalisée en utilisant le spectre 1D de relaxation. Les expériences sont d'abord mis au point en utilisant une gamme de relaxation d'un délai de 4 à 400 msec et appliquée sur TCTP seul. Tous les spectres sont analysés par le programme informatique du fabricant. Avant la transformation de Fourier, une rotation de 90° et le spectre zéro à 32K ont été appliqués.

### **Analyses par Résonance plasmonique de surface (Biacore Figure 26) :**

Matériels du fournisseur BIACORE (Uppsala, Sweden) : système BIACORE 3000, sensor chips CM5, surfactant P20, kit de couplage amine contenant du N-hydroxysuccinimide (NHS) et du N-Ethyl-N'-diméthylaminopropyl carbodiimide (EDC), éthanolamine. Les essais de biosensor ont été réalisés avec du tampon HBS-P comme tampon de migration (10mM HEPES, 40 mM chlorure de sodium, 0.005% surfactant P20, pH 7.4). Les différentes

molécules sont dissoutes dans du DMSO puis diluées dans le tampon de migration. Les canaux libres (activés et désactivés) sont utilisés comme contrôle. L'immobilisation de TCTP et du lysozyme est fait par injection de 35  $\mu$ l de TCTP ou lysozyme à la concentration de 100 $\mu$ g/ml dans un tampon acétate pH 4,9 ; sur une surface de sensor chip CM5 activée avec EDC/NHS, qui donne un signal approximatif de 5160 UR pour TCTP and 3080 UR pour le lysozyme. 20 $\mu$ l d'hydrochloride éthanolamine pH 8,5 sont ensuite ajoutés pour saturer les sites libres activés de la matrice. Les mesures de cinétique sont faites à 25°C avec un flux constant de 20 $\mu$ l/min. Pour les expériences, les drogues et l'histamine, à différentes concentrations (200, 100, 50 et 25 $\mu$ M) sont injectées pendant 1 min, puis suivie d'une phase de dissociation de 3min, sur les 3 canaux. Les paramètres de cinétique sont calculés avec le programme BIAeval 3.1. Les analyses utilisent le modèle de liaison Langmuir avec les coefficients  $K_a/K_d$  séparés pour la Sertraline et la Thioridazine. Le profil de liaison spécifique est obtenu après soustraction des signaux de réponse des canaux contrôle et émis par l'injection de tampon seul comportant le même % de DMSO que les échantillons de drogues.

### **Interaction TSAP6-TCTP (Figure 29)**

Immobilisation de TSAP6, MBP, TCTP ou lysozyme est réalisée par injection sur les surfaces activées avec EDC/NHS des sensor chip CM5. Les 35 $\mu$ L injectés de TSAP6, MBP, TCTP ou Lysozyme (100 $\mu$ g/ml dans du tampon acetate, pH 4.9), donnent un signal approximatif de 20000 UR pour TSAP6 et MBP, 4000 UR pour TCTP et le lysozyme. Cette étape est suivie par l'injection de 20 $\mu$ L d'éthanolamine hydrochloride, pH 8.5. Les canaux avec MBP et le lysozyme immobilisés sont utilisés comme contrôle. Toutes les expériences de liaisons sont réalisées à 25°C avec un flux constant de 30  $\mu$ l/mn. Pour le première série d'essais, TSAP6 et MBP sont immobilisés sur la sensor chip et TCTP (0.5, 1 et 2  $\mu$ M) est injecté durant 1 min, suivie d'une phase de dissociation de 3 min. Pour la deuxième série, TCTP et le lysozyme sont immobilisés sur la sensor chip et TSAP6 (0.43, 0.85, 1.7  $\mu$ M) est injecté durant 1 min 30, suivie d'une phase de dissociation de 3 min. La troisième série d'expériences étudie l'activité inhibitrice de la Thioridazine et de la Sertraline (100  $\mu$ M) après pré-incubation avec TCTP (1  $\mu$ M)

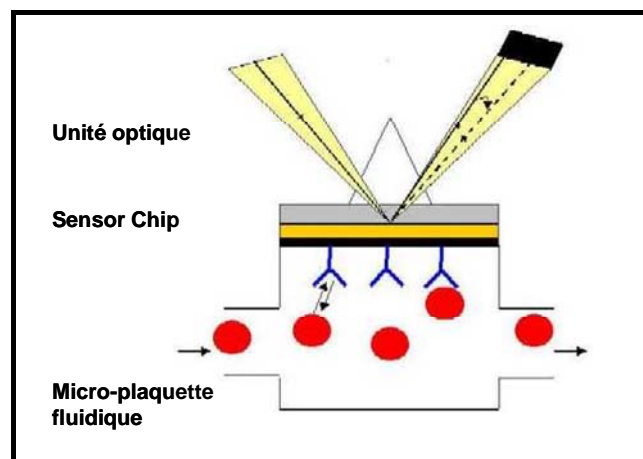
## N - Principe du Biacore

le Biacore est un automate qui permet de mesurer en temps réel toutes interactions biologiques sans aucun marquage des molécules. L'intérêt majeur de cette mesure en temps réel est de pouvoir visualiser la cinétique de l'interaction et d'en dégager ses caractéristiques propres. On peut ainsi mesurer les vitesses d'association et de dissociation et en déduire les constantes d'affinité et de dissociation. Le système de mesure du Biacore est composé de trois éléments :

**Le sensor chip :** Il comprend une lamelle de verre sur laquelle est déposée une fine pellicule d'or elle-même recouverte d'une couche de dextran carboxyméthylé sur lequel on couple de façon covalente la première molécule impliquée dans la réaction que l'on veut étudier. Après interaction, cette surface pourra être régénérée une centaine de fois avec un tampon acide, basique ou salin. Le couplage peut se faire par les groupements amines, par les sucres ou par les groupements thiols selon des procédés de chimie classique. Le couplage peut se faire par capture via un fragment Fc ou une biotine ou un tag (his, GST..) présents sur la molécule à immobiliser. Il existe également des sensor chips hydrophobes (HPA, L1) permettant de fixer des lipoprotéines, des liposomes, des préparations membranaires. Il existe enfin des sensor chips avec un dextran plus court ou ne comportant qu'une pellicule d'or.

**La micro-plaquette fluidique :** Elle contrôle l'injection (de 2 à 350 microlitres) et le débit d'injection (de 1 à 100 microlitres/mn) des réactifs à la surface du sensor chip. Elle est fabriquée dans du latex et comporte quatre boucles d'injection de 50 microns de diamètre.

**L'unité optique :** Une lumière polarisée est envoyée sur un prisme de verre, en contact direct avec la lamelle de verre du sensor chip. L'appareil enregistre en continu l'intensité de la lumière réfléchiée qui est modifiée par la résonance plasmonique de surface. Cette modification est directement proportionnelle au changement de l'indice de réfraction du milieu dans lequel baigne le dextran, c'est-à-dire qu'elle sera d'autant plus importante que la masse de la molécule qui se fixe sera élevée et que sa concentration sera forte.



## BIBLIOGRAPHIE PERSONNELLE

Susini L, Besse S, Duflaut D, Lespagnol A, Beekman C, Fiucci G, Atkinson AR, Busso D, Poussin P, Marine JC, Martinou JC, Cavarelli J, Moras D, Amson R, Telerman A. **TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function.** Cell Death Differ. 2008 Feb 15; [Epub ahead of print]

Tuynder M, Fiucci G, Prieur S, Lespagnol A, Geant A, Beaucourt S, Duflaut D, Besse S, Susini L, Cavarelli J, Moras D, Amson R, Telerman A. **Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion.** PNAS 2004 Oct 26;101(43):15364-9

Fiucci G, Beaucourt S, Duflaut D, Lespagnol A, Stumptner-Cuvelette P, Geant A, Buchwalter G, Tuynder M, Susini L, Lassalle JM, Wasylyk C, Wasylyk B, Oren M, Amson R, Telerman A. **Siah-1b is a direct transcriptional target of p53: identification of the functional p53 responsive element in the siah-1b promoter.** PNAS. 2004 Mar 9;101(10):3510-5. (annexe 2)

Fiucci G, Lespagnol A, Stumptner-Cuvelette P, Beaucourt S, Duflaut D, Susini L, Amson R, Telerman **Genomic organization and expression of mouse Tpt1 gene.** Genomics. 2003 Jun;81(6):570-8.

## BIBLIOGRAPHIE

- Aaronson, S. A. (1991). "Growth factors and cancer." *Science* 254(5035): 1146-53.
- Akao, Y., Y. Otsuki, et al. (1994). "Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes." *Cancer Res* 54(9): 2468-71.
- Akiyama, S., N. Shiraishi, et al. (1986). "Circumvention of multiple-drug resistance in human cancer cells by thioridazine, trifluoperazine, and chlorpromazine." *J Natl Cancer Inst* 76(5): 839-44.
- Alarcon-Vargas, D. and Z. Ronai (2002). "p53-Mdm2--the affair that never ends." *Carcinogenesis* 23(4): 541-7.
- Alves, P. M., O. Faure, et al. (2006). "STEAP, a prostate tumor antigen, is a target of human CD8+ T cells." *Cancer Immunol Immunother* 55(12): 1515-23.
- Ambrosini, G., E. B. Sambol, et al. (2007). "Mouse double minute antagonist Nutlin-3a enhances chemotherapy-induced apoptosis in cancer cells with mutant p53 by activating E2F1." *Oncogene* 26(24): 3473-81.
- Amson, R. B., M. Nemani, et al. (1996). "Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in p53-induced apoptosis: activation of the vertebrate homologue of the drosophila seven in absentia gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(9): 3953-7.
- Amzallag, N., B. J. Passer, et al. (2004). "TSAP6 facilitates the secretion of translationally controlled tumor protein/histamine-releasing factor via a nonclassical pathway." *J Biol Chem* 279(44): 46104-12.
- Andre, F., B. Escudier, et al. (2004). "Exosomes for cancer immunotherapy." *Ann Oncol* 15 Suppl 4: iv141-4.
- Andre, F., N. E. Scharzt, et al. (2002). "Tumor-derived exosomes: a new source of tumor rejection antigens." *Vaccine* 20 Suppl 4: A28-31.
- Andre, F., N. E. Scharzt, et al. (2002). "Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes." *Lancet* 360(9329): 295-305.
- Andree, H., H. Thiele, et al. (2006). "Expression of the human TPT1 gene coding for translationally controlled tumor protein (TCTP) is regulated by CREB transcription factors." *Gene* 380(2): 95-103.
- Andrei, C., C. Dazzi, et al. (1999). "The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles." *Mol Biol Cell* 10(5): 1463-75.
- Antonsson, B., S. Montessuit, et al. (2001). "Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells." *J Biol Chem* 276(15): 11615-23.
- Armstrong, J. F., M. H. Kaufman, et al. (1995). "High-frequency developmental abnormalities in p53-deficient mice." *Curr Biol* 5(8): 931-6.
- Ashcroft, M., Y. Taya, et al. (2000). "Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53." *Mol Cell Biol* 20(9): 3224-33.
- Ashkenazy-Shahar, M. and R. Beitner (1997). "Serotonin decreases cytoskeletal and cytosolic glycolytic enzymes and the levels of ATP and glucose 1,6-bisphosphate in skin, which is prevented by the calmodulin antagonists thioridazine and clotrimazole." *Biochem Mol Med* 60(2): 187-93.
- Ashkenazy-Shahar, M. and R. Beitner (1999). "Effects of Ca(2+)-ionophore A23187 and calmodulin antagonists on regulatory mechanisms of glycolysis and cell viability of NIH-3T3 fibroblasts." *Mol Genet Metab* 67(4): 334-42.



Aylon, Y. and M. Oren (2007). "Living with p53, dying of p53." *Cell* 130(4): 597-600.

Backman, S., V. Stambolic, et al. (2002). "PTEN function in mammalian cell size regulation." *Curr Opin Neurobiol* 12(5): 516-22.

Baker, S. J., S. Markowitz, et al. (1990). "Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53." *Science* 249(4971): 912-5.

Ballestar, E. and M. Esteller (2008). "Chapter 9 epigenetic gene regulation in cancer." *Adv Genet* 61: 247-67.

Barak, Y., T. Juven, et al. (1993). "mdm2 expression is induced by wild type p53 activity." *Embo J* 12(2): 461-8.

Barancik, M., L. Polekova, et al. (1994). "Reversal effects of several Ca(2+)-entry blockers, neuroleptics and local anaesthetics on P-glycoprotein-mediated vincristine resistance of L1210/VCR mouse leukaemic cell line." *Drugs Exp Clin Res* 20(1): 13-8.

Barbacid, M. (1987). "ras genes." *Annu Rev Biochem* 56: 779-827.

Bard, M. P., J. P. Hegmans, et al. (2004). "Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions." *Am J Respir Cell Mol Biol* 31(1): 114-21.

Bargonetti, J., P. N. Friedman, et al. (1991). "Wild-type but not mutant p53 immunopurified proteins bind to sequences adjacent to the SV40 origin of replication." *Cell* 65(6): 1083-91.

Bartram, C. R., A. de Klein, et al. (1983). "Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia." *Nature* 306(5940): 277-80.

Baynes, R. D., Y. J. Shih, et al. (1994). "Mechanism of production of the serum transferrin receptor." *Adv Exp Med Biol* 356: 61-8.

Becker, B., N. Morel, et al. (2004). "Blockade of calcium entry in smooth muscle cells by the antidepressant imipramine." *Biochem Pharmacol* 68(5): 833-42.

Benndorf, R., P. Nurnberg, et al. (1988). "Growth phase-dependent proteins of the Ehrlich ascites tumor analyzed by one- and two-dimensional electrophoresis." *Exp Cell Res* 174(1): 130-8.

Bergeron, L., G. I. Perez, et al. (1998). "Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice." *Genes Dev* 12(9): 1304-14.

Bheekha-Escura, R., D. W. MacGlashan, et al. (2000). "Human recombinant histamine-releasing factor activates human eosinophils and the eosinophilic cell line, AML14-3D10." *Blood* 96(6): 2191-8.

Bhisutthibhan, J. and S. R. Meshnick (2001). "Immunoprecipitation of [(3)H]dihydroartemisinin translationally controlled tumor protein (TCTP) adducts from Plasmodium falciparum-infected erythrocytes by using anti-TCTP antibodies." *Antimicrob Agents Chemother* 45(8): 2397-9.

Bhisutthibhan, J., X. Q. Pan, et al. (1998). "The Plasmodium falciparum translationally controlled tumor protein homolog and its reaction with the antimalarial drug artemisinin." *J Biol Chem* 273(26): 16192-8.

Bini, L., H. Heid, et al. (1997). "Two-dimensional gel electrophoresis of Caenorhabditis elegans homogenates and identification of protein spots by microsequencing." *Electrophoresis* 18(3-4): 557-62.

Bischoff, J. R., L. Anderson, et al. (1998). "A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers." *Embo J* 17(11): 3052-65.

Bishop, J. M. (1985). "Viral oncogenes." *Cell* 42(1): 23-38.

Blott, E. J. and G. M. Griffiths (2002). "Secretory lysosomes." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(2): 122-31.

Bodine, S. C., T. N. Stitt, et al. (2001). "Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo." *Nat Cell Biol* 3(11): 1014-9.

Boguski, M. S. and F. McCormick (1993). "Proteins regulating Ras and its relatives." *Nature* 366(6456): 643-54.

Bohm, H., R. Benndorf, et al. (1989). "The growth-related protein P23 of the Ehrlich ascites tumor: translational control, cloning and primary structure." *Biochem Int* 19(2): 277-86.

Bohm, H., B. Gross, et al. (1991). "The 5'-untranslated region of p23 mRNA from the Ehrlich ascites tumor is involved in translation control of the growth related protein p23." *Biomed Biochim Acta* 50(12): 1193-203.

Bommer, U. A. and B. J. Thiele (2004). "The translationally controlled tumour protein (TCTP)." *Int J Biochem Cell Biol* 36(3): 379-85.

Brenner, S., M. Johnson, et al. (2000). "Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays." *Nat Biotechnol* 18(6): 630-4.

Brenner, S., S. R. Williams, et al. (2000). "In vitro cloning of complex mixtures of DNA on microbeads: physical separation of differentially expressed cDNAs." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(4): 1665-70.

Brown, S. and N. L. Taylor (2000). "Inhibition of mitochondrial succinate oxidation by antipsychotic medication." *Vet Hum Toxicol* 42(4): 209-11.

Brusselle, G. G., K. R. Bracke, et al. (2006). "Murine models of COPD." *Pulm Pharmacol Ther* 19(3): 155-65.

Bykov, V. J., N. Issaeva, et al. (2005). "Reactivation of mutant p53 and induction of apoptosis in human tumor cells by maleimide analogs." *J Biol Chem* 280(34): 30384-91.

Cahill, D. P., C. Lengauer, et al. (1998). "Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers." *Nature* 392(6673): 300-3.

Cans, C., B. J. Passer, 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(24): 13892-7.

Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." *Science* 296(5573): 1655-7.

Carafoli, E. (2002). "Calcium signaling: a tale for all seasons." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(3): 1115-22.

Cardoso, W. V., H. S. Sekhon, et al. (1993). "Collagen and elastin in human pulmonary emphysema." *Am Rev Respir Dis* 147(4): 975-81.

Cartron, P. F., H. Arokium, et al. (2005). "Distinct domains control the addressing and the insertion of Bax into mitochondria." *J Biol Chem* 280(11): 10587-98.

Cartron, P. F., C. Moreau, et al. (2002). "Involvement of the N-terminus of Bax in its intracellular localization and function." *FEBS Lett* 512(1-3): 95-100.

Cartron, P. F., L. Oliver, et al. (2002). "The expression of a new variant of the pro-apoptotic molecule Bax, Baxpsi, is correlated with an increased survival of glioblastoma multiforme patients." *Hum Mol Genet* 11(6): 675-87.

Carvajal, D., C. Tovar, et al. (2005). "Activation of p53 by MDM2 antagonists can protect proliferating cells from mitotic inhibitors." *Cancer Res* 65(5): 1918-24.

Castillo-Davis, C. I., F. A. Kondrashov, et al. (2004). "The functional genomic distribution of protein divergence in two animal phyla: coevolution, genomic conflict, and constraint." *Genome Res* 14(5): 802-11.

Cavenee, W. K., T. P. Dryja, et al. (1983). "Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma." *Nature* 305(5937): 779-84.

Cavenee, W. K. and R. L. White (1995). "The genetic basis of cancer." *Sci Am* 272(3): 72-9.

Chae, J., I. Choi, et al. (2006). "Homology modeling and molecular docking study of translationally controlled tumor protein and artemisinin." *Arch Pharm Res* 29(1): 50-8.

Challita-Eid, P. M., K. Morrison, et al. (2007). "Monoclonal antibodies to six-transmembrane epithelial antigen of the prostate-1 inhibit intercellular communication in vitro and growth of human tumor xenografts in vivo." *Cancer Res* 67(12): 5798-805.

Chaput, N., J. Taieb, et al. (2004). "Exosome-based immunotherapy." *Cancer Immunol Immunother* 53(3): 234-9.

Chen, H. H., H. J. Zhou, et al. (2003). "Inhibition of human cancer cell line growth and human umbilical vein endothelial cell angiogenesis by artemisinin derivatives in vitro." *Pharmacol Res* 48(3): 231-6.

Chen, J., X. Wu, et al. (1996). "mdm-2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein." *Mol Cell Biol* 16(5): 2445-52.

Chen, S. H., P. S. Wu, et al. (2007). "A knockout mouse approach reveals that TCTP functions as an essential factor for cell proliferation and survival in a tissue- or cell type-specific manner." *Mol Biol Cell* 18(7): 2525-32.

Cheng, J., J. K. Yee, et al. (1992). "Suppression of acute lymphoblastic leukemia by the human wild-type p53 gene." *Cancer Res* 52(1): 222-6.

Chittenden, T., C. Flemington, et al. (1995). "A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions." *Embo J* 14(22): 5589-96.

Clayton, A., J. Court, et al. (2001). "Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immunomagnetic isolation and flow cytometry." *J Immunol Methods* 247(1-2): 163-74.

Coll-Mulet, L., D. Iglesias-Serret, et al. (2006). "MDM2 antagonists activate p53 and synergize with genotoxic drugs in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells." *Blood* 107(10): 4109-14.

Crawford, L. V., D. C. Pim, et al. (1981). "Detection of a common feature in several human tumor cell lines--a 53,000-dalton protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(1): 41-5.

Daniel, W. A. (2003). "Mechanisms of cellular distribution of psychotropic drugs. Significance for drug action and interactions." *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(1): 65-73.

Daniel, W. A., A. Haduch, et al. (2006). "Direct and indirect interactions between antidepressant drugs and CYP2C6 in the rat liver during long-term treatment." *Eur Neuropsychopharmacol* 16(8): 580-7.

Daniel, W. A. and J. Wojcikowski (1999). "The role of lysosomes in the cellular distribution of thioridazine and potential drug interactions." *Toxicol Appl Pharmacol* 158(2): 115-24.

Daniel, W. A., J. Wojcikowski, et al. (2001). "Intracellular distribution of psychotropic drugs in the grey and white matter of the brain: the role of lysosomal trapping." *Br J Pharmacol* 134(4): 807-14.

de Leon, J., S. C. Armstrong, et al. (2006). "Clinical guidelines for psychiatrists for the use of pharmacogenetic testing for CYP450 2D6 and CYP450 2C19." *Psychosomatics* 47(1): 75-85.

de Stanchina, E., M. E. McCurrach, et al. (1998). "E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor." *Genes Dev* 12(15): 2434-42.

DeLeo, A. B., G. Jay, et al. (1979). "Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(5): 2420-4.

Deng, C., P. Zhang, et al. (1995). "Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control." *Cell* 82(4): 675-84.

Denzer, K., M. J. Kleijmeer, et al. (2000). "Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device." *J Cell Sci* 113 Pt 19: 3365-74.

Desagher, S., A. Osen-Sand, et al. (1999). "Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis." *J Cell Biol* 144(5): 891-901.

DeVane, C. L., H. L. Liston, et al. (2002). "Clinical pharmacokinetics of sertraline." *Clin Pharmacokinet* 41(15): 1247-66.

Dey, A., E. T. Wong, et al. (2007). "Nutlin-3 inhibits the NFkappaB pathway in a p53-dependent manner: implications in lung cancer therapy." *Cell Cycle* 6(17): 2178-85.

Di Fiore, P. P., J. H. Pierce, et al. (1987). "erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells." *Science* 237(4811): 178-82.

Diller, L., J. Kassel, et al. (1990). "p53 functions as a cell cycle control protein in osteosarcomas." *Mol Cell Biol* 10(11): 5772-81.

Donehower, L. A., M. Harvey, et al. (1992). "Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours." *Nature* 356(6366): 215-21.

Eckstein-Ludwig, U., R. J. Webb, et al. (2003). "Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum." *Nature* 424(6951): 957-61.

Edwards, S., C. Campbell, et al. (2005). "Expression analysis onto microarrays of randomly selected cDNA clones highlights HOXB13 as a marker of human prostate cancer." *Br J Cancer* 92(2): 376-81.

Efferth, T. and M. Volm (1993). "Reversal of doxorubicin-resistance in sarcoma 180 tumor cells by inhibition of different resistance mechanisms." *Cancer Lett* 70(3): 197-202.

Egger, G., G. Liang, et al. (2004). "Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy." *Nature* 429(6990): 457-63.

El Khissiin, A. and G. Leclercq (1999). "Implication of proteasome in estrogen receptor degradation." *FEBS Lett* 448(1): 160-6.

el Marjou, F., K. P. Janssen, et al. (2004). "Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium." *Genesis* 39(3): 186-93.

el-Deiry, W. S., S. E. Kern, et al. (1992). "Definition of a consensus binding site for p53." *Nat Genet* 1(1): 45-9.

el-Deiry, W. S., T. Tokino, et al. (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." *Cell* 75(4): 817-25.

Elledge, S. J. (1996). "Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis." *Science* 274(5293): 1664-72.

Enyeart, J. J., B. A. Biagi, et al. (1992). "Preferential block of T-type calcium channels by neuroleptics in neural crest-derived rat and human C cell lines." *Mol Pharmacol* 42(2): 364-72.

Er, E., L. Oliver, et al. (2006). "Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax." *Biochim Biophys Acta* 1757(9-10): 1301-11.

Ernst, T., M. Hergenhahn, et al. (2002). "Decrease and gain of gene expression are equally discriminatory markers for prostate carcinoma: a gene expression analysis on total and microdissected prostate tissue." *Am J Pathol* 160(6): 2169-80.

Escudier, B., T. Dorval, et al. (2005). "Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial." *J Transl Med* 3(1): 10.

Esteller, M. (2007). "Epigenetics provides a new generation of oncogenes and tumour-suppressor genes." *Br J Cancer* 96 Suppl: R26-30.

Evan, G. I. and K. H. Vousden (2001). "Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer." *Nature* 411(6835): 342-8.

Ewart-Toland, A., P. Briassouli, et al. (2003). "Identification of Stk6/STK15 as a candidate low-penetrance tumor-susceptibility gene in mouse and human." *Nat Genet* 34(4): 403-12.

Faivre, S., G. Kroemer, et al. (2006). "Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents." *Nat Rev Drug Discov* 5(8): 671-88.

Farsad, K. (2002). "Exosomes: novel organelles implicated in immunomodulation and apoptosis." *Yale J Biol Med* 75(2): 95-101.

Feng, Y., D. Liu, et al. (2007). "Solution structure and mapping of a very weak calcium-binding site of human translationally controlled tumor protein by NMR." *Arch Biochem Biophys* 467(1): 48-57.

Fevrier, B. and G. Raposo (2004). "Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages." *Curr Opin Cell Biol* 16(4): 415-21.

Fingar, D. C. and J. Blenis (2004). "Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression." *Oncogene* 23(18): 3151-71.

Finlay, C. A., P. W. Hinds, et al. (1989). "The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation." *Cell* 57(7): 1083-93.

Fiucci, G., S. Beaucourt, et al. (2004). "Siah-1b is a direct transcriptional target of p53: identification of the functional p53 responsive element in the siah-1b promoter." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(10): 3510-5.

Fiucci, G., A. Lespagnol, et al. (2003). "Genomic organization and expression of mouse Tpt1 gene." *Genomics* 81(6): 570-8.

Flieger, O., A. Engling, et al. (2003). "Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter." *FEBS Lett* 551(1-3): 78-86.

Foronjy, R. and J. D'Armiento (2001). "The role of collagenase in emphysema." *Respir Res* 2(6): 348-52.

Franke, T. F., D. R. Kaplan, et al. (1997). "Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate." *Science* 275(5300): 665-8.

Freeman, D. J., A. G. Li, et al. (2003). "PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms." *Cancer Cell* 3(2): 117-30.

Fujita, T., K. Felix, et al. (2008). "Human fortilin is a molecular target of dihydroartemisinin." *FEBS Lett* 582(7): 1055-60.

Fung, S. M., G. Ramsay, et al. (2002). "Mutations in *Drosophila myb* lead to centrosome amplification and genomic instability." *Development* 129(2): 347-59.

Gachet, Y., S. Tournier, et al. (1999). "The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle." *J Cell Sci* 112 ( Pt 8): 1257-71.

Gallagher, C. H., J. H. Koch, et al. (1965). "The effect of phenothiazine on the metabolism of liver mitochondria." *Biochem Pharmacol* 14(5): 789-97.

Gal-Yam, E. N., Y. Saito, et al. (2008). "Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy." *Annu Rev Med* 59: 267-80.

Gannon, J. V. and D. P. Lane (1991). "Protein synthesis required to anchor a mutant p53 protein which is temperature-sensitive for nuclear transport." *Nature* 349(6312): 802-6.

Garcia-Hernandez Mde, L., A. Gray, et al. (2007). "In vivo effects of vaccination with six-transmembrane epithelial antigen of the prostate: a candidate antigen for treating prostate cancer." *Cancer Res* 67(3): 1344-51.

Gardella, S., C. Andrei, et al. (2002). "The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway." *EMBO Rep* 3(10): 995-1001.

Geminard, C., A. de Gassart, et al. (2002). "Reticulocyte maturation: mitoptosis and exosome release." *Biocell* 26(2): 205-15.

Gil-Ad, I., B. Shtauf, et al. (2004). "Characterization of phenothiazine-induced apoptosis in neuroblastoma and glioma cell lines: clinical relevance and possible application for brain-derived tumors." *J Mol Neurosci* 22(3): 189-98.

Gil-Ad, I., B. Shtauf, et al. (2004). "Characterization of phenothiazine-induced apoptosis in neuroblastoma and glioma cell lines: clinical relevance and possible application for brain-derived tumors." *J Mol Neurosci* 22(3): 189-98.

Gil-Ad, I., B. Shtauf, et al. (2006). "Phenothiazines induce apoptosis in a B16 mouse melanoma cell line and attenuate in vivo melanoma tumor growth." *Oncol Rep* 15(1): 107-12.

Goberdhan, D. C., N. Paricio, et al. (1999). "Drosophila tumor suppressor PTEN controls cell size and number by antagonizing the Chico/PI3-kinase signaling pathway." *Genes Dev* 13(24): 3244-58.

Goberdhan, D. C. and C. Wilson (2003). "PTEN: tumour suppressor, multifunctional growth regulator and more." *Hum Mol Genet* 12 Spec No 2: R239-48.

Gopalakrishnan, M. and D. J. Triggle (1992). "Regulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels by chronic glyburide and pinacidil administration." *Biochem Pharmacol* 44(9): 1843-7.

Goping, I. S., A. Gross, et al. (1998). "Regulated targeting of BAX to mitochondria." *J Cell Biol* 143(1): 207-15.

Gould, S. J., A. M. Booth, et al. (2003). "The Trojan exosome hypothesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(19): 10592-7.

Graat, H. C., J. E. Carette, et al. (2007). "Enhanced tumor cell kill by combined treatment with a small-molecule antagonist of mouse double minute 2 and adenoviruses encoding p53." *Mol Cancer Ther* 6(5): 1552-61.

Graidist, P., A. Phongdara, et al. (2004). "Antiapoptotic protein partners fortilin and MCL1 independently protect cells from 5-fluorouracil-induced cytotoxicity." *J Biol Chem* 279(39): 40868-75.

Graidist, P., M. Yazawa, et al. (2007). "Fortilin binds Ca<sup>2+</sup> and blocks Ca<sup>2+</sup>-dependent apoptosis in vivo." *Biochem J* 408(2): 181-91.

Gross, A., J. Jockel, et al. (1998). "Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis." *Embo J* 17(14): 3878-85.

Gross, B., M. Gaestel, et al. (1989). "cDNA sequence coding for a translationally controlled human tumor protein." *Nucleic Acids Res* 17(20): 8367.

Gruenberg, J. and F. R. Maxfield (1995). "Membrane transport in the endocytic pathway." *Curr Opin Cell Biol* 7(4): 552-63.

Gueven, N., O. J. Becherel, et al. (2006). "Defective p53 response and apoptosis associated with an ataxia-telangiectasia-like phenotype." *Cancer Res* 66(6): 2907-12.

Guihard, G., G. Bellot, et al. (2004). "The mitochondrial apoptosis-induced channel (MAC) corresponds to a late apoptotic event." *J Biol Chem* 279(45): 46542-50.

Guthrie, S. K. (1991). "Sertraline: a new specific serotonin reuptake blocker." *Dicp* 25(9): 952-61.

Haduch, A., J. Wojcikowski, et al. (2005). "Effect of short- and long-term treatment with antidepressant drugs on the activity of rat CYP2A in the liver." *Pharmacol Rep* 57(6): 774-81.

Hafeez, W., G. Ciliberto, et al. (1992). "Constitutive and modulated expression of the human alpha 1 antitrypsin gene. Different transcriptional initiation sites used in three different cell types." *J Clin Invest* 89(4): 1214-22.

Haghighat, N. G. and L. Ruben (1992). "Purification of novel calcium binding proteins from *Trypanosoma brucei*: properties of 22-, 24- and 38-kilodalton proteins." *Mol Biochem Parasitol* 51(1): 99-110.

Harlow, E., D. C. Pim, et al. (1981). "Complex of simian virus 40 large-T antigen and host 53,000-molecular-weight protein in monkey cells." *J Virol* 37(2): 564-73.

Harris, H., O. J. Miller, et al. (1969). "Suppression of malignancy by cell fusion." *Nature* 223(5204): 363-8.

Haupt, Y., R. Maya, et al. (1997). "Mdm2 promotes the rapid degradation of p53." *Nature* 387(6630): 296-9.

Hay, N. and N. Sonenberg (2004). "Upstream and downstream of mTOR." *Genes Dev* 18(16): 1926-45.

Hegmans, J. P., M. P. Bard, et al. (2004). "Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells." *Am J Pathol* 164(5): 1807-15.

Heijnen, H. F., A. E. Schiel, et al. (1999). "Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules." *Blood* 94(11): 3791-9.

Heimlich, G., A. D. McKinnon, et al. (2004). "Bax-induced cytochrome c release from mitochondria depends on alpha-helices-5 and -6." *Biochem J* 378(Pt 1): 247-55.

Heisterkamp, N., J. R. Stephenson, et al. (1983). "Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia." *Nature* 306(5940): 239-42.

Helmeste, D. M., S. W. Tang, et al. (1995). "Serotonin uptake inhibitors modulate intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization in platelets." *Eur J Pharmacol* 288(3): 373-7.

Herman, J. G. and S. B. Baylin (2003). "Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation." *N Engl J Med* 349(21): 2042-54.

Hogarty, M. D. (2003). "The requirement for evasion of programmed cell death in neuroblastomas with MYCN amplification." *Cancer Lett* 197(1-2): 173-9.

Hortobagyi, G. N. (2005). "Trastuzumab in the treatment of breast cancer." *N Engl J Med* 353(16): 1734-6.

Hrabe de Angelis, M. H., H. Flaswinkel, et al. (2000). "Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis." *Nat Genet* 25(4): 444-7.

Hsieh, J. K., D. Yap, et al. (2002). "Novel function of the cyclin A binding site of E2F in regulating p53-induced apoptosis in response to DNA damage." *Mol Cell Biol* 22(1): 78-93.

Hsu, Y. C., J. J. Chern, et al. (2007). "Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase." *Nature* 445(7129): 785-8.

Hsu, Y. T., K. G. Wolter, et al. (1997). "Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8): 3668-72.

Hsu, Y. T. and R. J. Youle (1998). "Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations." *J Biol Chem* 273(17): 10777-83.

Huang, H., C. J. Potter, et al. (1999). "PTEN affects cell size, cell proliferation and apoptosis during Drosophila eye development." *Development* 126(23): 5365-72.

Hubert, R. S., I. Vivanco, et al. (1999). "STEAP: a prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(25): 14523-8.

Hunter-Lavin, C., E. L. Davies, et al. (2004). "Hsp70 release from peripheral blood mononuclear cells." *Biochem Biophys Res Commun* 324(2): 511-7.

Inoki, K., M. N. Corradetti, et al. (2005). "Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease." *Nat Genet* 37(1): 19-24.

Inoki, K., Y. Li, et al. (2002). "TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling." *Nat Cell Biol* 4(9): 648-57.

Inoki, K., T. Zhu, et al. (2003). "TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival." *Cell* 115(5): 577-90.

James, C. D., E. Carlbom, et al. (1988). "Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages." *Cancer Res* 48(19): 5546-51.

Janz, M., T. Stuhmer, et al. (2007). "Pharmacologic activation of p53-dependent and p53-independent apoptotic pathways in Hodgkin/Reed-Sternberg cells." *Leukemia* 21(4): 772-9.

Jeske, N. A., M. J. Glucksman, et al. (2004). "Metalloendopeptidase EC3.4.24.15 is constitutively released from the exofacial leaflet of lipid rafts in GT1-7 cells." *J Neurochem* 90(4): 819-28.

Jiang, M., N. Pabla, et al. (2007). "Nutlin-3 protects kidney cells during cisplatin therapy by suppressing Bax/Bak activation." *J Biol Chem* 282(4): 2636-45.

Johnstone, R. M. (1992). "The Jeanne Manery-Fisher Memorial Lecture 1991. Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins." *Biochem Cell Biol* 70(3-4): 179-90.

Johnstone, R. M., M. Adam, et al. (1987). "Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)." *J Biol Chem* 262(19): 9412-20.

Johnstone, R. M. and J. Ahn (1990). "A common mechanism may be involved in the selective loss of plasma membrane functions during reticulocyte maturation." *Biomed Biochim Acta* 49(2-3): S70-5.

Johnstone, R. M., A. Mathew, et al. (1991). "Exosome formation during maturation of mammalian and avian reticulocytes: evidence that exosome release is a major route for externalization of obsolete membrane proteins." *J Cell Physiol* 147(1): 27-36.

Jones, S. N., A. E. Roe, et al. (1995). "Rescue of embryonic lethality in Mdm2-deficient mice by absence of p53." *Nature* 378(6553): 206-8.

Jost, C. A., M. C. Marin, et al. (1997). "p73 is a simian [correction of human] p53-related protein that can induce apoptosis." *Nature* 389(6647): 191-4.



Jung, J., M. Kim, et al. (2004). "Translationally controlled tumor protein interacts with the third cytoplasmic domain of Na,K-ATPase alpha subunit and inhibits the pump activity in HeLa cells." *J Biol Chem* 279(48): 49868-75.

Justice, M. J., J. K. Noveroske, et al. (1999). "Mouse ENU mutagenesis." *Hum Mol Genet* 8(10): 1955-63.

Kaghad, M., H. Bonnet, et al. (1997). "Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers." *Cell* 90(4): 809-19.

Kakiuchi, S., Y. Daigo, et al. (2003). "Genome-wide analysis of organ-preferential metastasis of human small cell lung cancer in mice." *Mol Cancer Res* 1(7): 485-99.

Kalyoncu, N. I., R. Ozyavuz, et al. (1999). "Sertraline inhibits the contractile responses to noradrenaline, KCl and electrical field stimulation of rat isolated vas deferens." *J Auton Pharmacol* 19(6): 365-9.

Kang, H. S., M. J. Lee, et al. (2001). "Molecular identification of IgE-dependent histamine-releasing factor as a B cell growth factor." *J Immunol* 166(11): 6545-54.

Kastan, M. B., O. Onyekwere, et al. (1991). "Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage." *Cancer Res* 51(23 Pt 1): 6304-11.

Kern, S. E., K. W. Kinzler, et al. (1991). "Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein." *Science* 252(5013): 1708-11.

Khuri, F. R., J. Nemunaitis, et al. (2000). "A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer." *Nat Med* 6(8): 879-85.

Kim, B., S. Bang, et al. (2003). "Expression profiling and subtype-specific expression of stomach cancer." *Cancer Res* 63(23): 8248-55.

Kim, M., Y. Jung, et al. (2000). "Identification of the calcium binding sites in translationally controlled tumor protein." *Arch Pharm Res* 23(6): 633-6.

Kim, M. J., J. S. Kwon, et al. (2008). "Transgenic overexpression of translationally controlled tumor protein induces systemic hypertension via repression of Na(+),K(+)-ATPase." *J Mol Cell Cardiol* 44(1): 151-9.

Kishimoto, H., K. Hamada, et al. (2003). "Physiological functions of Pten in mouse tissues." *Cell Struct Funct* 28(1): 11-21.

Kitayama, H., Y. Sugimoto, et al. (1989). "A ras-related gene with transformation suppressor activity." *Cell* 56(1): 77-84.

Klapper, L. N., S. Glathe, et al. (1999). "The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(9): 4995-5000.

Klein, C. and L. T. Vassilev (2004). "Targeting the p53-MDM2 interaction to treat cancer." *Br J Cancer* 91(8): 1415-9.

Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 68(4): 820-3.

Knudson, A. G. (2001). "Two genetic hits (more or less) to cancer." *Nat Rev Cancer* 1(2): 157-62.

Kojima, K., M. Konopleva, et al. (2005). "MDM2 antagonists induce p53-dependent apoptosis in AML: implications for leukemia therapy." *Blood* 106(9): 3150-9.

Kolodner, R. D., C. D. Putnam, et al. (2002). "Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*." *Science* 297(5581): 552-7.

Konecny, G. E., M. D. Pegram, et al. (2006). "Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells." *Cancer Res* 66(3): 1630-9.

Korkmaz, K. S., C. Elbi, et al. (2002). "Molecular cloning and characterization of STAMP1, a highly prostate-specific six transmembrane protein that is overexpressed in prostate cancer." *J Biol Chem* 277(39): 36689-96.

Kozioł, M. J., N. Garrett, et al. (2007). "Tpt1 activates transcription of oct4 and nanog in transplanted somatic nuclei." *Curr Biol* 17(9): 801-7.

Krajewski, S., S. Tanaka, et al. (1993). "Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes." *Cancer Res* 53(19): 4701-14.

Krystal, G. W., S. Honsawek, et al. (2000). "The selective tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits small cell lung cancer growth." *Clin Cancer Res* 6(8): 3319-26.

Kubbutat, M. H., S. N. Jones, et al. (1997). "Regulation of p53 stability by Mdm2." *Nature* 387(6630): 299-303.

Kubiak, J. Z., F. Bazile, et al. (2008). "Temporal regulation of embryonic M-phases." *Folia Histochem Cytobiol* 46(1): 5-9.

Kubicek, S. and T. Jenuwein (2004). "A crack in histone lysine methylation." *Cell* 119(7): 903-6.

Kubicek, S., G. Schotta, et al. (2006). "The role of histone modifications in epigenetic transitions during normal and perturbed development." *Ernst Schering Res Found Workshop*(57): 1-27.

Kumagai, T., J. G. Davis, et al. (2001). "The role of distinct p185neu extracellular subdomains for dimerization with the epidermal growth factor (EGF) receptor and EGF-mediated signaling." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(10): 5526-31.

Kuratomi, Y., S. Akiyama, et al. (1986). "Thioridazine enhances lysosomal accumulation of epidermal growth factor and toxicity of conjugates of epidermal growth factor with *Pseudomonas* exotoxin." *Exp Cell Res* 162(2): 436-48.

Lane, D. P. (1992). "Cancer. p53, guardian of the genome." *Nature* 358(6381): 15-6.

Langdon, J. M., B. M. Vonakis, et al. (2004). "Identification of the interaction between the human recombinant histamine releasing factor/translationally controlled tumor protein and elongation factor-1 delta (also known as eElongation factor-1B beta)." *Biochim Biophys Acta* 1688(3): 232-6.

Laulagnier, K., C. Motta, et al. (2004). "Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization." *Biochem J* 380(Pt 1): 161-71.

Lengauer, C., K. W. Kinzler, et al. (1997). "Genetic instability in colorectal cancers." *Nature* 386(6625): 623-7.

Lengauer, C., K. W. Kinzler, et al. (1998). "Genetic instabilities in human cancers." *Nature* 396(6712): 643-9.

Levine, A. J. (1989). "The p53 tumor suppressor gene and gene product." *Princess Takamatsu Symp* 20: 221-30.

Li, D. M. and H. Sun (1997). "TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta." *Cancer Res* 57(11): 2124-9.

Li, F., D. Zhang, et al. (2001). "Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein." *J Biol Chem* 276(50): 47542-9.

Li, J., C. Yen, et al. (1997). "PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer." *Science* 275(5308): 1943-7.

Li, K., Y. Li, et al. (2000). "Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis." *Cell* 101(4): 389-99.

Li, M., C. L. Brooks, et al. (2003). "Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2." *Science* 302(5652): 1972-5.

Liang, P. and A. B. Pardee (1992). "Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction." *Science* 257(5072): 967-71.

Liaw, D., D. J. Marsh, et al. (1997). "Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome." *Nat Genet* 16(1): 64-7.

Lin, X. P., N. Almqvist, et al. (2005). "Human small intestinal epithelial cells constitutively express the key elements for antigen processing and the production of exosomes." *Blood Cells Mol Dis* 35(2): 122-8.

Lindsten, T., A. J. Ross, et al. (2000). "The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues." *Mol Cell* 6(6): 1389-99.

Liu, H., H. W. Peng, et al. (2005). "Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP." *Mol Cell Biol* 25(8): 3117-26.

Lo, T. S., Z. Cui, et al. (2007). "Molecular coordinated regulation of gene expression during ovarian development in the penaeid shrimp." *Mar Biotechnol (NY)* 9(4): 459-68.

Lowther, W. T., H. Weissbach, et al. (2002). "The mirrored methionine sulfoxide reductases of *Neisseria gonorrhoeae* pilB." *Nat Struct Biol* 9(5): 348-52.

Lowy, D. R. and B. M. Willumsen (1993). "Function and regulation of ras." *Annu Rev Biochem* 62: 851-91.

Lu, H. and A. J. Levine (1995). "Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(11): 5154-8.

Lund, A. H. and M. van Lohuizen (2004). "Epigenetics and cancer." *Genes Dev* 18(19): 2315-35.

MacDonald, S. M. (1996). "Histamine-releasing factors." *Curr Opin Immunol* 8(6): 778-83.

MacDonald, S. M., L. M. Lichtenstein, et al. (1987). "Studies of IgE-dependent histamine releasing factors: heterogeneity of IgE." *J Immunol* 139(2): 506-12.

MacDonald, S. M., T. Rafnar, et al. (1995). "Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor." *Science* 269(5224): 688-90.

Machlenkin, A., A. Paz, et al. (2005). "Human CTL epitopes prostatic acid phosphatase-3 and six-transmembrane epithelial antigen of prostate-3 as candidates for prostate cancer immunotherapy." *Cancer Res* 65(14): 6435-42.

Mack, M., A. Kleinschmidt, et al. (2000). "Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection." *Nat Med* 6(7): 769-75.

MacLachlan, T. K., R. Takimoto, et al. (2002). "BRCA1 directs a selective p53-dependent transcriptional response towards growth arrest and DNA repair targets." *Mol Cell Biol* 22(12): 4280-92.

Maehama, T., G. S. Taylor, et al. (2001). "PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases." *Annu Rev Biochem* 70: 247-79.

Maheswaran, S., C. Englert, et al. (1995). "The WT1 gene product stabilizes p53 and inhibits p53-mediated apoptosis." *Genes Dev* 9(17): 2143-56.

Marsh, D. J., J. B. Kum, et al. (1999). "PTEN mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggest a single entity with Cowden syndrome." *Hum Mol Genet* 8(8): 1461-72.

Marshall, C. J. (1991). "Tumor suppressor genes." *Cell* 64(2): 313-26.

Martinez, J., I. Georgoff, et al. (1991). "Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein." *Genes Dev* 5(2): 151-9.

Mayo, L. D., J. E. Dixon, et al. (2002). "PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy." *J Biol Chem* 277(7): 5484-9.

Mayo, L. D. and D. B. Donner (2001). "A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(20): 11598-603.

Memon, A. R. (2004). "The role of ADP-ribosylation factor and SAR1 in vesicular trafficking in plants." *Biochim Biophys Acta* 1664(1): 9-30.

Mercer, W. E., M. T. Shields, et al. (1990). "Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(16): 6166-70.

Metzger, D. and R. Feil (1999). "Engineering the mouse genome by site-specific recombination." *Curr Opin Biotechnol* 10(5): 470-6.

Michael, D. and M. Oren (2002). "The p53 and Mdm2 families in cancer." *Curr Opin Genet Dev* 12(1): 53-9.

Michaeli, D. and H. H. Fudenberg (1974). "Antibodies to collagen in patients with emphysema." *Clin Immunol Immunopathol* 3(2): 187-92.

Michalovitz, D., O. Halevy, et al. (1990). "Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53." *Cell* 62(4): 671-80.

Mihaylov, I. S., T. Kondo, et al. (2002). "Control of DNA replication and chromosome ploidy by geminin and cyclin A." *Mol Cell Biol* 22(6): 1868-80.

Milner, J. and E. A. Medcalf (1990). "Temperature-dependent switching between "wild-type" and "mutant" forms of p53-Val135." *J Mol Biol* 216(3): 481-4.

Mobius, W., E. van Donselaar, et al. (2003). "Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway." *Traffic* 4(4): 222-31.

Moldes, M., F. Lasnier, et al. (2001). "Tumor necrosis factor-alpha-induced adipose-related protein (TIARP), a cell-surface protein that is highly induced by tumor necrosis factor-alpha and adipose conversion." *J Biol Chem* 276(36): 33938-46.

Momand, J., D. Jung, et al. (1998). "The MDM2 gene amplification database." *Nucleic Acids Res* 26(15): 3453-9.

Momand, J., G. P. Zambetti, et al. (1992). "The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation." *Cell* 69(7): 1237-45.

Mondal, N. and J. D. Parvin (2005). "The tumor suppressor protein p53 functions similarly to p63 and p73 in activating transcription in vitro." *Cancer Biol Ther* 4(4): 414-8.

Montes de Oca Luna, R., D. S. Wagner, et al. (1995). "Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53." *Nature* 378(6553): 203-6.

Morse, M. A., J. Garst, et al. (2005). "A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer." *J Transl Med* 3(1): 9.

Motoyama, N., F. Wang, et al. (1995). "Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice." *Science* 267(5203): 1506-10.

Moulding, D. A., J. A. Quayle, et al. (1998). "Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival." *Blood* 92(7): 2495-502.

Mousavizadeh, K., P. Ghafourifar, et al. (2002). "Calcium channel blocking activity of thioridazine, clomipramine and fluoxetine in isolated rat vas deferens: a relative potency measurement study." *J Urol* 168(6): 2716-9.

Muchmore, S. W., M. Sattler, et al. (1996). "X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death." *Nature* 381(6580): 335-41.

Murray, A. W. (1995). "The genetics of cell cycle checkpoints." *Curr Opin Genet Dev* 5(1): 5-11.

Myers, M. P., J. P. Stolarov, et al. (1997). "P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(17): 9052-7.

Nasmyth, K. (1996). "At the heart of the budding yeast cell cycle." *Trends Genet* 12(10): 405-12.

Navabi, H., D. Croston, et al. (2005). "Preparation of human ovarian cancer ascites-derived exosomes for a clinical trial." *Blood Cells Mol Dis* 35(2): 149-52.

Nechushtan, A., C. L. Smith, et al. (1999). "Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death." *Embo J* 18(9): 2330-41.

Nechushtan, A., C. L. Smith, et al. (2001). "Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis." *J Cell Biol* 153(6): 1265-76.

Nelen, M. R., W. C. van Staveren, et al. (1997). "Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease." *Hum Mol Genet* 6(8): 1383-7.

Nemani, M., G. Linares-Cruz, 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(17): 9039-42.

Neshat, M. S., I. K. Mellingshoff, et al. (2001). "Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18): 10314-9.

Nguyen, D. G., A. Booth, et al. (2003). "Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway." *J Biol Chem* 278(52): 52347-54.

Nibuya, M., E. J. Nestler, et al. (1996). "Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus." *J Neurosci* 16(7): 2365-72.

Nickel, W. (2003). "The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes." *Eur J Biochem* 270(10): 2109-19.

Nie, Z. and P. A. Randazzo (2006). "Arf GAPs and membrane traffic." *J Cell Sci* 119(Pt 7): 1203-11.

Nielsen, H. V., A. H. Johnsen, et al. (1998). "Identification of a basophil leukocyte interleukin-3-regulated protein that is identical to IgE-dependent histamine-releasing factor." *Allergy* 53(7): 642-52.

Noda, M. and Y. Ikawa (1986). "Detection of genes with potential of suppressing transforming activity of the v-Ki-ras oncogene." *Princess Takamatsu Symp* 17: 261-7.

Noda, M. and Y. Ikawa (1986). "[The role of oncogenes]." *Nippon Rinsho* 44(2): 274-80.

Noda, M., H. Kitayama, et al. (1989). "Transformation suppressor genes." *Princess Takamatsu Symp* 20: 233-9.

Noda, M., H. Kitayama, et al. (1989). "Detection of genes with a potential for suppressing the transformed phenotype associated with activated ras genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(1): 162-6.

Noda, M., Z. Selinger, et al. (1983). "Flat revertants isolated from Kirsten sarcoma virus-transformed cells are resistant to the action of specific oncogenes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(18): 5602-6.

Norbeck, J. and A. Blomberg (1997). "Two-dimensional electrophoretic separation of yeast proteins using a non-linear wide range (pH 3-10) immobilized pH gradient in the first dimension; reproducibility and evidence for isoelectric focusing of alkaline (pI > 7) proteins." *Yeast* 13(16): 1519-34.

Nouraini, S., E. Six, et al. (2000). "The putative pore-forming domain of Bax regulates mitochondrial localization and interaction with Bcl-X(L)." *Mol Cell Biol* 20(5): 1604-15.

Nowak, M. A., N. L. Komarova, et al. (2002). "The role of chromosomal instability in tumor initiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(25): 16226-31.

Nowell, P. C. and D. A. Hungerford (1960). "Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes." *J Natl Cancer Inst* 25: 85-109.

Nuoffer, C., S. K. Wu, et al. (1997). "Mss4 does not function as an exchange factor for Rab in endoplasmic reticulum to Golgi transport." *Mol Biol Cell* 8(7): 1305-16.

Ohgami, R. S., D. R. Campagna, et al. (2005). "nm1054: a spontaneous, recessive, hypochromic, microcytic anemia mutation in the mouse." *Blood* 106(10): 3625-31.

Ohgami, R. S., D. R. Campagna, et al. (2005). "Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells." *Nat Genet* 37(11): 1264-9.

Okada, H., W. K. Suh, et al. (2002). "Generation and characterization of Smac/DIABLO-deficient mice." *Mol Cell Biol* 22(10): 3509-17.

Oltvai, Z. N., C. L. Milliman, et al. (1993). "Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death." *Cell* 74(4): 609-19.

Oren, M. and A. J. Levine (1981). "Immunoselection of simian virus 40 large T antigen messenger RNAs from transformed cells." *Virology* 113(2): 790-3.

Ozer, H. L. and K. K. Jha (1977). "Malignancy and transformation: expression in somatic cell hybrids and variants." *Adv Cancer Res* 25: 53-93.

Pai, E. F. (1998). "The alpha and beta of turning on a molecular switch." *Nat Struct Biol* 5(4): 259-63.

Palmero, I., C. Pantoja, et al. (1998). "p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras." *Nature* 395(6698): 125-6.

Park, K. S., I. D. Kong, et al. (1999). "Fluoxetine inhibits L-type Ca<sup>2+</sup> and transient outward K<sup>+</sup> currents in rat ventricular myocytes." *Yonsei Med J* 40(2): 144-51.

Passer, B. J., V. Nancy-Portebois, et al. (2003). "The p53-inducible TSAP6 gene product regulates apoptosis and the cell cycle and interacts with Nix and the Myt1 kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(5): 2284-9.

Paulovich, A. G., D. P. Toczyski, et al. (1997). "When checkpoints fail." *Cell* 88(3): 315-21.

Pay, A., E. Heberle-Bors, et al. (1992). "An alfalfa cDNA encodes a protein with homology to translationally controlled human tumor protein." *Plant Mol Biol* 19(3): 501-3.

Peachell, P. T. and F. L. Pearce (1989). "Divalent cation dependence of the inhibition by phenothiazines of mediator release from mast cells." *Br J Pharmacol* 97(2): 547-55.

Perez-Galan, P., G. Roue, et al. (2007). "The BH3-mimetic GX15-070 synergizes with bortezomib in mantle cell lymphoma by enhancing Noxa-mediated activation of Bak." *Blood* 109(10): 4441-9.

Piccart-Gebhart, M. J., M. Procter, et al. (2005). "Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer." *N Engl J Med* 353(16): 1659-72.

Pietras, R. J., M. D. Pegram, et al. (1998). "Remission of human breast cancer xenografts on therapy with humanized monoclonal antibody to HER-2 receptor and DNA-reactive drugs." *Oncogene* 17(17): 2235-49.

Pihan, G. A., A. Purohit, et al. (1998). "Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors." *Cancer Res* 58(17): 3974-85.

Podsypanina, K., R. T. Lee, et al. (2001). "An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in Pten<sup>+/-</sup> mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18): 10320-5.

Pollack, R. E., H. Green, et al. (1968). "Growth control in cultured cells: selection of sublines with increased sensitivity to contact inhibition and decreased tumor-producing ability." *Proc Natl Acad Sci U S A* 60(1): 126-33.

Polyak, K., T. Waldman, et al. (1996). "Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest." *Genes Dev* 10(15): 1945-52.

Porkka, K. P., M. A. Helenius, et al. (2002). "Cloning and characterization of a novel six-transmembrane protein STEAP2, expressed in normal and malignant prostate." *Lab Invest* 82(11): 1573-82.

Porkka, K. P., N. N. Nupponen, et al. (2003). "Human pHyde is not a classical tumor suppressor gene in prostate cancer." *Int J Cancer* 106(5): 729-35.

Potter, C. J., L. G. Pedraza, et al. (2002). "Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2." *Nat Cell Biol* 4(9): 658-65.

Preskorn, S. H. (1998). "Debate resolved: there are differential effects of serotonin selective reuptake inhibitors on cytochrome P450 enzymes." *J Psychopharmacol* 12(3 Suppl B): S89-97.

Rabinowitz, Z. and L. Sachs (1968). "Reversion of properties in cells transformed by polyoma virus." *Nature* 220(5173): 1203-6.

Rajagopalan, H., P. V. Jallepalli, et al. (2004). "Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability." *Nature* 428(6978): 77-81.

Rajagopalan, H., M. A. Nowak, et al. (2003). "The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer." *Nat Rev Cancer* 3(9): 695-701.

Rajalingam, D., I. Graziani, et al. (2007). "Relevance of partially structured states in the non-classical secretion of acidic fibroblast growth factor." *Biochemistry* 46(32): 9225-38.

Ranger, A. M., B. A. Malynn, et al. (2001). "Mouse models of cell death." *Nat Genet* 28(2): 113-8.

Ranger, A. M., J. Zha, et al. (2003). "Bad-deficient mice develop diffuse large B cell lymphoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(16): 9324-9.

Raposo, G., H. W. Nijman, et al. (1996). "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles." *J Exp Med* 183(3): 1161-72.

Raposo, G., D. Tenza, et al. (1997). "Accumulation of major histocompatibility complex class II molecules in mast cell secretory granules and their release upon degranulation." *Mol Biol Cell* 8(12): 2631-45.

Rasnick, D. and P. H. Duesberg (1999). "How aneuploidy affects metabolic control and causes cancer." *Biochem J* 340 ( Pt 3): 621-30.

Recillas-Targa, F., I. A. De La Rosa-Velazquez, et al. (2006). "Epigenetic boundaries of tumour suppressor gene promoters: the CTCF connection and its role in carcinogenesis." *J Cell Mol Med* 10(3): 554-68.

Reich, N. C. and A. J. Levine (1984). "Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells." *Nature* 308(5955): 199-201.

Rid, R., B. Simon-Nobbe, et al. (2008). "Cladosporium herbarum translationally controlled tumor protein (TCTP) is an IgE-binding antigen and is associated with disease severity." *Mol Immunol* 45(2): 406-18.

Ridley, R. G. (2002). "Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs." *Nature* 415(6872): 686-93.

Rinaldy, A. R., R. P. Menon, et al. (2000). "Role of pHyde novel gene product as an intrinsic factor for apoptotic pathway in prostate cancer." *Gan To Kagaku Ryoho* 27 Suppl 2: 215-22.

Rinkenberger, J. L., S. Horning, et al. (2000). "Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality." *Genes Dev* 14(1): 23-7.

Rinnerthaler, M., S. Jarolim, 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(5-6): 631-8.

Rodrigues, T., A. C. Santos, et al. (2002). "Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis--potentially implicated mechanisms." *Br J Pharmacol* 136(1): 136-42.

Rogoff, H. A., M. T. Pickering, et al. (2002). "E2F1 induces phosphorylation of p53 that is coincident with p53 accumulation and apoptosis." *Mol Cell Biol* 22(15): 5308-18.

Romond, E. H., E. A. Perez, et al. (2005). "Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer." *N Engl J Med* 353(16): 1673-84.

Roperch, J. P., V. Alvaro, 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(7): 835-8.

Roperch, J. P., F. Lethrone, et al. (1999). "SIAH-1 promotes apoptosis and tumor suppression through a network involving the regulation of protein folding, unfolding, and trafficking: identification of common effectors with p53 and p21(Waf1)." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(14): 8070-3.

Roses, A. D. (2004). "Pharmacogenetics and drug development: the path to safer and more effective drugs." *Nat Rev Genet* 5(9): 645-56.

Rotman, G. and Y. Shiloh (1998). "ATM: from gene to function." *Hum Mol Genet* 7(10): 1555-63.

Rowley, J. D. (1973). "Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining." *Nature* 243(5405): 290-3.

Ruben, L. and H. Rasmussen (1981). "Phenothiazines and related compounds disrupt mitochondrial energy production by a calmodulin-independent reaction." *Biochim Biophys Acta* 637(3): 415-22.



Salomon, D. S., J. A. Zwiebel, et al. (1984). "Flat revertants derived from Kirsten murine sarcoma virus-transformed cells produce transforming growth factors." *J Cell Physiol* 121(1): 22-30.

Sanchez, J. C., D. Schaller, et al. (1997). "Translationally controlled tumor protein: a protein identified in several nontumoral cells including erythrocytes." *Electrophoresis* 18(1): 150-5.

Sanchez-Pulido, L., A. M. Rojas, et al. (2004). "ACRATA: a novel electron transfer domain associated to apoptosis and cancer." *BMC Cancer* 4: 98.

Savina, A., M. Vidal, et al. (2002). "The exosome pathway in K562 cells is regulated by Rab11." *J Cell Sci* 115(Pt 12): 2505-15.

Schafer, T., H. Zentgraf, et al. (2004). "Unconventional secretion of fibroblast growth factor 2 is mediated by direct translocation across the plasma membrane of mammalian cells." *J Biol Chem* 279(8): 6244-51.

Schalkwyk, L. C., M. Jung, et al. (1999). "Panel of microsatellite markers for whole-genome scans and radiation hybrid mapping and a mouse family tree." *Genome Res* 9(9): 878-87.

Schinzel, A., T. Kaufmann, et al. (2004). "Bcl-2 family members: integrators of survival and death signals in physiology and pathology [corrected]." *Biochim Biophys Acta* 1644(2-3): 95-105.

Schinzel, A., T. Kaufmann, et al. (2004). "Conformational control of Bax localization and apoptotic activity by Pro168." *J Cell Biol* 164(7): 1021-32.

Schmidt, I., M. Fahling, et al. (2007). "Induction of translationally controlled tumor protein (TCTP) by transcriptional and post-transcriptional mechanisms." *Febs J* 274(20): 5416-24.

Schmitt, L. and R. Tampe (2002). "Structure and mechanism of ABC transporters." *Curr Opin Struct Biol* 12(6): 754-60.

Schneider, P., T. A. Korolenko, et al. (1997). "A review of drug-induced lysosomal disorders of the liver in man and laboratory animals." *Microsc Res Tech* 36(4): 253-75.

Schneider, P., F. MacKay, et al. (1999). "BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth." *J Exp Med* 189(11): 1747-56.

Schroeder, J. T., L. M. Lichtenstein, et al. (1996). "An immunoglobulin E-dependent recombinant histamine-releasing factor induces interleukin-4 secretion from human basophils." *J Exp Med* 183(3): 1265-70.

Schroeder, J. T., L. M. Lichtenstein, et al. (1997). "Recombinant histamine-releasing factor enhances IgE-dependent IL-4 and IL-13 secretion by human basophils." *J Immunol* 159(1): 447-52.

Schuler, M., A. Dierich, et al. (2004). "Efficient temporally controlled targeted somatic mutagenesis in hepatocytes of the mouse." *Genesis* 39(3): 167-72.

Seelig, L. L., Jr. (1972). "Surface multivesicular structures associated with maturing erythrocytes in rats." *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 133(2): 181-6.

Segura, E., S. Amigorena, et al. (2005). "Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses." *Blood Cells Mol Dis* 35(2): 89-93.

Sen, S. (2000). "Aneuploidy and cancer." *Curr Opin Oncol* 12(1): 82-8.

Sharpless, N. E. and R. A. DePinho (2002). "p53: good cop/bad cop." *Cell* 110(1): 9-12.

Shattil, S. J. and R. A. Cooper (1972). "Maturation of macroreticulocyte membranes in vivo." *J Lab Clin Med* 79(2): 215-27.

Shaulsky, G., N. Goldfinger, et al. (1991). "Involvement of wild-type p53 in pre-B-cell differentiation in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(20): 8982-6.

Shaulsky, G., N. Goldfinger, et al. (1991). "Involvement of wild-type p53 protein in the cell cycle requires nuclear localization." *Cell Growth Differ* 2(12): 661-7.

Shaulsky, G., N. Goldfinger, et al. (1991). "Nuclear localization is essential for the activity of p53 protein." *Oncogene* 6(11): 2055-65.

Shih, I. M., W. Zhou, et al. (2001). "Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis." *Cancer Res* 61(3): 818-22.

Shih, Y. J., R. D. Baynes, et al. (1990). "Serum transferrin receptor is a truncated form of tissue receptor." *J Biol Chem* 265(31): 19077-81.

Shioi, T., P. M. Kang, et al. (2000). "The conserved phosphoinositide 3-kinase pathway determines heart size in mice." *Embo J* 19(11): 2537-48.

Sieber, O. M., K. Heinemann, et al. (2002). "Analysis of chromosomal instability in human colorectal adenomas with two mutational hits at APC." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26): 16910-5.

Sieber, O. M., K. Heinemann, et al. (2003). "Genomic instability--the engine of tumorigenesis?" *Nat Rev Cancer* 3(9): 701-8.

Silverman, J. M., S. K. Chan, et al. (2008). "Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*." *Genome Biol* 9(2): R35.

Simpson, C. F. and J. M. Kling (1967). "The mechanism of denucleation in circulating erythroblasts." *J Cell Biol* 35(1): 237-45.

Skinner, M. H., H. Y. Kuan, et al. (2003). "Duloxetine is both an inhibitor and a substrate of cytochrome P4502D6 in healthy volunteers." *Clin Pharmacol Ther* 73(3): 170-7.

Skokos, D., H. G. Botros, et al. (2003). "Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo." *J Immunol* 170(6): 3037-45.

Skokos, D., S. Le Panse, et al. (2001). "Mast cell-dependent B and T lymphocyte activation is mediated by the secretion of immunologically active exosomes." *J Immunol* 166(2): 868-76.

Slamon, D. J., W. Godolphin, et al. (1989). "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer." *Science* 244(4905): 707-12.

Slamon, D. J., B. Leyland-Jones, et al. (2001). "Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2." *N Engl J Med* 344(11): 783-92.

Smith, L., S. J. Liu, et al. (1998). "Duplication of ATR inhibits MyoD, induces aneuploidy and eliminates radiation-induced G1 arrest." *Nat Genet* 19(1): 39-46.

Spencer, F., S. L. Gerring, et al. (1990). "Mitotic chromosome transmission fidelity mutants in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 124(2): 237-49.

Sproule, B. A., S. V. Otton, et al. (1997). "CYP2D6 inhibition in patients treated with sertraline." *J Clin Psychopharmacol* 17(2): 102-6.

Stambolic, V., D. MacPherson, et al. (2001). "Regulation of PTEN transcription by p53." *Mol Cell* 8(2): 317-25.

Steck, P. A., M. A. Pershouse, et al. (1997). "Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers." *Nat Genet* 15(4): 356-62.

Stehelin, D., H. E. Varmus, et al. (1976). "DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA." *Nature* 260(5547): 170-3.

Steiner, M. S., X. Zhang, et al. (2000). "Growth inhibition of prostate cancer by an adenovirus expressing a novel tumor suppressor gene, pHyde." *Cancer Res* 60(16): 4419-25.

Stephens, L., K. Anderson, et al. (1998). "Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B." *Science* 279(5351): 710-4.

Stokoe, D., L. R. Stephens, et al. (1997). "Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B." *Science* 277(5325): 567-70.

Stoorvogel, W., M. J. Kleijmeer, et al. (2002). "The biogenesis and functions of exosomes." *Traffic* 3(5): 321-30.

Strobl, J. S., K. L. Kirkwood, et al. (1990). "Inhibition of human breast cancer cell proliferation in tissue culture by the neuroleptic agents pimozide and thioridazine." *Cancer Res* 50(17): 5399-405.

Strobl, J. S., K. L. Kirkwood, et al. (1990). "Inhibition of human breast cancer cell proliferation in tissue culture by the neuroleptic agents pimozide and thioridazine." *Cancer Res* 50(17): 5399-405.

Strobl, J. S. and V. A. Peterson (1992). "Tamoxifen-resistant human breast cancer cell growth: inhibition by thioridazine, pimozide and the calmodulin antagonist, W-13." *J Pharmacol Exp Ther* 263(1): 186-93.

Stuhmer, T. and R. C. Bargou (2006). "Selective pharmacologic activation of the p53-dependent pathway as a therapeutic strategy for hematologic malignancies." *Cell Cycle* 5(1): 39-42.

Stuhmer, T., M. Chatterjee, et al. (2005). "Nongenotoxic activation of the p53 pathway as a therapeutic strategy for multiple myeloma." *Blood* 106(10): 3609-17.

Sturzenbaum, S. R., P. Kille, et al. (1998). "Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumour protein (TCTP) in the earthworm *Lumbricus rubellus*1." *Biochim Biophys Acta* 1398(3): 294-304.

Sun, Y., H. Yi, et al. (2007). "Identification of differential proteins in nasopharyngeal carcinoma cells with p53 silence by proteome analysis." *FEBS Lett* 581(1): 131-9.

Susini, L., S. Besse, et al. (2008). "TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function." *Cell Death Differ*.

Susini, L., B. J. Passer, et al. (2001). "Siah-1 binds and regulates the function of Numb." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26): 15067-72.

Sutherland, R. L., C. K. Watts, et al. (1987). "Mechanisms of growth inhibition by nonsteroidal antioestrogens in human breast cancer cells." *J Steroid Biochem* 27(4-6): 891-7.

Suzuki, M., R. J. Youle, et al. (2000). "Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization." *Cell* 103(4): 645-54.

Tani, T., H. Shimada, et al. (2007). "Bovine oocytes with the potential to reprogram somatic cell nuclei have a unique 23-kDa protein, phosphorylated transcriptionally controlled tumor protein (TCTP)." *Cloning Stem Cells* 9(2): 267-80.

Tanudji, M., S. Hevi, et al. (2002). "Improperly folded green fluorescent protein is secreted via a non-classical pathway." *J Cell Sci* 115(Pt 19): 3849-57.

Taub, R., I. Kirsch, et al. (1982). "Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(24): 7837-41.

Telerman, A., M. Tuynder, et al. (1993). "A model for tumor suppression using H-1 parvovirus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(18): 8702-6.

Thaw, P., N. J. Baxter, et al. (2001). "Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones." *Nat Struct Biol* 8(8): 701-4.

They, C., A. Regnault, et al. (1999). "Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73." *J Cell Biol* 147(3): 599-610.

They, C., L. Zitvogel, et al. (2002). "Exosomes: composition, biogenesis and function." *Nat Rev Immunol* 2(8): 569-79.

Thiagalingam, S., C. Lengauer, et al. (1996). "Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers." *Nat Genet* 13(3): 343-6.

Thiele, H., M. Berger, et al. (2000). "Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled tumour protein (TCTP)." *Eur J Biochem* 267(17): 5473-81.

Thomas, G. and G. Thomas (1986). "Translational control of mRNA expression during the early mitogenic response in Swiss mouse 3T3 cells: identification of specific proteins." *J Cell Biol* 103(6 Pt 1): 2137-44.

Thomas, G., G. Thomas, et al. (1981). "Transcriptional and translational control of cytoplasmic proteins after serum stimulation of quiescent Swiss 3T3 cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(9): 5712-6.

Thut, C. J., J. L. Chen, et al. (1995). "p53 transcriptional activation mediated by coactivators TAFII40 and TAFII60." *Science* 267(5194): 100-4.

Toker, A. and A. C. Newton (2000). "Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site." *J Biol Chem* 275(12): 8271-4.

Trotman, L. C. and P. P. Pandolfi (2003). "PTEN and p53: who will get the upper hand?" *Cancer Cell* 3(2): 97-9.

Trudel, S., Z. H. Li, et al. (2007). "Preclinical studies of the pan-Bcl inhibitor obatoclax (GX015-070) in multiple myeloma." *Blood* 109(12): 5430-8.

Trump, B. F. and I. K. Berezsky (1996). "The role of altered  $[Ca^{2+}]_i$  regulation in apoptosis, oncosis, and necrosis." *Biochim Biophys Acta* 1313(3): 173-8.

Tuynder, M., G. Fiucci, et al. (2004). "Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(43): 15364-9.

Tuynder, M., L. Susini, 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(23): 14976-81.

Van Maerken, T., F. Speleman, et al. (2006). "Small-molecule MDM2 antagonists as a new therapy concept for neuroblastoma." *Cancer Res* 66(19): 9646-55.

Van Niel, G., J. Mallegol, et al. (2003). "Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice." *Gut* 52(12): 1690-7.

van Niel, G., G. Raposo, et al. (2001). "Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles." *Gastroenterology* 121(2): 337-49.

Vanaja, D. K., J. C. Cheville, et al. (2003). "Transcriptional silencing of zinc finger protein 185 identified by expression profiling is associated with prostate cancer progression." *Cancer Res* 63(14): 3877-82.

Vassilev, L. T. (2004). "Small-molecule antagonists of p53-MDM2 binding: research tools and potential therapeutics." *Cell Cycle* 3(4): 419-21.

Vassilev, L. T. (2005). "p53 Activation by small molecules: application in oncology." *J Med Chem* 48(14): 4491-9.

Vassilev, L. T., B. T. Vu, et al. (2004). "In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2." *Science* 303(5659): 844-8.

Vazquez, F. and W. R. Sellers (2000). "The PTEN tumor suppressor protein: an antagonist of phosphoinositide 3-kinase signaling." *Biochim Biophys Acta* 1470(1): M21-35.

Ventura, A., D. G. Kirsch, et al. (2007). "Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo." *Nature* 445(7128): 661-5.

Vidal, M., P. Mangeat, et al. (1997). "Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation." *J Cell Sci* 110 ( Pt 16): 1867-77.

Vidal, M. J. and P. D. Stahl (1993). "The small GTP-binding proteins Rab4 and ARF are associated with released exosomes during reticulocyte maturation." *Eur J Cell Biol* 60(2): 261-7.

Vitale, A. M., M. E. Calvert, et al. (2007). "Proteomic profiling of murine oocyte maturation." *Mol Reprod Dev* 74(5): 608-16.

Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (1993). "The multistep nature of cancer." *Trends Genet* 9(4): 138-41.

Vogelstein, B., D. Lane, et al. (2000). "Surfing the p53 network." *Nature* 408(6810): 307-10.

Vonakis, B. M., D. W. Macglashan, Jr., et al. (2007). "Distinct characteristics of signal transduction events by histamine releasing factor/translationally controlled tumor protein (HRF/TCTP)-induced priming and activation of human basophils." *Blood*.

Vousden, K. H. and D. P. Lane (2007). "p53 in health and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(4): 275-83.

Wagner, K. U., E. Claudio, et al. (2000). "Conditional deletion of the Bcl-x gene from erythroid cells results in hemolytic anemia and profound splenomegaly." *Development* 127(22): 4949-58.

Wagner, K. U., R. J. Wall, et al. (1997). "Cre-mediated gene deletion in the mammary gland." *Nucleic Acids Res* 25(21): 4323-30.

Waki, H. and P. Tontonoz (2007). "STAMPing out Inflammation." *Cell* 129(3): 451-2.

Walsh, B. J., A. A. Gooley, et al. (1995). "Identification of macrophage activation associated proteins by two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing." *J Leukoc Biol* 57(3): 507-12.

Walsky, R. L., A. V. Astuccio, et al. (2006). "Evaluation of 227 drugs for in vitro inhibition of cytochrome P450 2B6." *J Clin Pharmacol* 46(12): 1426-38.

Wan, X. and L. J. Helman (2007). "The biology behind mTOR inhibition in sarcoma." *Oncologist* 12(8): 1007-18.

Wang, W., S. H. Kim, et al. (2006). "Small-molecule modulators of p53 family signaling and antitumor effects in p53-deficient human colon tumor xenografts." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(29): 11003-8.

Wantke, F., D. W. MacGlashan, et al. (1999). "The human recombinant histamine releasing factor: functional evidence that it does not bind to the IgE molecule." *J Allergy Clin Immunol* 103(4): 642-8.

Wasylyk, C., R. Salvi, et al. (1999). "p53 mediated death of cells overexpressing MDM2 by an inhibitor of MDM2 interaction with p53." *Oncogene* 18(11): 1921-34.

Watanabe, T., A. Ichikawa, et al. (1996). "Overexpression of the MDM2 oncogene in leukemia and lymphoma." *Leuk Lymphoma* 21(5-6): 391-7, color plates XVI following 5.

Weaver, V. M., O. W. Petersen, et al. (1997). "Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies." *J Cell Biol* 137(1): 231-45.

Weaver, V. M., O. W. Petersen, et al. (1997). "Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies." *J Cell Biol* 137(1): 231-45.

Weissman, B. E., P. J. Saxon, et al. (1987). "Introduction of a normal human chromosome 11 into a Wilms' tumor cell line controls its tumorigenic expression." *Science* 236(4798): 175-80.

Wellen, K. E., R. Fucho, et al. (2007). "Coordinated regulation of nutrient and inflammatory responses by STAMP2 is essential for metabolic homeostasis." *Cell* 129(3): 537-48.

Wojcikowski, J. and W. A. Daniel (2002). "Thioridazine-fluoxetine interaction at the level of the distribution process in vivo." *Pol J Pharmacol* 54(6): 647-54.

Wolf, G., R. Elez, et al. (1997). "Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in non-small cell lung cancer." *Oncogene* 14(5): 543-9.

Wolfers, J., A. Lozier, et al. (2001). "Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming." *Nat Med* 7(3): 297-303.

Wolter, K. G., Y. T. Hsu, et al. (1997). "Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis." *J Cell Biol* 139(5): 1281-92.

Wu, X. and A. J. Levine (1994). "p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(9): 3602-6.

Wubbolts, R., R. S. Leckie, et al. (2003). "Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation." *J Biol Chem* 278(13): 10963-72.

Xue, W., L. Zender, et al. (2007). "Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas." *Nature* 445(7128): 656-60.

Yang, A., M. Kaghad, et al. (1998). "p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities." *Mol Cell* 2(3): 305-16.

Yang, D., G. E. Holt, et al. (2001). "Murine six-transmembrane epithelial antigen of the prostate, prostate stem cell antigen, and prostate-specific membrane antigen: prostate-specific cell-surface antigens highly expressed in prostate cancer of transgenic adenocarcinoma mouse prostate mice." *Cancer Res* 61(15): 5857-60.

Yang, E., J. Zha, et al. (1995). "Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death." *Cell* 80(2): 285-91.

Yang, Y., F. Yang, et al. (2005). "An N-terminal region of translationally controlled tumor protein is required for its antiapoptotic activity." *Oncogene* 24(30): 4778-88.

Yarm, F. R. (2002). "Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP." *Mol Cell Biol* 22(17): 6209-21.

Yenofsky, R., I. Bergmann, et al. (1982). "Messenger RNA species partially in a repressed state in mouse sarcoma ascites cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(19): 5876-80.

Yenofsky, R., S. Cereghini, et al. (1983). "Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide." *Mol Cell Biol* 3(7): 1197-203.

Yin, X. M., K. Wang, et al. (1999). "Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis." *Nature* 400(6747): 886-91.

Yonish-Rouach, E., D. Resnitzky, et al. (1991). "Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6." *Nature* 352(6333): 345-7.

Yoon, T., J. Jung, et al. (2000). "Identification of the self-interaction of rat TCTP/IgE-dependent histamine-releasing factor using yeast two-hybrid system." *Arch Biochem Biophys* 384(2): 379-82.

Yu, D., B. Liu, et al. (1998). "Overexpression of both p185c-erbB2 and p170mdr-1 renders breast cancer cells highly resistant to taxol." *Oncogene* 16(16): 2087-94.

Yu, X., S. L. Harris, et al. (2006). "The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein." *Cancer Res* 66(9): 4795-801.

Zauberman, A., D. Flusberg, et al. (1995). "A functional p53-responsive intronic promoter is contained within the human mdm2 gene." *Nucleic Acids Res* 23(14): 2584-92.

Zauli, G., E. Rimondi, et al. (2007). "MDM2 antagonist Nutlin-3 suppresses the proliferation and differentiation of human pre-osteoclasts through a p53-dependent pathway." *J Bone Miner Res* 22(10): 1621-30.

Zhang, D., F. Li, et al. (2002). "Physical and functional interaction between myeloid cell leukemia 1 protein (MCL1) and Fortilin. The potential role of MCL1 as a fortilin chaperone." *J Biol Chem* 277(40): 37430-8.

Zhang, H., G. Tomblin, et al. (1998). "BRCA1, BRCA2, and DNA damage response: collision or collusion?" *Cell* 92(4): 433-6.

Zhang, X., M. S. Steiner, et al. (2001). "Apoptosis induction in prostate cancer cells by a novel gene product, pHyde, involves caspase-3." *Oncogene* 20(42): 5982-90.

Zhang, Y. and Y. Xiong (2001). "Control of p53 ubiquitination and nuclear export by MDM2 and ARF." *Cell Growth Differ* 12(4): 175-86.

Zhelev, Z., H. Ohba, et al. (2004). "Phenothiazines suppress proliferation and induce apoptosis in cultured leukemic cells without any influence on the viability of normal lymphocytes. Phenothiazines and leukemia." *Cancer Chemother Pharmacol* 53(3): 267-75.

Zheng, T. S., S. Hunot, et al. (1999). "Caspase knockouts: matters of life and death." *Cell Death Differ* 6(11): 1043-53.

Zhou, H., J. Kuang, et al. (1998). "Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation." *Nat Genet* 20(2): 189-93.

Zhou, J., J. Ahn, et al. (2001). "A role for p53 in base excision repair." *Embo J* 20(4): 914-23.

Zindy, F., C. M. Eischen, et al. (1998). "Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization." *Genes Dev* 12(15): 2424-33.

Zisman, A., A. J. Pantuck, et al. (2003). "LABAZ1: A metastatic tumor model for renal cell carcinoma expressing the carbonic anhydrase type 9 tumor antigen." *Cancer Res* 63(16): 4952-9.

Zitvogel, L., A. Regnault, et al. (1998). "Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes." *Nat Med* 4(5): 594-600.

Zucchi, I., E. Mento, et al. (2004). "Gene expression profiles of epithelial cells microscopically isolated from a breast-invasive ductal carcinoma and a nodal metastasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(52): 18147-52.

## **Annexe 1 : Article Fiucci et al 2003**

### **Genomic organization and expression of mouse Tpt1 gene.**

Fiucci Giuzy, Lespagnol Alexandra, Stumptner-Cuvelette Pamela, Beaucourt Séverine,  
Duflaut Dominique, Susini Laurent, Amson Robert, Telerman Adam

Genomics. 2003 Jun; 81 (6):570-8.





ACADEMIC  
PRESS

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SCIENCE @ DIRECT®

Genomics 81 (2003) 570–578

GENOMICS

[www.elsevier.com/locate/ygeno](http://www.elsevier.com/locate/ygeno)

## Genomic organization and expression of mouse *Tpt1* gene<sup>☆</sup>

Giusy Fiucci,\* Alexandra Lespagnol, Pamela Stumptner-Cuvelette, Séverine Beaucourt, Dominique Duflaut, Laurent Susini, Robert Amson, and Adam Telerman

*Molecular Engines Laboratories, 20 Rue Bouvier, 75011 Paris, France*

Received 3 December 2002; accepted 2 February 2003

### Abstract

The translationally controlled tumor protein (TCTP), also known as histamine-releasing factor (HRF), is encoded by a gene (*Tpt1*) that is highly conserved throughout phylogeny. TCTP is implicated in cell growth, acute allergic response, and apoptosis. In the present study, seven putative *Tpt1* genes with different chromosomal localizations were identified in the mouse genome. In six of them, analysis of the 5' and 3' untranslated regions revealed the presence of flanking direct repeats and residual poly(A) tails typical of pseudogenes. Only three of the seven genes can produce a protein of the expected molecular weight. We isolated the genomic DNA of these three genes to analyze their sequence, genomic organization, and in vitro promoter activity. We found that mouse *Tpt1* is localized on chromosome 14 with a canonical intron–exon organization, a functional promoter, and only one transcript that is ubiquitously expressed in all tissues. © 2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

**Keywords:** Translationally controlled tumor protein (TCTP protein); Histamine-releasing factor; Pseudogenes; Gene expression; Cancer

*Tpt1* encodes the translationally controlled tumor protein (TCTP). TCTP was initially discovered because of its substantial presence in untranslated mRNP particles in a mouse sarcoma cell line [1] and in mouse erythroleukemia cells [2]. It was also found as a highly expressed protein in growing Ehrlich ascites tumor cells [3,4].

TCTP has a molecular mass of 21–23 kDa in both mouse [4,5] and human [6]. Because of its ubiquitous expression [7], high degree of conservation between species [8,9], and presence in tumor and normal cells [10], TCTP can be considered the product of a housekeeping gene. The intracellular localization of TCTP is generally considered cytoplasmic, and it is not associated to any cellular organelles [11]. However, the C terminus of TCTP contains a 45-amino-acid basic region that binds to tubulin [11]. In addition, TCTP is phosphorylated at two serine residues by Plk (polo-like kinase), a protein kinase that regulates spindle function [12]. It has been suggested that this phosphoryla-

tion could decrease the microtubule-stabilizing activity of TCTP and promote an increase in microtubule dynamics.

TCTP is detected in biological fluids of allergic patients [13] and in supernatants from cell cultures [14], suggesting that the protein is secreted. However, TCTP lacks any known secretory signal in the N terminus and is therefore unlikely to follow a classical secretion pathway. Secreted TCTP acts on basophils, inducing the release of histamine [13], and also increases MHC class II expression and Ig production from B cells [14].

Although no primary sequence homology has been found between TCTP and other known proteins, nuclear magnetic resonance (NMR) structure analysis of *Schizosaccharomyces pombe* TCTP reveals similarity with guanine nucleotide-free chaperones such as the human protein family Mss4/Dss4 [15]. These proteins bind to the GDP/GTP free form of Rab proteins, which are implicated in intracellular trafficking [16]; however, no experimental data demonstrating a similar function for TCTP have been reported yet.

The high abundance of TCTP in tumor cell lines and in human tumor biopsy specimens [17] suggested an important role of this protein in carcinogenesis. We have recently shown that downregulation of human TCTP expression in-

<sup>☆</sup> Sequence data from this article have been deposited with the GenBank Data Libraries under Accession No. AY186881.

\* Corresponding author. Fax: +33-01-44640465.

E-mail address: [gfiucci@mail.molecular-engines.com](mailto:gfiucci@mail.molecular-engines.com) (G. Fiucci).

Table 1  
Ensembl database search for *Tpt1* homologs in the mouse genome

Chromosome	Identities <sup>a</sup>	Locations <sup>b</sup>	Ensembl (Accession No.) <sup>c</sup>
14	169/191 88%	66772962–66773152	ENSMUSG00000022004
6	169/191 88%	100712616–100712806	ENSMUSG00000030071
9	168/191 87%	37877024–37877214	ENSMUSG00000040986
X	167/191 87%	84622294–84622484	–
3	160/194 82%	101344748–101344941	–
7	157/192 81%	8006623–8006814	–
4	154/191 80%	53442485–53442670	–

<sup>a/b</sup> Ensembl identities and chromosomal locations for the *Tpt1* genes are indicated.

<sup>c</sup> The accession number for the three highest score hits are also indicated.

duces a reorganization of breast tumor cells into ductal and acinar structures similar to those seen in normal breast [17]. Several studies described TCTP as an anti-apoptotic protein. Upon activation of wild-type p53 function in the M1/LTR6 cells containing a temperature-sensitive p53 mutant [18], many genes are substantially downregulated [19], including *Tpt1*. TCTP also binds the pro-apoptotic myeloid cell leukemia protein-1, a Bcl-2 homolog [20]. Expression of TCTP in HeLa and U2OS cells prevented them from undergoing etoposide-induced apoptosis and inhibited a caspase 3-like activity. Transfection of antisense *Tpt1* in the mammary cancer cell line MCF7 is also associated with massive cell death [21].

The chromosomal localization of human *Tpt1* [22,23] and the genomic organization of rabbit *Tpt1*, [24] have been described. These species have two *Tpt1* mRNAs, which differ in their 3' untranslated region (UTR) because of an alternative polyadenylation site. Quantity and ratio of expression of the two mRNA isoforms vary between tissues. In addition, many *Tpt1*-derived pseudogenes have been found in the rabbit genome and suggested, by BLAST search, in the human [7].

The present work was aimed at investigating the genomic localization and organization of mouse *Tpt1*. Our study reveals the presence of *Tpt1* genes on various chromosomes, leading us to analyze their potential functionality.

## Results and discussion

### Identification of different mouse *Tpt1* genes

We previously developed different human cell systems of tumor reversion and found 263 genes differentially expressed. Among them, *Tpt1* was highly downregulated in the tumor revertants that display a suppressed malignant phenotype [17]. To identify the mouse homolog of *Tpt1*, we searched the Ensembl genome database with a highly conserved fragment corresponding to the third exon of human *Tpt1* (Accession No. AJ400717, nts 2111–2301). The blast analysis showed numerous *Tpt1*-

related sequences dispersed throughout the entire mouse genome. A search in the same database with *Tpt1* mouse cDNA (Accession No. NM\_009429) [5] yielded an equivalent result. The seven highest scores of both blasts were identical and localized putative *Tpt1* genes to chromosomes 3, 4, 6, 7, 9, 14, and X (Table 1). Chromosome (Chr) 6, 9, and 14 *Tpt1* genes are considered a cluster of genes in the Ensembl database. A BLAST search with the mouse cDNA in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database also identified most of the *Tpt1*-like sequences supplied by Ensembl. It is of note that the NCBI database links the published mouse *Tpt1* mRNA (NM\_009429) to chromosome 6. The present study is based on the seven highest score sequences obtained from Ensembl database searches.

### Comparison and analysis of the mouse *Tpt1* genes

Alignment of the seven putative cDNA *Tpt1* genes shows a high level of similarity starting at the ATG and including their 3' UTR (Fig. 1). Chr 3, 4, and X *Tpt1* genes show many differences in their 5' ends. Chr 7 *Tpt1* presents short additional sequences that do not seem to correspond to introns because they lack typical splicing sites. Chr 6, 9, and 14 *Tpt1* genes show the highest similarity, containing elements described by Gross et al. [6], Thiele et al. [24], and Chitpatima et al. [5]. The first element is a typical polypyrimidine tract (CTTTTCCG), important for translational regulation. The mammalian target of rapamycin, situated downstream of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) signaling pathway, was reported to participate in the regulation of such translationally controlled elements [25,26]. The second element is a GC-rich segment in the 5' part, generally present in housekeeping genes. The third element is an AT-rich sequence at the 3' end; it is described to induce instability of the mRNA [27] and it is also found in human *Tpt1* [6]. Note that between the Chr 6 and 14 *Tpt1* cDNAs there are only two base pairs of difference in the 5' end (Fig. 1). The mutations observed in the predicted cDNA sequence of Chr 3, 4, 7, and X *Tpt1* genes result in the interruption of the open reading frame. Therefore, these genes should not be able to produce proteins with the

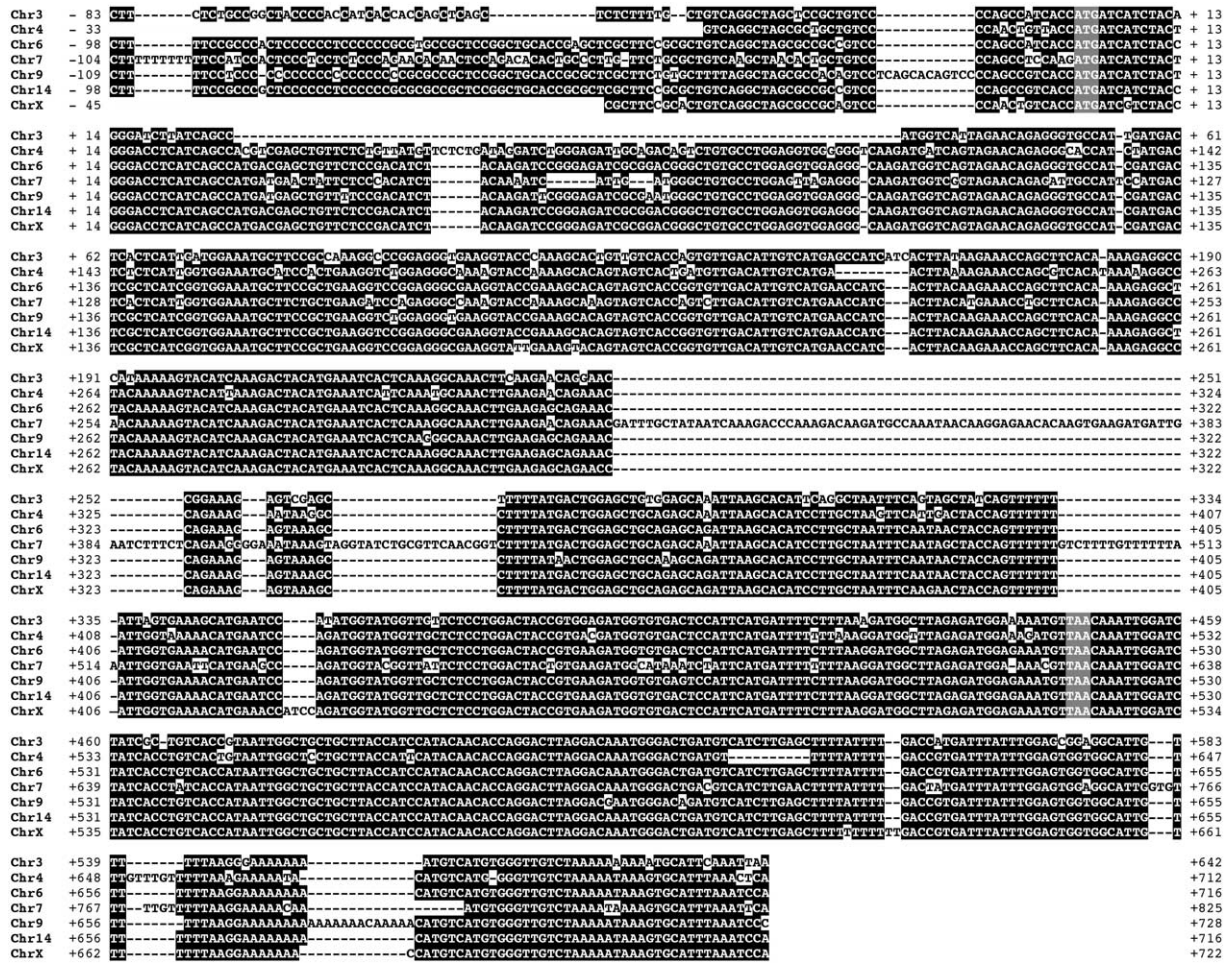


Fig. 1. Alignment of the *Tpt1* sequences. ClustalW multiple alignment of the *Tpt1* sequences showing the similarity between the *Tpt1* genes resident on different chromosomes. Identical nucleotides are indicated in black. Gray nucleotides show the start and stop codons.

expected molecular weight of TCTP. Finally, no apparent transcription initiation site was found on the *Tpt1* genes situated on chromosomes 4 and X, suggesting that transcription of these genes is not possible.

In conclusion, the sequence analysis limited the number of genes able to express functional TCTP to the genes situated on Chr 6, 9, and 14.

To verify our computational studies we first sequenced 3 kb upstream and 3 kb downstream the Chr 6, 9, and 14 *Tpt1* genes. We then tested by Southern blot analysis the presence of a *Tpt1* on Chr 6, 9, and 14. For this purpose, genomic DNA was digested with enzymes that generate fragments among which only one is recognizable by both cDNA *Tpt1* and a chromosome-specific probe. Fig. 2A shows that cDNA *Tpt1* recognizes several fragments. The specific probes for Chr 6, 9, or 14 detected one band per digestion reaction (Figs. 2B–2D). Each of these bands corresponded in size to one of the fragments recognized by the cDNA probe in Fig. 2A. We therefore conclude that a *Tpt1* is present on Chr 6, 9, and 14.

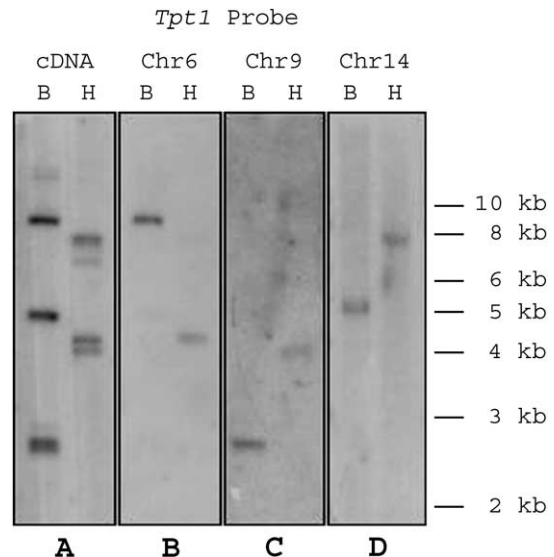


Fig. 2. Southern blots on mouse genomic DNA. Southern blots of mouse genomic DNA digested with *Bam*HI (B) or *Hind*III (H). The hybridization with the *Tpt1* cDNA probe reveals several bands (A). Specific probes designed in the 5' UTR region of diversity of the Chr 6, 9, or 14 *Tpt1* genes were then used to identify the different bands (B, C, D, respectively).

Table 2  
Identification of flanking repeated sequences

<i>Tpt1</i>	5'-Flanking region <sup>a</sup>	3'-Flanking region <sup>a</sup>
Chr3	... <u>gata</u> <u>ctatttcg</u> aggcCTT.....GTC...	...AAATTAA (a) <sub>5</sub> t (a) <sub>3</sub> t (a) <sub>3</sub> g (a) <sub>4</sub> gaa <u>actat</u> tttgagata...
Chr4	...cagtttaggaagggga (n) <sub>126</sub> cctGTC...	...AAACTCActttt (a) <sub>6</sub> cg (a) <sub>5</sub> (n) <sub>23</sub> aatttaggaagtca...
Chr6	...ctaga <u>aatttcagaatc</u> acgCTT..CGC..GTC...	...AAATCCA (a) <sub>3</sub> g <u>aatttcagaatc</u> acacc...
Chr7	...aaga <u>atgtatcag</u> gagCTT.....GTC...	...AAATTCA (a) <sub>3</sub> (t) <sub>5</sub> caa <u>atgtatcag</u> gaggtgt...
Chr9	...aaattggagagag <u>atag</u> CTT..CGC.....	...AAATCCC (c) <sub>6</sub> (a) <sub>8</sub> ttgagagagaaagctc...
ChrX	...caag <u>tatgagcca</u> CGC..GTC...	...AAATCCActtt (a) <sub>15</sub> caag <u>tatgagcca</u> cta...

<sup>a</sup> Direct repeats representing the genomic integration sites are underlined. Nucleotides of the cDNA are indicated in capital letters.

### Identification of pseudogenes

Because many human and rabbit *Tpt1* pseudogenes have been described [7], it was possible that some of the mouse *Tpt1*s found were also pseudogenes. Pseudogenes are sequences of genomic DNA that are very similar to normal genes but that are regarded as nonfunctional copies of genes. They can be generated by duplication or by retrotransposition and defined as nonprocessed or processed pseudogenes, respectively. Retrotransposition is a reverse transcription of a mRNA transcript with subsequent reintegration of the cDNA into the genome. Such processed copies of genes are characterized by the presence of both direct repeats flanking the complete cDNA sequence and residual poly(A) tails.

Sequence analysis indicated that the 5'- and 3'-flanking regions of Chr 3, 4, 6, 9, and X *Tpt1* genes contained direct repeats and residual poly(A) sequences indicative of putative processed pseudogenes (Table 2). For Chr 7 *Tpt1* we were able to find direct repeats, but no remaining poly(A) tail. Because Chr 7 *Tpt1* also contains nucleotide stretches in addition to the cDNA, it rather resembles a nonprocessed pseudogene. By contrast, none of these features were observed for Chr 14 *Tpt1*. Moreover, sequence analysis of genomic *Tpt1* genes revealed the absence of introns for Chr 6 and 9 *Tpt1* genes and an intron–exon organization for Chr 14 *Tpt1*. Thus, the structure and organization of mouse Chr 3, 4, 6, 7, 9, and X *Tpt1* genes reveal that they are pseudogenes, whereas Chr 14 *Tpt1* may represent the functional gene. It is of note that the cDNA sequence predicted from the Chr 14 *Tpt1* cDNA is identical to the sequence published by Chitpatima et al. [5], except for two nucleotides in the polypyrimidine tract.

### Study of the expression of the *Tpt1* genes

Pseudogenes are generally considered inactive, but some studies report the transcription of processed and unprocessed pseudogenes [28,29]. To establish which of the *Tpt1* genes is (are) expressed, we conducted reverse transcription on total RNA from the mouse M1 cell line. We subsequently sequenced the products obtained by PCR using a reverse poly(T) primer and a forward primer common to Chr 6, 9, or 14 *Tpt1* genes. A RACE PCR approach on total

RNA of pooled mouse tissues was also used. Sequence analysis of 27 clones from reverse transcription and 20 clones from the RACE experiments showed that only the *Tpt1* localized on chromosome 14 was expressed. Sequencing of the 3' UTR revealed also a unique polyadenylation site, in contrast to human and rabbit genes in which two mRNAs deriving from alternative polyadenylation sites have been found [7].

To test the presence of different transcripts in various tissues, we carried out quantitative RT-PCR (Fig. 3). Specific primers were designed for amplification of Chr 6 or 14 *Tpt1* genes and for Chr 9 *Tpt1*. Using quantitative RT-PCR, it was not possible to find primers able to discern between the highly homologous Chr 6 and 14 *Tpt1* genes. Once we verified that these primers were working properly on the isolated genomic clones and that they were specific for the *Tpt1* genes localized on different chromosomes (Fig. 3A), we concluded that in all tissues analyzed, only the expression of a transcript amplified by the primer Chr 6/14 *Tpt1* genes was detectable (Fig. 3B).

To further analyze the expression of the mouse *Tpt1* gene in different tissues, we used the full-length *Tpt1* cDNA as a probe for Northern blot experiments. *Tpt1* was found expressed in all the tissues analyzed, with the lowest expression level in brain and the highest in liver and kidney (Figs. 3C and 3D). Only one *Tpt1* transcript was detected in all the tissues analyzed (Fig. 3C).

We then investigated the expression of Chr 6, 9, and 14 *Tpt1* genes by their in vitro promoter activity (Fig. 4). Equal fragments of the 5'-flanking region (–1041/+188, position calculated from the ATG) of the *Tpt1* genes present on Chr 6, 9, and 14 were cloned into a promoterless luciferase vector and transiently expressed in 293T cells. In these cell lines the Chr 14 *Tpt1* has a promoter activity 3 times higher than the simian virus-40 (SV40) promoter and 30 times higher than the Chr 6 *Tpt1* promoter. A similar situation was earlier described in the rabbit, in which two of the identified pseudogenes showed in vitro promoter activity [7]. Chr 9 *Tpt1* was not expressed in our analysis. Further studies on the promoter of Chr 14 revealed that the region restricted to the –280/+188, still containing the TATA box (see Fig. 5B), has a 5-fold lower promoter activity than region –1041/+188. The region –60/+188, which does not contain the TATA box, has no promoter activity. In contrast to

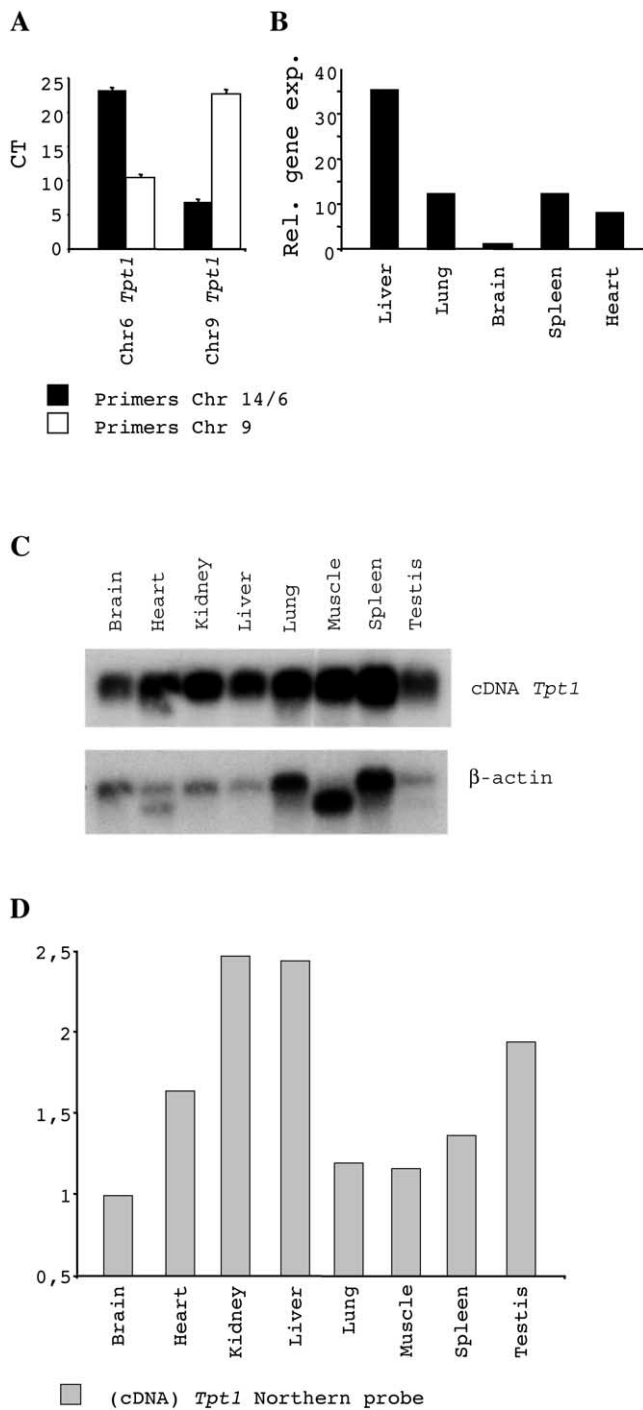


Fig. 3. Tissue distribution and expression of *Tpt1*. Quantitative RT-PCR using primers specific for chr 9 *Tpt1* or Chr 6 and 14 *Tpt1* (the two last primers do not differentiate between the *Tpt1* genes on the two chromosomes). (A) Specificity of the primers on either the template Chr 6 *Tpt1* or the template Chr 9 *Tpt1*. CT, Cycles of threshold. (B) Only the expression of the transcript amplified by the primer Chr 6/14 *Tpt1* were detectable in the mouse tissues analyzed. The graph shows the relative gene expression. The data shown are representative of three independent experiments. (C) Poly(A)<sup>+</sup> northern blot of mouse mRNAs from different tissues (Stratagene) hybridized with mouse *Tpt1* cDNA (Accession No. NM\_009429). (D) Quantification of the northern blot shown in (C) using a  $\beta$ -Imager.

NCBI Locus Link, which situates mouse *Tpt1* only on Chr 6, our data strongly indicate that Chr 14 *Tpt1* is the functional gene encoding TCTP.

#### Genome organization of the mouse *Tpt1* gene

We sequenced 2.9 kb at the 5' UTR and 2.9 kb at the 3' UTR of the Chr 14 *Tpt1*, which allowed us to complete and confirm the data partially present on the Ensembl database (Accession No. ENSMUSG00000022004). A search of the NCBI database revealed the contig Mm14\_WIFeb01\_281 sharing identity with our resulting sequence. The presence of the marker *D14Mit116* (position 14, 43.0 cM) in this contig indicates its position on Chr 14, confirming the localization of *Tpt1* in the mouse genome at ~11 kb from this marker.

We defined the *Tpt1* genomic structure by comparison between the genomic sequence, the cDNA sequence resulting from RACE and RT-PCR experiments, and the mRNA sequence found in the NCBI database (Accession No. NM\_009429). The 516-bp cDNA is interrupted by five introns (of 160, 513, 300, 444, and 738 bp) whose splicing sites follow the GT/AG rule (Fig. 5A). The translation initiation site is present on exon 1. The translation termination site TAA and the 3' UTR are found on exon 6. A similar genomic organization has earlier been reported for the rabbit and human *Tpt1* genes [24].

Computational analysis of a putative promoter region is a useful first approach to identify binding sites for transcription factors on the basis of similarity to typical consensus sequences. We then used the Transfac database to search for typical promoter elements and possible transcription factor-binding sites in the 5' UTR of Chr 14 *Tpt1*. In the analysis of 1.35 kb upstream of the ATG, we found a TATA box in typical position (–30 nts from the transcription-initiation site). The potential binding sites for transcription factors are shown in Fig. 5B. The 3' end contains three sequences rich in AT. Such sequences have been described as inhibitory elements because of their involvement in mRNA destabilization and inhibition of translation [27]. This theoretical analysis reveals a high similarity between the promoter region of mouse *Tpt1* and the one described in rabbit [24].

In conclusion, mouse *Tpt1*, whose protein product TCTP is involved in tumor growth, allergic response, apoptosis, and cellular organization, is a gene localized on Chr 14 band D2. The 4.2-kb *Tpt1* genomic region, described in the present study, contains a functional promoter, six exons, five introns, and three putative inhibitory elements.

## Materials and methods

### Sequence analysis

NCBI and Ensembl databases were searched with the BLAST algorithm [30]. Alignment of the different se-

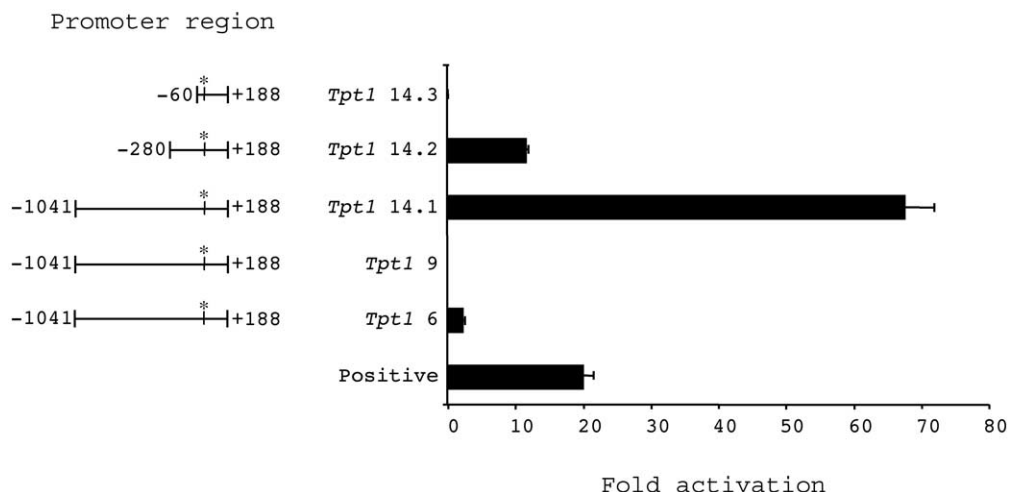


Fig. 4. Luciferase assay. Transcriptional activities of the *Tpt1* genes promoter measured by luciferase assay. The positive control corresponds to the SV40 promoter. The luciferase activity is normalized to the negative control (empty vector). The fold of activation was calculated as the ratio between normalized activity and negative control activity. The \* indicates the starting codon. The standard deviation was calculated using four independent experiments.

quences was undertaken using the ClustalW multiple-alignment software [31]. The promoter region was analyzed using the MatInspector program version 2.2 on Transfac 4.0 genome database (<http://transfac.gbf.de>) [32].

#### Cloning of genomic *Tpt1*

Genomic mouse DNA was extracted from embryonic stem (ES) cells using a lysis buffer containing 4 M urea, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.5% Sarkosyl, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.2 M NaCl, 1 mg/ml proteinase K, and 0.1 mg/ml RNase. Different genomic fragments were obtained by PCR reaction using 100 ng of the genomic DNA and following the manufacturer's instructions (Expand Long Template PCR System, Roche Diagnostics, France). These fragments were cloned in pBluescript II SK(+) (Stratagene, CA, USA) and sequenced using an Applied Biosystems 3700 ABIPrism.

#### Southern blot

Twelve- $\mu$ g of mouse genomic DNA was digested with either *Bam*HI or *Hind*III (NEBiolabs, MA, USA). The resulting samples were divided into four wells and run on a 0.8% agarose gel before being capillary-transferred to a nylon membrane (Positive TM membrane, Appligene, France). We prehybridized the four lanes separately for 1 h at 68 °C in 20 ml of QuickHyb solution (Stratagene, CA, USA) containing 40  $\mu$ g/ml salmon sperm DNA. *Tpt1* cDNA was obtained by reverse transcription from M1 cells. This cDNA was used as a template to generate the probe starting from the ATG and ending at the TAA (Accession No. NM\_009429). Probes specific for each chromosome were designed in the 5' end of the gene as follow: Primers for Chr 6: Forward: 5'-TCAACTAGTGTGCAGTGGTAT-

GAGAGGTA-3' Reverse: 5'-TTCGAGCTCTCTAGTCC-ATGCAGCTGCAT-3' Primers for Chr 9: Forward: 5'-GG-GATGCATTGACTTAAGGTGTGAGG-3' Reverse: 5'-GG-GTAATCCCTGAGCAAATGTAGCACC-3' Primers for Chr 14: Forward: 5'-CTCCGCGAGCAAAACCGGTGCAGTCT-GTGG-3' Reverse: 5'-ATCCGGGGACTCTGCTGGGACA-CAATGCGG-3'

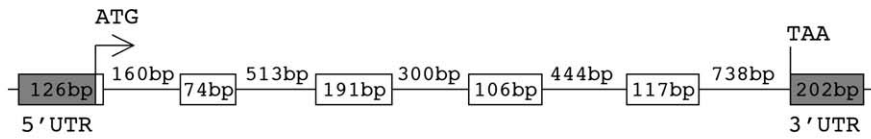
Probes were amplified by PCR on genomic ES cell DNA, purified on agarose gels, and radioactively labeled using the Rediprime II kit (Amersham, France), and 50 ng of each was added to the prehybridizing solution. Hybridization was conducted for 2 h 30 min at 65 °C. Membranes were washed and exposed to Biomax MR films (Kodak, France).

#### Quantification of the mRNA levels by Northern blotting and real-time PCR

Poly(A)<sup>+</sup> MessageMap Northern blots were bought from Stratagene (CA, USA). The *Tpt1* cDNA was used as probe and the normalization was done using  $\beta$ -actin cDNA. For the quantitative analysis the membranes were exposed on a  $\beta$ -Imager 2000 (Biospace Mesures, France). A first acquisition was made with the *Tpt1* and a second with  $\beta$ -actin, both using a reference membrane to correct data from possible efficiency variation (<8% measured). The activity of each band was measured by integrating the counts per minute (c.p.m.) of the band and corrected by noise subtraction and efficiency.

For semi-quantitative analysis of mRNA levels by real-time PCR, total RNA from various mouse tissues was prepared using RNeasy mini kit (Qiagen, France). cDNA was synthesized from 500 ng of total RNA with High-Capacity cDNA Archive kit (Perkin Elmer, MA, USA). PCR reactions from 1 ng of cDNA template were done on ABI 7700 and 7900 Taqman, using SYBR Green 1 master mix (Per-

**A**



**B**

```

-1350          agaatatgtttggggatctatgtaaatgagcatttttgaataatttgaanaat -1299
                                     MZF1          S8
-1298  gaatacctgggatgtgcaanaaagattcacataaactcagaanaaactgagtttgagactgctaaagctatagccctcgg -1219
                                     IK2          AF1
-1218  ttctatgtctacgtttttctgatgtctctcacttttttactgttaccocgtgtcctttagagtatctaggaagcagcaga -1139
                                     GATA1
-1138  ccaccgcatcttaagtggacggtttttctctgtctctttggctagagttttatctcogaagtggtttactctgtgcttgta -1059
                                     NF1
-1058  acactttgttagtgtgtaactgccttctcctttgacataactaacctctctgtccgaggcgaggcaggctggctatg -979
                                     SRV2
-978   tcttcttaagcggagaaaattgcaacactagggttacaacggactataaccaaatctggaaggaagaaactgtgattt -899
-898   atcttgccatcatgttttacctgaacggtgggtctcggaaagttgtatgttactctcgtgggtgagcaaacgcttca -819
-818   agtgaccocgggcaagtggaagctccttattttgggtctgtttagtctgcacgcaggaataaaaagggaataaaagtga -739
                                     IK2          GATA1
-738   caatacagaactgtcctaacaaaggacacggtttgcaccaagagcagaacaggccagcgaagagctgtccggccagacc -659
-658   caccgagaggttctaaccttcggaacccactagaggaccagtcctccaggacatctcctcccgagcaaaaacggtgcaag -579
                                     MZF1
-578   ctgtgggcaagcaagcaggcggagctggagacccgggaacaccgocggcgcacatcccgtagtcccccagggctcaagcg -499
                                     NF1          CEts1p54          MZF1
-498   gcgccggcagacaacagctatccgatctctgtgacattttcttccgagaaaaggggtgggaactgaagcggctggcggga -419
-418   ggcggggcgagctcaccacctggccacgcccggggcgagcactcaagcgtccggccatcggtccggcgaagtccctctcc -339
                                     SP1
-338   gtcccagcatgcccggggcgcactatccgcacacggcccccgttgcocccgcgaccccaggggcactccgcaattgtgtcc -259
                                     SP1
-258   agcagagtcctccggatgcccctccggggcgccggcgctgagccacgccccgcacccgcccctgcttcaagtcaccgctg -179
                                     GATA2          ATF1
-178   acgacagttccgggggagcccgggagcgtgacgtagcagcagcgtgcccctctatataggttgggggagcggcccgctcggc -99
                                     c-Ets1          ATF, AP1f          TATA          MZF1
-98   CTTTTCGCCCGCTCCCCCTCCCCCGCGCGCGCTCCGGTGCACCCGGCTCGCTCCGGCTGTGAGGCTAGCGCCG -19
-18   CCGTCCCAGCCGTCACC ATG ATC ATC TAC CGG GAC CTC ATC AGC C gtaagtcocggcgcccgcggggcc -51
1     M I I Y R D L I S H 10
+52  tgggtcgggtgggcaacggggaggccggggagcagcagcagagcttggccgggagcccgcgctgcgcgagcccgccg -131
+132  cggggaaatgggggcttcctcgtctcgtctcagcggcgctctctctgttcccttcaag AT GAC GAG CTG TTC +202
11                                     D E L F F
+203  TCC GAC ATC TAC AAG ATC CGG GAG ATC GCG GAC GGG CTG TGC CTG GAG GTG GAG GGC AAG +262
15 S D I Y K I R E I A D G L C L E V E G K 34
+263  gtgagcggggcgccgocggcggggaggtggcgcctgctcgcgggttggcggagccggggcggtggggcgcc +342
+343  gcggggagggcgcctggaactcgtgcaatcctcgtgcgcgcctccaggcgggagagacgctcttgcggccttgggttttt +422
+423  ctgaaaaagtggagcggcggagcgcctggaaataggtccgcgcaactcagcgcctcctcttccggggcaacggggaca +502
+503  tattgtctataagacaggtttgcgctgtgcgcgcttaacccgtggcgactcagagagggccacagcaacttggttccgct +582
+583  tgatgagagtgaccacctctctcagtcocgggcaagcagactatttggggtaggttaagatgttccaggagagctgactgat +662
+663  cggtgcggcaccctttttttttctctcttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt +740
+741  ttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttttt +806
35 M V S R T E G A I D 45
+807  TCG CTC ATC GGT GGA AAT GCT TCC GCT GAA GGT CCG GAG GGC GAA GGT ACC GAA AGC ACA +866
46 S L I G G N A S A E G P E G E G T E S T 65
+867  GTA GTC ACC GGT GTT GAC ATT GTC ATG AAC CAT CAC TTA CAA GAA ACC AGC TTC ACA AAA +926
66 V V T G V D I V M N H H L Q E T S F T K 85
+927  GAC GCT TAC AAA AAG TAC ATC AAA GAC TAC ATG AAA TC gtaagtacataaacaccccgcttttggtg +993
86 E A Y K K Y I K D Y M K S 98
+994  gtcagcttctagaagaagttgggttcttaggttaggtaggaggggttaagaagaaggggtcttttattacagtgaaagttg +1073
+1074  atttcaataatgtgagcaagcggtagaagaagttactttaaaggttaataaggaatatactcttttaaatgggttctgt +1153
+1154  tcaactagtaaacatcatattttgctagaagaacattacattggagcttatattcttacttactgaaagattatctagtt +1233
+1234  attttgatgaccttacttactctgttttag A CTC AAA GGC AAA CTT GAA GAG CAG AAA CCA GAA +1298
99 L K G K L E E Q K P E 109
+1299  AGA GTA AAG CCT TTT ATG ACT GGA GCT GCA GAG CAG ATT AAG CAC ATC CTT GCT AAT TTC +1358
110 R V K P F M T G A A E Q I K H I L A N F 129
+1359  AAT AAC TAC CAG gtaaatggaccaaaggttataaataactgtgggatccgaaaaagctgtgttctgtctcgtga +1434
130 N N Y Q 133
+1435  catggctctggctgctctggaacaccttagaccagttacctcagcctctgagatgaaagtctcagccctttttgtgt +1514
+1515  agcaccaccaccagggcaagagctgtgtatataaatgatagcattgtctttcttctcattgagactgttatctgtagaccag +1594
+1595  actagccttgaacccagaggtctcactgcagctgctcttaattgctgggattaaaggtgtgtgccaacatggctagcact +1674
+1675  atgtgtatttttggagaactaggggtttttcttgcacaaattttggccaggggttatctggatctgcttttataagttg +1754
+1755  atttatatttgggtgtataagatagctcaattgtaggtttttgttacgtgtttcttaag TTT TTT ATT GGT +1826
134 F F I G 137
+1827  GAA AAC ATG AAT CCA GAT GGT ATG GTF GCT CTC CTG GAC TAC CGT GAA GAT GGT GTG ACT +1886
138 E N M N P D G M V A L L D Y R E D G V T 157
+1889  CCA TTC ATG ATT TTC TTT AAG GAT GGC TTA GAG ATG GAG AAA TGT gtaagtatctttaaatagtt +1951
158 P F M I F F K D G L E M E K C 172
+1952  agtgcacaagcagggagtcagcagtgatcttggcactcgcaggtggcagggcctgtgagattgtgagatctttatctc +2031
+2032  gtgggagatgagcctgaaacatgaaagggcttgaagatgagattagctggctgctagagctcctcagggctcagctgtgt +2111
+2112  gtaagtagttgacactggcctgggataaactcactagaaatgagtggtctctgcccacggtagtctcaagctccattc +2191
+2192  catattacatgcaataggatgttctcaggtttactgaggtcagtaagaaggaatacagaataatgtctgtttataagggc +2271
+2272  tgggtgagacagtgctcctgctcactagatttggaggcttttttggtaagcagtagaaggtgagtttagagatgact +2351
+2352  ggagaaagtgggtgaccocctgggacagtggggttaggaggtttattcagacaacacagctggtgtttgtcagtagagcactg +2431
+2432  gagtgggcaggaagatgggtgagtgctgccaactcgtgagggtctgcactccactgatagacctgcaacagtttgggtt +2511
+2512  gtctctctgggttgcactaggtgcaaaaaggaaactctcctcgcgtctcctgcctccttggcaggttcagattgaaat +2591
+2592  tagggagtagctcactgctagggcaggtataaagctcagcctggggcaggtgttaagcctctctgttttttttttttttt +2669
+2670  TAA CAAATTGGATCTACCTGTCAACCAATAATTGGCTGCTGTACCATCCATACACACCAGGACTTTAGGCACAAA +2748
173 * 173
+2749  TGGGACTGATGTCATCTTGGCTTTTATTGACCGTATTATTGGAGTGGTGGCATTGTTTTTTTAAAGGAAAAAATA +2828
+2829  CATGTCATGTGGTGTCTAAATAATAAAGTGCATTTAAATCCA +2871
    
```

Fig. 5. Organization and genomic sequence of *Tpt1*. (A) Intron-exon organization of the mouse Chr14 *Tpt1*. (B) Complete sequence of the mouse Chr14 *Tpt1*. Putative binding sites for transcription factors are underlined and indicated in the 5' UTR. Three possible translation-inhibitory elements in the 3' UTR are also underlined. Coding sequence nucleotides are in capital letters. The corresponding amino acids are indicated below.

kin Elmer, MA, USA). All primers were verified against the mouse genome databases, and tested on the constructs for specificity. Their sequences are as follows: Chr 6/14/X Forward: 5'-CCGGGAGATCGCGGAC-3' Chr 9 Forward: 5'-GATTCGGGAGATCGCGAAT-3' Reverse: 3'-TTCCACCGATGAGCGAGTC-5' (common to Chr 6, 9, 14, and X *Tpt1*)

Relative gene expression values were obtained with the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method with respect to the endogenous  $\beta_2$ -microglobulin RNA.

#### Analysis of the reverse transcripts of *Tpt1s*

We used 5  $\mu$ g of total RNA from mouse M1 cell lines for reverse transcription with T-Primed First Strand kit (Amersham, France). One-tenth the reaction was used for PCR with Expand Long Template (Roche, France). The primers used for the PCR are the following: Reverse: 5'-GAGAGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3' (poly dT with *NotI* site) Forward: 5'-CCCCTCGACGCCGCTCCGGCTGACCCG-3' (5' UTR region of sequence identity)

The PCR products obtained were cloned in pBluescript at *NotI* and *Sall* sites. RACE-PCR was performed using the Marathon cDNA Amplification kit (Clontech, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Briefly, total RNA derived from pooled mouse tissues (brain, heart, lung, liver, kidney, muscle, testis, and ovary) was subjected to reverse transcription using a modified oligo d(T) primer. The resulting cDNAs were ligated to an adapter and used as templates for PCR in the following primers: Forward: 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (adapter-specific primer) Reverse: 5'-ATGGATATCGACAATGTCAACACCGGTGAC-3' (*Tpt1* primer)

The PCR products were cloned into pBluescript at the *NotI* and *EcoRV* sites. Control PCR reactions using the same primers directly on the RNA samples were done to rule out any possible contamination by remaining genomic DNA. Reverse transcription and RACE-PCR clones were sequenced using the T7 primer.

#### Luciferase assay

The promoter region -1041/+188 of Chr 6, 9, and 14 *Tpt1* have been cloned into a pGL3 enhancer vector (Promega, USA). Furthermore, two shorter regions, -280/+188 and -60/+188, of Chr 14 *Tpt1* promoter were analyzed. These constructs were transfected into the 293T cell line using Lipofectamine Plus reagents (Invitrogen, France) following the manufacturer's instructions. After 24 h the cells were washed and lysed in a buffer containing 25 mM Tris phosphate, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol (DTT), 1% Triton, and 15% glycerol. Luciferase activity was measured with the Victor Luminometer (Perkin Elmer, MA, USA) on the cell lysates supplemented with luciferin (Boehringer Mannheim, Germany) and 1 mM ATP. The empty pGL3 enhancer vector was used as negative control, and the pGL3 SV40 control vector (Promega, WI, USA) as positive control.

#### Acknowledgment

We thank Biospace Mesures (10 Rue Mercœur, 75011 Paris, France) for the quantification of the Northern blots.

#### References

- [1] R. Yenofsky, I. Bergmann, G. Brawerman, Messenger RNA species partially in a repressed state in mouse sarcoma ascites cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 (1982) 5876–5880.
- [2] R. Yenofsky, S. Cereghini, A. Krowczynska, G. Brawerman, Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide, Mol. Cell. Biol. 3 (1983) 1197–1203.
- [3] R. Benndorf, P. Nurnberg, H. Bielka, Growth phase-dependent proteins of the Ehrlich ascites tumor analyzed by one- and two-dimensional electrophoresis, Exp. Cell. Res. 174 (1988) 130–138.
- [4] H. Boehm, et al., The growth-related protein P23 of the Ehrlich ascites tumor: translational control, cloning and primary structure, Biochem. Int. 19 (1989) 277–286.
- [5] S.T. Chitpatima, S. Makrides, R. Bandyopadhyay, G. Brawerman, Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells, Nucleic Acids Res. 16 (1988) 2350.
- [6] B. Gross, M. Gaestel, H. Bohm, H. Bielka, cDNA sequence coding for a translationally controlled human tumor protein, Nucleic Acids Res. 17 (1989) 8367.
- [7] H. Thiele, M. Berger, A. Skalweit, B.J. Thiele, Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled tumour protein (TCTP), Eur. J. Biochem. 267 (2000) 5473–5481.
- [8] A. Pay, E. Heberle-Bors, H. Hirt, An alfalfa cDNA encodes a protein with homology to translationally controlled human tumor protein, Plant Mol. Biol. 19 (1992) 501–503.
- [9] L. Bini, et al., Two-dimensional gel electrophoresis of *Caenorhabditis elegans* homogenates and identification of protein spots by microsequencing, Electrophoresis 18 (1997) 557–562.
- [10] J.C. Sanchez, et al., Translationally controlled tumor protein: a protein identified in several nontumoral cells including erythrocytes, Electrophoresis 18 (1997) 150–155.
- [11] Y. Gachet, et al., The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin-binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle, J. Cell. Sci. 112 (1999) 1257–1271.
- [12] F.R. Yarm, Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP, Mol. Cell. Biol. 22 (2002) 6209–6221.
- [13] S.M. MacDonald, T. Rafnar, J. Langdon, L.M. Lichtenstein, Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor, Science 269 (1995) 688–690.
- [14] H.S. Kang, et al., Molecular identification of IgE-dependent histamine-releasing factor as a B cell growth factor, J. Immunol. 166 (2001) 6545–6554.
- [15] P. Thaw, et al., Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones, Nat. Struct. Biol. 8 (2001) 701–704.
- [16] J.L. Burton, M.E. Burns, E. Gatti, G.J. Augustine, P. De Camilli, Specific interactions of Mss4 with members of the Rab GTPase subfamily, EMBO J 13 (1994) 5547–5558.
- [17] M. Tuynder, et al., Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (2002) 14976–14981.
- [18] E. Yonish-Rouach, et al., Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6, Nature 352 (1991) 345–347.



- [19] R.B. Amson, et al., Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in p53-induced apoptosis: activation of the vertebrate homologue of the *Drosophila* seven in absentia gene, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1996) 3953–3957.
- [20] D. Zhang, F. Li, D. Weidner, Z.H. Mnjoyan, K. Fujise, Physical and functional interaction between MCL1 and fortilin. The potential role of MCL1 as a fortilin chaperone, J. Biol. Chem. 30 (2002) 30.
- [21] F. Li, D. Zhang, K. Fujise, Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein, J. Biol. Chem. 276 (2001) 47542–47549.
- [22] M. de Fatima Bonaldo, et al., Identification and characterization of three genes and two pseudogenes on chromosome 13, Hum. Genet. 97 (1996) 441–452.
- [23] S.M. MacDonald, W.A. Paznekas, E.W. Jabs, Chromosomal localization of tumor protein, translationally controlled 1 (TPT1) encoding the human histamine-releasing factor (HRF) to 13q12 >q14, Cytogenet. Cell. Genet. 84 (1999) 128–129.
- [24] H. Thiele, M. Berger, C. Lenzner, H. Kuhn, B.J. Thiele, Structure of the promoter and complete sequence of the gene coding for the rabbit translationally controlled tumor protein (TCTP) P23, Eur. J. Biochem. 257 (1998) 62–68.
- [25] M. Kleijn, et al., Nerve and epidermal growth factor induce protein synthesis and eIF2B activation in PC12 cells, J. Biol. Chem. 273 (1998) 5536–5541.
- [26] B. Raught, A.C. Gingras, N. Sonenberg, The target of rapamycin (TOR) proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001) 7037–7044.
- [27] V. Kruys, B. Beutler, G. Huez, Translational control mediated by UA-rich sequences, Enzyme 44 (1990) 193–202.
- [28] F. Renaudie, A.K. Yachou, B. Grandchamp, R. Jones, C. Beaumont, A second ferritin L subunit is encoded by an intronless gene in the mouse, Mamm. Genome 2 (1992) 143–149.
- [29] R. Chakrabarti, J.B. McCracken Jr., D. Chakrabarti, W.W. Souba, Detection of a functional promoter/enhancer in an intron-less human gene encoding a glutamine synthetase-like enzyme, Gene 153 (1995) 163–199.
- [30] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, J. Mol. Biol. 215 (1990) 403–410, doi:10.1006/jmbi.1990.9999.
- [31] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, Nucleic Acids Res. 22 (1994) 4673–4680.
- [32] K. Quandt, K. Frech, H. Karas, E. Wingender, T. Werner, MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data, Nucleic Acids Res. 23 (1995) 4878–4884.

## **ANNEXE 2 : Article Fiucci et al. 2004**

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

Fiucci G, Beaucourt S, Duflaut D, Lespagnol A, Stumptner-Cuvelette P, Geant A, Buchwalter G, Tuynder M, Susini L, Lassalle JM, Wasylyk C, Wasylyk B, Oren M, Amson R, Telerman A PNAS. 2004

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<sup>†</sup>G.F. and S.B. contributed equally to this work.

<sup>||</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: atelerman@molecular-engines.com.

© 2004 by The National Academy of Sciences of the USA

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

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

## Materials and Methods

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

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

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

**Northern Blot Analysis.** Northern blot analyses were performed as described (24). The following probes were used: mouse p21 nucleotides 111/340 (accession no. NM\_007669), cyclin G1 nucleotides 202/443 (accession no. BC005534), and human GAPDH (Clontech). The probe CDS corresponds to the region nucleotides 251/896 of the human *siah-1* cDNA (accession no. U63295). A specific probe for *siah-1a* (probe a) was designed from the 3' UTR (nucleotides 1676/1934) of *siah-1a* mRNA (accession no. Z19579), whereas the specific probe for *siah-1b* (probe b) corresponds to nucleotides 1/230 in the 5' UTR of the mRNA (accession no. Z19580).

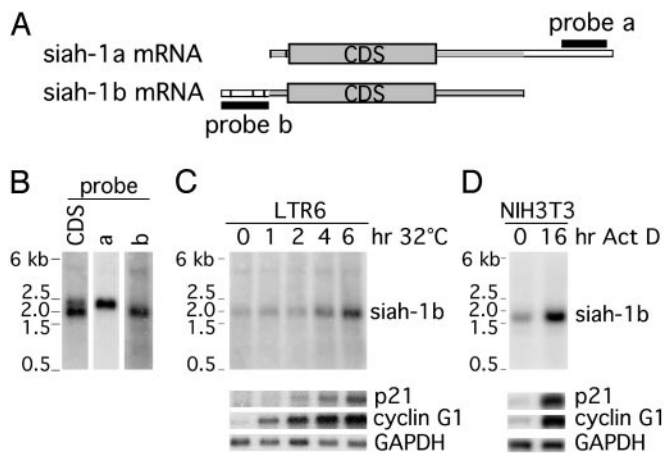
**Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE)-PCR.** The RACE-PCR was performed by using the Marathon cDNA Amplification kit (Clontech) following the manufacturer's instructions. In brief, mRNA derived from mouse cells was subjected to reverse transcription by using a modified oligo(dT) primer. The resulting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

**Luciferase Assays.** Cells were transfected with 300 ng of the different *siah-1b* promoter constructs (see *Cloning and Mutagenesis*) and 300 ng of pCMV vector, either empty or expressing mouse p53. Transfection was performed by using LipofectAMINE PLUS reagent (Life Technologies, Grand Island, NY) according to the manufacturer's recommendations. Twenty-four hours after transfection the cells were washed and cell extracts were prepared by using a reporter lysis reagent (25 mM Tris/8 mM MgCl<sub>2</sub>/1 mM DTT/1% Triton X-100/15% glycerol). After normalization of each extract for protein content, luciferase activity was measured by using the Victor Luminometer (Perkin-Elmer) after addition of 20 nmol of Luciferin (Roche Diagnostics) and 100 nmol of ATP (Sigma).

**Electrophoretic Mobility-Shift Assay.** Synthetic oligonucleotides containing the p53RE of *siah-1b*, either wild type (5'-TCTCAAGACATGTCCAGACC-3') or double mutant (5'-TCTCAAGATATATCCAGACCTCCCCTGATCACATTCAAAGGGTCTCAAGATATATCCAGACC-3') were radiolabeled at their 5' end by using T4 Polynucleotide Kinase (Biolabs) and [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (Amersham Pharmacia Biosciences). The complementary oligonucleotides were then annealed and purified on a polyacrylamide gel. The probes were incubated for 20 min at room temperature with 18 ng of recombinant p53 in a buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, and 0.5 mg/ml BSA; then 20 ng of DNA competitor poly(dI-dC) (Amersham Pharmacia) was added to a final volume of 30  $\mu$ l. To induce a supershift, 300 ng of p53-specific PAb421 antibody was included in the mixture, and the incubation was continued for 20 min at room temperature. The reaction products were analyzed by electrophoresis on a 4% nondenaturing polyacrylamide gel.

**In Vitro DNase I Footprinting.** The radiolabeled forward primer, 5'-CCATGGAGCCACCTCAGCTC-3', and the reverse primer, 5'-ACTAGTAATGAGTTTCCTCCTACATGAA-3', were used in PCR reactions with 25 ng of DNA of the following constructs: *siah-1b*, *siah-1b* mut1, or *siah-1b* mut2. The 410-bp labeled PCR product containing the p53RE in its center was used in DNase-I-footprinting experiments according to the Sure Core Footprinting protocol (Promega) with minor modifications. For each reaction, 500 ng or 1  $\mu$ g of p53 or 1  $\mu$ g of irrelevant protein were mixed with 500 ng of PAb421 antibody. After 30 min of preincubation on ice, 10 ng (30,000 cpm) of 5' end-labeled DNA was added, and incubation was carried out for another 30 min on ice. After adjusting the concentration to 5 mM CaCl<sub>2</sub> and 10 mM MgCl<sub>2</sub>, samples were digested with DNase I (0.15 unit) for 1 min at room temperature and resolved on a sequencing gel. DNA-sequencing reactions were done by using the SEQUENASE 2.0 DNA Sequencing Kit (USB).

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



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

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

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

## Results

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

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

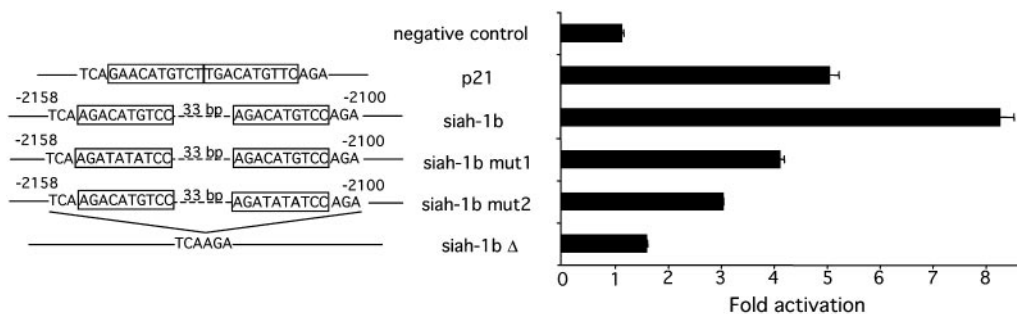
possible alternative splicing of the *siah-1b* first exon. The two different first exons (NM009173 and BC052887) described by Della *et al.* (21) or sequenced by the I.M.A.G.E. Consortium (<http://image.llnl.gov/>), respectively. Each represent 1/7 of the clones analyzed by us. The remaining 5/7 of the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

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

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

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

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



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

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

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

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

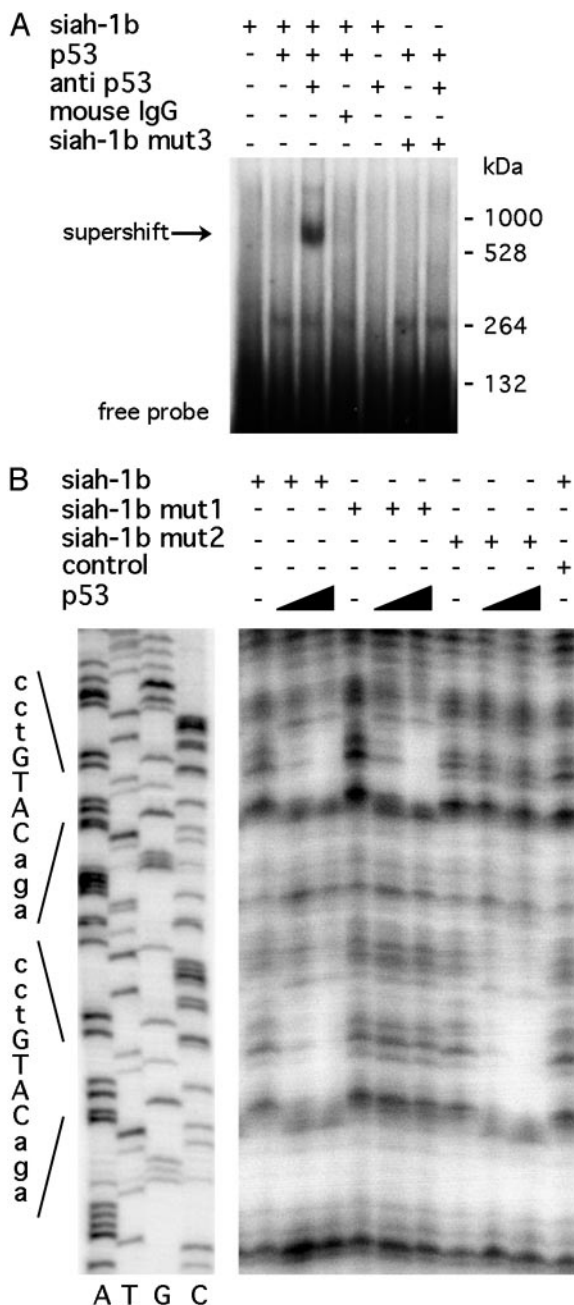
found in the *siah-1b* gene. In conclusion, electrophoretic mobility-shift assay and DNase I footprinting demonstrate that p53 is able to associate *in vitro* with the p53 consensus located at nucleotides  $-2155/-2112$  of the *siah-1b* gene.

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

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

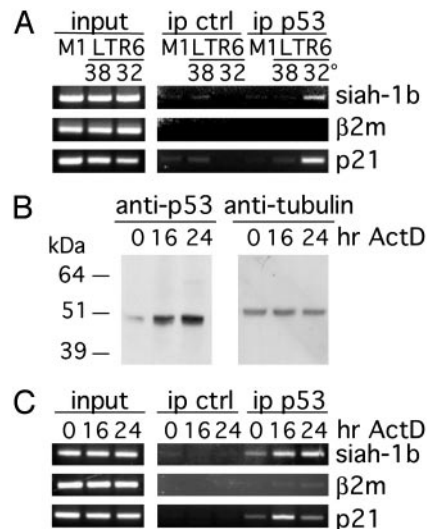
## Discussion

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



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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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