

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences, Technologies

GICC – UMR CNRS 6239

THÈSE

présentée par :

Dina Isabel ANTUNES IVO

soutenue le : **31 janvier 2011**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

**Menin: un nouvel acteur dans le cycle
cellulaire?**

THÈSE dirigée par :

Monsieur GAUDRAY Patrick

Directeur de Recherche HDR, CNRS, Tours

RAPPORTEURS :

Monsieur HAINAUT Pierre

Directeur de Recherche HDR, CIRC, Lyon

Monsieur ZHANG Chang Xian

Directeur de Recherche HDR, CNRS, Lyon

JURY :

Monsieur GASPAR Jorge

Professeur Associé, FCM/Universidade Nova de Lisboa

Monsieur GAUDRAY Patrick

Directeur de Recherche HDR, CNRS, Tours

Monsieur HAINAUT Pierre

Directeur de Recherche HDR, CIRC, Lyon

Monsieur HERAULT Olivier

Professeur des Universités - Practicien Hospitalier CHRU, Tours

Monsieur WEBER Günther

Professeur des Universités, Tours

Monsieur ZHANG Chang Xian

Directeur de Recherche HDR, CNRS, Lyon

Rien dans ce monde n'arrive par hasard (*Paulo Coelho*)

Rien n'aurait été possible sans le soutien financier de la "Fundação para a Ciência e a Tecnologia", au Portugal (dans le contexte des programmes: POPH, QERN et UE), à qui je tiens à remercier. Je remercie aussi Yves Bigot, ancien directeur du GICC, de la confiance qu'il m'a accordé depuis le premier apprentissage que j'ai effectué dans son laboratoire dans le cadre d'un stage de D.E.A. d'Infectiologie Moléculaire et Cellulaire et Vaccinologie, il y a déjà quelques années.

En trois ans, j'ai beaucoup appris sur la recherche, les personnes et le monde en général. Un grand merci à mon directeur de thèse, Patrick Gaudray, pour sa disponibilité et son soutien, sur le plan aussi bien humain que scientifique, tout au long de ce travail. Un grand merci aussi à toi Günther. Les séminaires des samedis après-midi m'ont été très utiles! Je garderai en mémoire plein de bons souvenirs : « vu que t'as rien à faire... ». MERCI pour tout !

Merci vivement à l'ensemble des membres du jury, Monsieur Chang Zhang et Monsieur Pierre Hainaut pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail, et aussi au Prof. Jorge Gaspar et à Monsieur Olivier Hérault, d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Evidemment, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidée, de près ou loin, à obtenir les résultats présentés dans ce manuscrit et à conclure cette étape de ma vie. J'espère ne pas en oublier ! Un merci tout particulier à mon équipe : à Laetitia (pour ses conseils utiles et son soutien dans les moments difficiles), à Laura, à Peng et Sami (pour ces grands moments de bonheur, de rire et d'échange). Merci du fond du cœur pour tous ces instants passés ensemble. Je veux aussi remercier deux autres personnes du GICC qui ont partagé avec nous quelques réunions des lundi matins : Emmanuel et Fabrice.

Rien que de petits conseils, mais quels conseils! Je parle de toutes les autres équipes du GICC, surtout les personnes qui travaillent dans le bâtiment L de la Faculté de Sciences : Agnès V. (t'es une personne excellente), Ahmed (merci pour tes mots toujours gentils), Aude (merci pour les moments de détente et rigolade), Corinne, Evelyne (si t'as besoin de recettes portugaises, n'hésite pas!), Fabien (j'ai bien aimé nos discussions sur les brevets et le foot! Je continuerai à dire: Viva Benfica! Viva Portugal!), Florence, Guillaume, Jeanne (t'est unique! J'ai beaucoup appréciée de te connaître), Jérôme, Murielle, Solenne, Sylvaine, Vandana, Véro (the last, but not the least! J'ai beaucoup appréciée que tu aies bien gardée la tasse!). Merci aussi aux anciens du labo (Agnès Petit, Gwen, Jérémy, Jérôme, Nicolas, Xavier). Ça a été un plaisir de travailler autour de vous tous !

Chagasse Team, je ne vous oublierai jamais ! Je pense aussi à tous mes anciens collègues et amis de D.E.A., avec qui j'ai passé de très bons moments.

Il ne faut pas oublier le soutien inconditionnel de l'Association Culturelle France-Portugal. Je pense surtout à Françoise et Robert Collet, Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi ! J'espère vous revoir au Portugal. Un grand merci aussi à notre petit groupe de conversation de Portugais des samedi matins : Elvira, Françoise C., Françoise L., Jacqueline, José L., José T. et Michel. J'ai beaucoup appréciée de vous avoir connu. On a passé des très bons moments ensemble!

Evidemment je remercie également à des amis que j'ai fais pendant ces trois ans. Je pense à Sofia, Maria, Ana, Marie-Nöel, Carla et Lamia. Sans oublier mes amis mathématiciens et physiciens : Masoomah (merci pour tout), Ola, Chady, Romain, Mauricio, Elisa, Héro.

Mes remerciements vont aussi à ma famille et mes amis portugais qui, avec cette question récurrente, « quand est-ce que tu finis ta thèse », bien qu'angoissante en période fréquente de doutes, m'ont permis de ne jamais me dévier de mon objectif final.

Et je tiens à remercier en particulier ma famille qui est en France, pour leur soutien inconditionnel, mais aussi celle qui est au Portugal, Suisse, Etats-Unis et Angleterre.

Naturellement, je souhaite remercier tous mes amis au Portugal pour leurs nombreux encouragements et leur amitié. A mes anciens collègues de Hikma, je transmets une petite pensée. Merci à vous tous : Ana Cristina P. (bientôt, je vais pouvoir jouer un peu plus avec mon filleul), Ana Cristina T., Anabela, Carla, Claudia, Fernando, Filipa, Filipe (il faut qu'on parle), Gui, Joana, Luis M., Monica, Rui L., Rui Lx., Vanda. Je suis presque de retour, nous allons faire une grande fête !

Tant de choses à vous dire et si peu de place pour en parler. Je vous aime tout simplement, Papa et Maman. Vous avez été présents en cœur pour écarter les doutes, soigner les blessures et partager les joies. Je vous dédie cette thèse.

Sans toutes ces personnes autour de moi, la vie n'aurait sûrement pas été telle qu'elle est : un concentré de bonheur à l'état pur.

Au vu de ces remerciements, je m'aperçois que la réalisation de cette thèse fut une occasion merveilleuse de rencontrer et échanger des bons moments avec de nombreuses personnes.

Ces trois années m'ont aussi appris la richesse des rapports humains et tant mieux !

Résumé

La Néoplasie Endocrinienne Multiple de Type 1 (NEM1) est un syndrome de prédisposition aux tumeurs endocrines, caractérisé surtout par des tumeurs des parathyroïdes, du pancréas et de l'hypophyse. Le gène *MEN1*, muté dans les patients NEM1, a été identifié en 1997. Il code pour une protéine de 610 acides aminés, Menin, majoritairement nucléaire. Sa fonction et ses activités biochimiques sont encore un sujet d'étude. Nous avons produit de la Menin comme protéine de fusion dans un système eucaryote (en cellules S2 de drosophile) et dans un système procaryote (*E.coli*), mais la dégradation, des problèmes dans le processus de purification et l'enlèvement des parties de fusion ont empêché la production en grandes quantités.

Il est probable que la Menin soit impliquée dans la réponse au stress génotoxique. Quand les cellules *Men1*^{-/-}, notamment la lignée tumorale LCT10 issue de souris knockout, sont transfectées avec des vecteurs d'expression de *MEN1*, le stress induit par la transfection perturbe les fonctions cellulaires dans lesquelles Menin est impliquée. Nous avons produit une protéine de fusion Menin avec un signal TAT qui permet son introduction dans une cellule sans avoir besoin d'utiliser des agents de transfections qui puissent induire un stress. Des études initiales avec la TAT-Menin ont montré que cette protéine est vraisemblablement monoubiquitinée, une modification impliquée surtout dans la régulation transcriptionnelle et dans le trafic entre noyau et cytoplasme.

Les fonctions attribuées à la Menin dans la régulation de la transcription, prolifération cellulaire, apoptose et stabilité génomique sont souvent basées dans des études d'interactions protéiques. A la longue liste de partenaires de la Menin, nous ajoutons la protéine p53, le "gardien du génome", qui co-immunoprécipite avec la Menin. Cette interaction entre Menin et p53 est probablement induite par un stress génotoxique. Par contre, l'acétylation des trois lysines carboxy-terminales, caractéristique de l'activation de p53, n'est pas nécessaire, puisque que ces lysines ont pu être remplacées par des arginines sans aucune influence sur l'interaction.

De façon inattendue, nous avons observé que la concentration de la protéine RB est influencée par la Menin. En particulier, il semble que la forme hyperphosphorylée ppRB soit fortement supprimée en absence de Menin. Cette observation est consistante avec une autre activité connue de Menin dans la régulation du cycle cellulaire.

Mots-clés : NEM1; *MEN1*; Menin; p53; RB.

Résumé en anglais

Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1) is a hereditary syndrome, which predisposes to endocrine tumors, characterized mainly by parathyroid, pancreatic and pituitary tumors. The *MEN1* gene, mutated in MEN1 patients, was cloned in 1997 and encodes a 610 aminoacid protein, Menin of mainly nuclear localization. Its function and biochemical activities are still a matter of investigation. We have produced Menin as a fusion protein in a eucaryote system (in drosophila S2 cells) and procaryote system (*E.coli*), but degradation and problems in the purification process and the removal of the fusion parts impeded a production of Menin in large quantities.

It is probable that Menin is implied in the response to genotoxique stress. When transfecting *Men1^{-/-}* cells, such as the LCT10 tumor line from knockout mice, with *MEN1*-expression vectors, the study may suffer from experimental artefacts due to the cellular stress induced by the transfection. We have produced a Menin fusion protein with a TAT signal that allows its delivery into a cell without stress-inducing transfection agents. Initial studies with TAT-Menin have indicated that it can be monoubiquitinated, a modification implicated mainly in transcriptional regulation and trafficking between nucleus and cytoplasm.

The functions that have been allotted to Menin in transcription regulation, cellular proliferation, apoptosis and genome stability are often based on protein interaction studies. To the long list of these partners we add p53, the "guardian of the genome", which co-immunoprecipitates with Menin, possibly induced by cellular stress. However, the acetylation of three carboxy-terminal lysines characteristic for activated p53 is not required, since these lysines could be replaced by arginines without any influence on the interaction.

As an unexpected result, we have observed that the concentration of the Retinoblastoma protein RB is influenced by Menin. In particular it appears that hyperphosphorylated ppRB form is strongly suppressed in absence of Menin. This observation is consistent with other known activities of Menin in cell cycle regulation.

Keywords : MEN1, *MEN1*, Menin, p53, RB.

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	5
Résumé en anglais	6
Table des matières	7
Liste des tableaux	10
Liste des figures	11
Liste des abbréviations	15
Objectifs généraux de cette thèse	17
Introduction bibliographique	20
1 La néoplasie endocrinienne multiple de type 1	21
2 Le gène <i>MEN1</i>	23
2.1 Identification du gène <i>MEN1</i>	23
2.2 Génétique moléculaire du gène <i>MEN1</i>	23
2.3 Recherche de mutations	25
3 La protéine Menin	27
3.1 Conservation entre les espèces	27
3.2 Structure	28
3.3 Expression tissulaire et cellulaire de <i>MEN1</i> et Menin	29
3.4 Localisation cellulaire de la Menin	29
4 Les partenaires de la Menin	31
5 Menin et la croissance cellulaire	34
5.1 Observations générales	34
5.2 Rôle de Menin au cours du cycle cellulaire	35
5.2.1 Le cycle cellulaire	35
5.2.2 Régulation de l'expression de Menin et sa localisation au cours du cycle cellulaire	37
6 Menin, p53 et RB	39
6.1 Menin et p53	39
6.2 Menin et RB	41
6.3 p53 et RB	43
7 Rôle physiologique de la Menin	44

7.1	Modèles animaux et fonctionnalités du gène <i>MEN1</i>	44
7.1.1	Modèles souris knock-out	44
7.1.2	Modèles souris knock-out tissu spécifique.....	45
7.1.3	Autres modèles animaux	45
7.2	Autres fonctions attribuées à la Menin.....	46
7.3	Menin et l'instabilité génomique.....	47
7.3.1	Le syndrome NEM1 est-il un syndrome d'instabilité génomique ?.....	47
7.3.2	Menin et la réparation de l'ADN.....	48
7.3.3	Menin et les telomères.....	49
	Matériel et Méthodes.....	51
1	Production et purification de la Menin.....	52
1.1	Système eucaryote (cellules S2 de drosophile).....	52
1.1.1	Matériels.....	52
1.1.2	Méthodes	53
1.2	Système procaryote (<i>E.coli</i>)	57
1.2.1	Matériels.....	57
1.2.2	Méthodes	57
1.3	Production de TAT-Menin en <i>E.coli</i>	62
1.3.1	Matériels.....	62
1.3.2	Méthodes	63
2	Isoformes et Modifications post-traductionnelles de la Menin.....	68
2.1	Isoformes.....	68
2.1.1	Matériels.....	68
2.1.2	Méthodes	69
2.2	Modifications post-traductionnelles de la Menin.....	71
2.2.1	Matériels.....	71
2.2.2	Méthodes	71
3	Interaction Menin-p53	72
3.1	Matériels.....	72
3.2	Méthodes	72
4	Rôle de Menin sur RB.....	73
4.1	Matériels.....	73
4.1.1	Lignées cellulaires.....	73
4.1.2	Anticorps utilisés pour les analyses par Western Blot.	74

4.1.3	siRNA utilisés pour la transfection des cellules U2OS.....	74
4.1.4	Oligonucléotides utilisés pour la qRT-PCR.....	75
4.2	Méthodes.....	75
	Résultats et Discussion.....	78
1	Production et purification de la Menin.....	80
1.1	Système eucaryote en cellules S2 de drosophile.....	80
1.1.1	Purification par colonne d'affinité nickel-agarose.....	82
1.1.2	Purification par affinité avec la protéine G agarose.....	83
1.2	Système procaryote dans <i>E.coli</i>	86
1.3	TAT-Menin (<i>E.coli</i>).....	87
1.3.1	Détermination de la quantité de TAT-Menin à transduire dans les cellules LCT1088.....	
1.3.2	Mutants de TAT-Menin.....	89
2	Données structurales de la Menin.....	91
2.1	Demi-vie et localisation de la Menin.....	91
2.2	Isoformes de la Menin.....	94
2.3	La monoubiquitination, possible Modification Post-Traductionnelle de la Menin.....	96
2.3.1	Ubiquitination.....	96
3	Interaction Menin-p53.....	100
4	Rôle de Menin sur RB.....	105
4.1	Publication.....	105
4.2	Bilan des résultats.....	116
	Conclusion et Perspectives.....	119
	Références Bibliographiques.....	124

Liste des tableaux

Tableau 1. Manifestations cliniques et leurs fréquences dans les NEM1.	22
Tableau 2. Les partenaires de la Menin.....	33
Tableau 3. Oligonucléotides utilisés pour l'amplification de pcDNA3.1-Menin.	59
Tableau 4. Lignées cellulaires utilisées pour l'étude sur les isoformes de Menin.	68
Tableau 5. Lignées cellulaires utilisées pour l'étude sur l'interaction entre Menin et p53.....	72
Tableau 6. Lignées cellulaires utilisées pour l'étude du rôle de Menin sur la protéine RB.....	73
Tableau 7. Les différents anticorps utilisés pour les analyses par Western Blot.	74
Tableau 8. Les différents siRNA utilisés pour transfecter les cellules U2OS.....	74
Tableau 9. Oligonucléotides utilisés pour l'analyse qRT-PCR.....	75

Liste des figures

Figure 1. Epissages alternatifs dans la région 5' non-codante de <i>MEN1</i>	24
Figure 2. Arbre phylogénique de la Menin.	27
Figure 3. Représentation schématique de la structure de la Menin, contenant la position des différents motifs protéiques identifiés à ce jour.	28
Figure 4. Représentation hypothétique sur la fonction de la Menin..	34
Figure 5. Les différentes phases du cycle cellulaire.....	35
Figure 6. Les fonctions des CDKi.....	36
Figure 7. Les fonctions de p53.....	39
Figure 8. Contrôle des niveaux de p21 en fonction de p53.....	40
Figure 9. Régulation du cycle cellulaire par phosphorylation de la protéine RB..	42
Figure 10. Stratégie de clonage pour préparer le vecteur d'expression pMT-BIPSS-Menin-Fc-His6.	52
Figure 11. Vecteur de sélection pCoBlast.....	53
Figure 12. Vecteurs d'expression pET-His6-Menin (His6 en N-terminal) et pET-Menin-His6 (His6 en C-terminal).....	57
Figure 13. Stratégie de clonage pour préparer le vecteur d'expression pET-His6-Menin, contenant le tag His6 en N-terminal.....	58
Figure 14. Stratégie de clonage pour préparer le vecteur d'expression pET-Menin-His6, contenant le tag His6 en C-terminal.....	60
Figure 15. Schéma représentatif de la production et purification de la Menin en <i>E.coli</i>	61
Figure 16. Vecteur d'expression pTAT-HA-His6-Menin.....	63
Figure 17. Plasmide pCIneo-Menin.	64
Figure 18. Schéma représentatif des deux techniques différentes d'immunofluorescence.....	66
Figure 19. Schéma représentatif de l'extraction cytoplasmique et nucléaire.....	69
Figure 20. Schéma représentatif de l'immunoprécipitation.	72
Figure 21. Expression de Menin dans les cellules S2. Ici, la condition la plus favorable a été obtenue après 5h de transfection et une induction pendant 48h, en utilisant 1mM de CuSO ₄	81
Figure 22. Expression de Menin sécrétée dans le milieu. Ici, la condition la plus favorable a été obtenue après 5h de transfection et une induction pendant 48h, en utilisant 1mM de CuSO ₄ et du milieu Schneider sans SVF.	82

Figure 23. Expression de Menin purifiée par une colonne nickel-agarose. Analyse Western Blot des fractions contenant le lysat total (LT), la fraction totale qui n'est pas liée à la résine (FT), le contrôle après lavages (W) et les fractions éluées (F1, F2 et F3).....	82
Figure 24. Expression de Menin purifiée par la protéine G agarose. Analyse Western Blot des fractions contenant le lysat total (LT), la fraction totale qui n'est pas liée à la résine (FT), le contrôle après lavages (W) et les fractions éluées (F1, F2 et F3).	83
Figure 25. Expression de Menin purifiée après coupure par la protéase spécifique. Analyse Western Blot des fractions contenant la Menin purifiée (M), la fraction totale qui n'est pas liée à la résine (FT), le contrôle après lavages (W), control après clivage de la protéine de fusion avec la protéase spécifique (P), contrôle après incubation avec une résine GST (GST), fractions éluées (F1 et F2).....	84
Figure 26. Expression de Menin purifiée par les billes magnétiques. Analyse Western Blot des fractions contenant la Menin sécrétée dans le milieu S2 (S2), la fraction total qui n'est pas liée aux billes (FT), le contrôle après lavages (W), et les fractions éluées (F1, F2 et F3).	84
Figure 27. Expression de Menin purifiée après coupure par la protéase spécifique. Analyse Western Blot des fractions contenant la Menin purifiée par les billes magnétiques (M), le contrôle après coupure avec la protéase spécifique (P), les fractions éluées après incubation avec la résine GST (F1 et F2), et le culot cellulaire (C).....	85
Figure 28. Expression de Menin chez <i>E.coli</i> . Analyse SDS-Page et Western Blot à partir de 4 ml de culture bactérienne. L'élution a été faite à différentes concentrations d'imidazole. Cette figure montre les résultats obtenus pour le vecteur d'expression contenant His6 en N-terminal.	86
Figure 29. Expression de la protéine Menin chez <i>E.coli</i> . Analyse SDS-page des fractions insolubles resolubilisées dans l'urée 8M (LT), contrôle après liaison à la colonne de nickel (FT), gamme de MBP-2 pour quantifier la TAT-Menin produite (0,2 ; 0,6 et 1,2 µg), et les fractions éluées (F1 et F2).	87
Figure 30. Expression de Menin dans les cellules LCT10 (<i>MenI</i> ^{-/-}) contenant différentes quantités de TAT-Menin, extraites à 24h après transduction. La lignée cellulaire LM8 (<i>MenI</i> ^{+/+}) donne le niveau d'expression de la Menin endogène.	88
Figure 31. Expression de la protéine TAT-Menin mut 418 chez <i>E.coli</i> . Analyse SDS-page des fractions insolubles resolubilisées dans l'urée 8M (LT), control après liaison à la colonne de nickel (FT), Fraction éluée (F1), gamme de MBP-2 pour quantifier la TAT-Menin mut 418 produite (0.2 ; 0,6 et 1,2 µg).....	89

Figure 32. Expression de la protéine TAT-Menin mut 1384 chez <i>E.coli</i> . Analyse SDS-page des fractions insolubles resolubilisées dans l'urée 8M (LT), control après liaison à la colonne de nickel (FT), Fraction éluée (F1), gamme de MBP-2 pour quantifier la TAT-Menin mut 1384 produite (0,2 ; 0,6 et 1,2 µg).	90
Figure 33. Expression de la protéine TAT-HA chez <i>E.coli</i> . Analyse SDS-page des fractions insolubles resolubilisées dans l'urée 8M (LT), control après liaison à la colonne de nickel (FT), Fraction éluée (F1), gamme de MBP-2 pour quantifier la protéine TAT-HA produite (0,2 ; 0,6 et 1,2 µg).	90
Figure 34. Etude de la stabilité de la TAT-Menin dans les LCT10 (<i>MenI</i> ^{-/-}). A. Western Blot sur des extraits totaux repris avec du SDS1X, après 0h, 12h, 24h, 38h, 48h et 62h de transduction. La lignée cellulaire LM8 (<i>MenI</i> ^{+/+}) donne le niveau d'expression de la Menin endogène. B. Calcul du temps de demi-vie de la TAT-Menin par quantification des Western Blot, contre une coloration au rouge ponceau.	91
Figure 35. Cinétique de migration de la TAT-Menin vers le noyau par immunofluorescence	92
Figure 36. Analyse Western Blot d'extraits totaux de protéines sur les cellules LCT10, contenant ou pas la TAT-Menin purifiée.	93
Figure 37. Analyse Western Blot d'une expérience de RNAi contre Menin (24h) dans les cellules H1299 (p53 ^{-/-}).	93
Figure 38. Analyse de différentes lignées cellulaires par Western Blot. La Menin a une taille de 68 KDa.	94
Figure 39. Analyse de la lignée cellulaire Bon-1 par Western Blot, en conditions d'arrêt de croissance des cellules induction d'un stress génotoxique par l'addition de doxorubicine.	94
Figure 40. Analyse Western Blot sur des extraits nucléaires et cytoplasmiques de la lignée cellulaire HL60.	95
Figure 41. Expression de Menin dans les cellules LCT10 contenant la TAT-Menin sauvage et les TAT-Menin mutantes, 418 et 1384. Analyses SDS-PAGE des fractions contenant la TAT-Menin sauvage (WT), la TAT-Menin mutante dans le codon n°418, qui entraîne un codon STOP (418) ; et la TAT-Menin mutante dans le nucléotide n°1384, qui entraîne une perte d'un acide aminé glutamate (1384).	97
Figure 42. Expression d'Ubiquitine dans les cellules LCT10 contenant la TAT-Menin sauvage et les TAT-Menin mutantes, 418 et 1384. Analyses SDS-PAGE des fractions contenant la TAT-Menin sauvage (WT), la TAT-Menin mutante dans le codon n°418, qui entraîne	

un codon STOP (418) ; et la TAT-Menin mutante dans le nucléotide n°1384, qui entraîne une perte d'un acide aminé glutamate (1384).	98
Figure 43. Etude de l'interaction entre Menin et p53 dans les lignées cellulaires U2OS et SAOS, en présence et absence de traitement à la doxorubicine.....	101
Figure 44. Interaction entre la Menin et p53 dans les lignées cellulaires U2OS et SAOS, après transfection avec le triple mutant, le plasmide pcDNA3.1 ou la p53 wild-type.	102
Figure 45. Interaction entre la Menin et p53 <i>in vivo</i> , dans la lignée cellulaire U2OS non traitée, traitée à l'ALLN, aux UV ou traitée à la Doxorubicine.....	103
Figure 46. Analyse par Western Blot de la protéine RB (formes hyperphosphorylée et hypophosphorylée) et de la Menin, sur la lignée cellulaire M2-6 synchronisée en phase G0, traitée ou pas à la doxycycline, et après "simulation" du redémarrage du cycle cellulaire par ajout de SVF à différents temps.	117

Liste des abbréviations

Ac:	Anticorps
ADN:	Acide Désoxyribonucléique
ADNc:	ADN complémentaire
AF:	Anémie de Fanconi
ALLN:	Inhibiteur des calpaïnes (N-acétyl-Leu-Leu-Nle-CHO)
APS:	Ammonium PerSulfate (persulfate d'ammonium)
ARN:	Acide ribonucléique
ARNm:	ARN messenger
AT:	Ataxie Téléangiectasie
CDK:	Cyclin-Dependant Kinase (kinase dépendante de cycline)
Cds:	CoDing Sequence (séquence codante)
CDKi:	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor (inhibiteur de kinase dépendante de cycline)
CDKN1A:	p21 ^{Cip1}
CDKN1B:	p27 ^{Kip1}
CDKN1C:	p57 ^{Kip2}
CDKN2A:	p16 ^{INK4A}
CDKN2B:	p15 ^{INK4B}
CDKN2C:	p18 ^{INK4C}
CDKN2D:	p19 ^{INK4D}
DMEM:	Milieu dulbecco's Modified Eagle's
DMSO:	Diméthyl Sulfoxide
dNTP:	Désoxyribonuléotide triphosphate
DO:	Densité optique
DTT:	1,4-Dithiothreitol
EAU UP:	Eau ultrapure
ECL:	Enhance Chemical Luminescence
EGFP:	Enhanced Green Fluorescent Protein
H3K4:	Histone H3 lysine 4
HDAC:	Histone DéACétylase (déacétylase d'histone)
HMT	Méthyltransférase d'histone (histone méthylTransférase)
IF:	Immunofluorescence
IPTG:	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
kb:	Kilobase(s)
kDa:	KiloDalton(s)
LB:	Milieu de culture "luria Bertani broth"
LOH:	Loss Of Heterozygoty (perte d'hétérozygotie)
<i>MEN1</i> :	Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (gène de prédisposition aux NEM1)
MLL:	Mixed Lineage Leukemia
NEM1:	Néoplasie Endocrinienne Multiple de type 1
NES:	Nuclear Export Signal (signal d'export nucléaire)
NLS:	Nuclear Localization Signal (signal de localisation nucléaire)
OMIM:	Online Mendelian Inheritance in Man (la base de données des gènes humains et des anomalies génétiques)
ORF:	Open Reading Frame (cadre ouvert de lecture)
p53:	Phosphoprotéine avec un poids moléculaire de 53 KDa
pb:	Paire(s) de base(s)

PBS:	Phosphate Buffered Saline
PCR:	Polymerase Chain Reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PM:	Poids Moléculaire
PMSF:	PhenylMethylSulfonylFluorid
pRB:	Forme hypophosphorylée de la protéine RB
ppRB:	Forme hyperphosphorylée de la protéine RB
RB:	Protéine Rétinoblastome
RNAi:	RNA interference (Interference par l'ARN)
RT-PCR:	Reverse Transcriptase PCR
SDS:	Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE:	Sodium Dodécyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SVF:	Sérum de Veau Fœtal
TBE:	Tris-Borate Electrophoresis buffer (Tampon d'électrophorèse tris-borate)
TEMED:	Tétraméthyl –éthylène diamine
UTR:	Untranslated Regions (Régions non traduites des ARN messagers)
UV:	Irradiations par rayonnements UltraViolets
VHL:	Von Hippel Lindau
WT:	Wild Type (Sauvage)

Objectifs généraux de cette thèse

Les syndromes cancéreux familiaux causent une augmentation du risque pour des types spécifiques de cancer. Ils ne représentent que 5-10% de tous les cancers, mais dans certains cas, ils peuvent permettre de comprendre les mécanismes généraux de la carcinogenèse.

Les néoplasies endocriniennes multiples (NEM) sont des syndromes héréditaires rares et complexes, résultant de l'activation ou inactivation de différents gènes impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire. Les premiers cas isolés de NEM ont été décrits au tour de 1900 et la première famille porteuse de ce syndrome a été décrite en 1954 (WERMER, 1954). Cet auteur a décrit la généalogie de 5 patients affectés de plusieurs tumeurs endocrines, montrant pour la première fois, l'existence d'une prédisposition familiale pour NEM. Les principales NEM sont celles de type 1 (NEM1) et 2 (NEM2), le syndrome de von Hippel-Lindau, la neurofibromatose type 1 et le complexe de Carney, classées selon les glandes affectées.

La première partie de ce travail consiste en une étude bibliographique, en incluant des données sur la maladie NEM1, le gène *MEN1* et la protéine Menin. Elle sera suivie par une description des partenaires de la Menin connus à ce jour, notamment ceux impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire, puis des relations existantes entre Menin et les deux oncosuppresseurs majeurs dans le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose, p53 et RB. Enfin, j'évoquerai les connaissances acquises à ce jour sur le rôle physiologique de la Menin.

La deuxième partie concerne le matériel et les méthodes utilisés pour mon travail expérimental.

La troisième partie de ce travail présentera les résultats obtenus au cours de ma thèse et une discussion autour de ceux-ci. Depuis la découverte de cette protéine, peu de connaissances ont pu être acquises sur le rôle et les fonctions biochimiques de la Menin. Afin de trouver des pistes pour cette recherche, beaucoup d'études ont été menées pour identifier des partenaires potentiels, qui permettraient de placer la Menin, dans des voies métaboliques et/ou de régulation. Maintenant, nous savons que ce n'est pas si simple que ça, vu le grand nombre de protéines qui interagissent avec la Menin. Néanmoins, ces interactions ainsi que la localisation majoritairement nucléaire de la Menin la placent au sein de la régulation de la transcription, la réplication et/ou la réparation de l'ADN et le contrôle de la progression du cycle cellulaire. Le contrôle de la progression du cycle cellulaire étant une étape clé dans le

processus de tumorigenèse, je me suis intéressée à développer un peu les connaissances sur cette fonction de la Menin. Les données de la littérature montrent que la Menin régule l'expression de p18 et p27, deux CDKI impliqués dans la régulation du cycle cellulaire par la protéine RB qui, elle-même, est connue pour jouer un rôle central dans la régulation du cycle cellulaire. Une étude fonctionnelle sur des souris knock-out a montré que la Menin et RB pourraient agir sur la même voie. Nos études moléculaires semblent confirmer ces résultats. Une autre protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et notamment dans l'inhibition de la prolifération cellulaire, est la protéine p53. Cette protéine est capable d'induire la protéine p21, qui bloque le cycle cellulaire en phase G1. Une étude récente a montré que la Menin interagit avec p53 dans des cellules d'insulinome de rat. J'ai donc pensé qu'il était intéressant d'étudier quel rôle aurait la Menin dans ce partenariat avec p53. Nous avons pu confirmer que la Menin interagit avec p53, dans plusieurs lignées cellulaires, et qu'une modification des trois lysines C-terminal de p53 n'a aucune influence sur cette interaction.

La structure tridimensionnelle de la Menin n'a pas été résolue. La connaissance de cette structure serait certainement d'une grande aide dans la compréhension de partenariats multiples de la Menin ainsi que de sa fonction dans la cellule. J'ai donc essayé de mettre au point des conditions expérimentales pour produire de grandes quantités de Menin purifiée qui pourrait donner une matière première aux structuralistes. Nous avons pu produire et purifier une Menin recombinante. De plus, nous disposons d'un système TAT, qui permet une production d'une Menin capable de pénétrer la membrane plasmique d'une cellule sans qu'il soit besoin de transfecter les cellules avec un vecteur d'expression. Ce système peut être très utile, non seulement pour éviter l'induction d'un stress génotoxique sur les cellules lors de la transfection, mais aussi pour étudier quelques propriétés de la Menin, notamment la stabilité et les modifications post-traductionnelles. J'ai ainsi pu montrer que la Menin pourrait être mono-ubiquitinylée, une modification post-traductionnelle connue chez d'autres protéines pour être impliquée dans la régulation transcriptionnelle.

Dans une quatrième partie, je présenterai les conclusions de mon travail de thèse, et aussi des perspectives qui en découlent dans le cadre de la recherche d'une meilleure compréhension des tumeurs endocrines en générale et de la NEM1 en particulier. Le but final est de définir les dysfonctionnements liés à l'inactivation de la Menin chez les patients NEM1 et ainsi, étudier éventuellement, des cibles thérapeutiques efficaces.

Introduction bibliographique

1 La néoplasie endocrinienne multiple de type 1

La néoplasie endocrinienne multiple de type 1 (NEM1) ou Syndrome de Wermer (OMIM 131 100) est un syndrome de prédisposition à des tumeurs variées des glandes endocrines (parathyroïde, pancréas, hypophyse). Cependant, des lésions atypiques non endocrines ont été décrites sous la forme d'angiofibromes, lipomes, mélanomes ou colagénomes (Calender *et al.*, 1998).

La NEM1 est un syndrome à transmission autosomique dominante, causé par l'inactivation du gène suppresseur de tumeurs *MEN1* (U93236, Genbank).

Le diagnostic de NEM1 peut être clinique, par la reconnaissance de tumeurs dans au moins deux des trois glandes endocrines cibles principales (parathyroïde, hypophyse, pancréas endocrine/duodénum), ou génétique, par identification de la mutation germinale dans le gène responsable du syndrome NEM1 (Brandi *et al.*, 2001; Hoff *et al.*, 2000).

Parmi les individus présentant une mutation du gène *MEN1*, 90% exprimeront biologiquement ou cliniquement la maladie à l'âge de 50 ans, ce qui montre la forte pénétrance de NEM1. La fréquence ou prévalence de la NEM1 n'est pas bien connue mais elle est estimée entre 1/50000 et 1/20000 (Bauters *et al.*, 2003). Les Manifestations cliniques et leurs fréquences dans le cadre de la pathologie NEM1 sont présentées dans le Tableau 1.

Manifestations cliniques de NEM1		Fréquence
Type de tumeur	Sous-type de tumeur	
Hyperparathyroïdies (Adénomes parathyroïdiens)	---	90%
Tumeurs Gastroentéropancréatiques	Gastrinome	40%
	Insulinome	10%
	NF (non sécrétantes)	10%
	Autres (glucagonoma, VIPoma)	2%
Adénomes antéhypophysaires	Prolactinomes (PRL)	20%
	GH + PRL	5%
	GH	5%
	NF (non sécrétantes)	5%
	ACTH	2%
Tumeurs corticosurréaliennes	---	25%
Tumeurs neuroendocrines	carcinoïdes Thymiques	8%
	Bronchiques	8%
	Gastriques	7%
Tumeurs associées	non-endocrines Lipomes	30%
	Angiofibromes faciaux	85%
	Collagénomes	70%
	Phéochromocytomes	< 1%
	Ependymomes	1%

Tableau 1. Manifestations cliniques et leurs fréquences dans les NEM1. D'après (Brandi *et al.*, 2001). NEM1, néoplasie endocrinienne multiple de type 1 ; VIPoma, tumeur sécrétant le peptide intestinal vasoactif; GH, hormone de croissance ; ACTH, hormone adrénocorticotrophique.

La variabilité de tumeurs associés à NEM1 (à peu près vingt) et les manifestations cliniques font de NEM1 une maladie complexe et multi systémique (Marx, 2005). Cette complexité de NEM1 nous pose des questions importantes sur le rôle physiologique de la Menin (la protéine codée par le gène *MEN1*, qui est impliqué dans ce syndrome), un point que nous allons développer dans le chapitre 7.

2 Le gène *MEN1*

2.1 Identification du gène *MEN1*

L'analyse systématique de tumeurs dérivées de patients atteints de NEM1 a permis l'identification du gène responsable de la maladie. En 1988, Larsson et ses collaborateurs ont localisé ce gène, par cartographie, sur le bras long du chromosome 11 (11q13) (Larsson *et al.*, 1988). Les auteurs ont aussi démontré la perte d'hétérozygotie (LOH) de ce locus, suggérant que *MEN1* était un gène suppresseur de tumeurs, ce qui est cohérent avec le modèle de développement tumorale élaborée par Knudson, en 1971 (Knudson, 1971).

Ainsi, l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeurs suit le modèle des deux événements (two hits), par la présence d'une mutation germinale et d'un deuxième événement, caractérisé par une mutation somatique ou perte de l'allèle normale. Par contre, le modèle de Knudson montre que les deux événements mutationnels sont indépendants, ce qui n'est pas totalement vrai dans le cas de NEM1, car il y a des études qui montrent que des cellules de patients ayant une prédisposition à ce syndrome présentent une instabilité chromosomique, ce qui pourrait faciliter l'apparition d'un deuxième événement mutationnel (Tomassetti *et al.*, 1995; Hessman *et al.*, 2001).

Ces résultats ont motivé différents groupes de recherche en l'Europe et aux Etats-Unis pour établir une carte précise de la région 11q13 (Courseaux *et al.*, 1996) et analyser tous les gènes présents au niveau de ce locus, ce qui a mené en 1997, à l'identification, par clonage positionnel, du gène responsable des NEM1, dénommé *MEN1* (Chandrasekharappa *et al.*, 1997; Lemmens *et al.*, 1997).

2.2 Génétique moléculaire du gène *MEN1*

Le gène *MEN1* a une taille génomique de 9 kb et code un messager majeur de 2,8 kb. Il est constitué de dix exons dont le premier exon et les 832 derniers nucléotides qui font partie de l'exon 10 sont non codants. Un transcrit d'environ 4 kb a été également trouvé dans le pancréas et le thymus, deux des organes cibles du syndrome NEM1 (Lemmens *et al.*, 1997).

Six isoformes issues d'épissages différents ont été mises en évidence par l'équipe de Günther Weber et celle de Patrick Gaudray (Khodaei-O'Brien *et al.*, 2000), dont l'exon 1 est alternatif (exon 1a à 1f). Cependant, la région 5' n'est pas encore totalement déterminée. De plus, des éléments répétitifs du type SINE/Alu sont présents chez l'homme et SINE/B2 chez la souris. Dans les tissus humains analysés, il semble que l'exon majoritaire soit l'exon 1b. Deux transcrits de 2.8 et 3.2 kb ont été trouvés dans la plupart des tissus murins, mais en quantités différentes (Stewart *et al.*, 1998). Le transcrit le plus grand est similaire à la version humaine portant l'exon e1d. Les transcrits correspondant aux versions humaines des exons e1e et e1f n'ont pas été détectés chez les souris. La Figure 1 montre les épissages alternatifs connus dans la région 5' non-codante du gène *MEN1* chez l'homme.

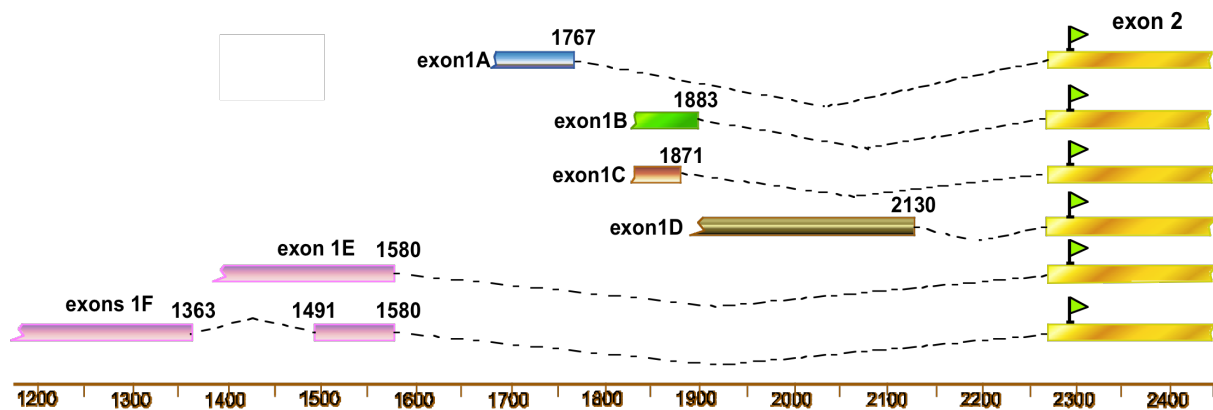


Figure 1. Épissages alternatifs dans la région 5' non-codante de *MEN1*.

Les résultats obtenus par les deux mêmes équipes (Zablewska *et al.*, 2003; Fromaget *et al.*, 2003) montrent la présence d'un promoteur fort qui agit malgré l'absence de boîte TATA. Cette région se trouve dans les quelques centaines de pb situées en 5' de l'exon 1B, indiquent qu'il existe vraisemblablement d'autres promoteurs de ce gène. De nombreux sites Inr (initiator) ont été trouvés. Ces sites sont utilisés pour initier la transcription. De plus, des régions cis-régulatrices, activatrices et inhibitrices ont été aussi trouvées, dont certaines possèdent des sites de liaison à des facteurs de transcription tels que NFkB. L'identification de ces multiples sites d'initiation de la transcription et de ces exons 1 montre la complexité de la régulation de la transcription du gène *MEN1*, qui a peut être un sens physiologique. Par ailleurs, il n'y a pas de grandes différences d'expression d'ARN entre les différents tissus. Mais, les différents transcrits déjà identifiés ne peuvent pas être distingués par Northern Blot.

Il serait donc intéressant d'étudier l'efficacité de traduction des différents ARNm identifiés dans de différentes cellules et en différentes conditions de croissance.

2.3 Recherche de mutations

L'identification du gène *MEN1* a permis :

- a) la détection des mutations chez les patients NEM1 ;
- b) la confirmation du diagnostic clinique des patients ;
- c) l'identification de la prédisposition génétique à la maladie, chez des patients asymptomatiques.

Après identification du gène, les chercheurs ont continué à rechercher des mutations dans des familles NEM1 et dans des tumeurs sporadiques. Plus de 600 mutations germinales ont été identifiées dans les familles présentant un syndrome NEM1 (Lemos and Thakker, 2008; Wautot *et al.*, 2002). Toutes les mutations identifiées comme des délétions, insertions, décalage du cadre de lecture ("frameshift") ou non-sens, conduisent à la synthèse d'une protéine tronquée. Les mutations faux-sens sont supposées rendre la protéine non fonctionnelle.

Les mutations sont réparties sur l'ensemble de la région codante du gène et des séquences situées au voisinage des sites d'épissage, sans point chaud particulier malgré l'existence de mutations récurrentes dans les exons 2, 4 et 10 dans des familles indépendantes (Wautot *et al.*, 2002). En effet, il semble qu'il y ait des mutations récurrentes dans des régions du gène qui ont des répétitions de nucléotides, comme par exemple, les régions riches en GCs. La littérature actuelle ne montre pas de corrélation génotype-phénotype significative, quel que soit le type ou la localisation des mutations. De plus, l'étude des mutations n'a pas permis d'identifier des régions de la Menin qui seraient particulièrement importantes pour son fonctionnement.

Chez environ 10% des patients, aucune mutation n'a pu être identifiée dans la région codante du gène *MEN1*, suggérant des mutations au niveau du promoteur, des régions non-traduites ou même dans d'autres gènes (Chandrasekharappa and Teh, 2003). Les gènes suppresseurs de tumeurs sont souvent affectés par l'inhibition de l'activité de leur promoteur dans de nombreux cas de cancers (Cropley *et al.*, 2008).

La néoplasie endocrinienne multiple de type 1 est considérée comme un syndrome monogénique (un seul gène de prédisposition), mais peut être n'est-ce pas si simple. D'autant plus que l'équipe de Molatore et de Pellegata ont observé un syndrome NEM chez le rat et chez l'homme, qui semble résulter d'une mutation germinale dans le gène p27 (CDKN1B) (Molatore and Pellegata, 2010; Pellegata *et al.*, 2006), un gène dont l'expression semble régulée par la Menin.

3 La protéine Menin

Le gène *MEN1* code pour, au moins, une protéine de 610 acides aminés, la Menin (67 KDa), qui est localisé majoritairement dans le noyau des cellules (Guru *et al.*, 1998; Kaji *et al.*, 1999; La *et al.*, 2006).

3.1 Conservation entre les espèces

La Menin est hautement conservée chez la souris (96,5% d'identité) et rat (97% d'identité) (Karges *et al.*, 1999) et un peu moins chez le poisson zèbre (75% de similarité), (Khodaei *et al.*, 1999) la drosophile (47,2% d'identité et 56,6% de similarité) (Maruyama *et al.*, 2000) et le lymnée (49% d'identité) (van Kesteren *et al.*, 2001). Aucun gène orthologue du gène *MEN1* n'a été trouvé chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ni le nématode *Caenorhabditis elegans*. La Figure 2 montre l'arbre phylogénique de la Menin.

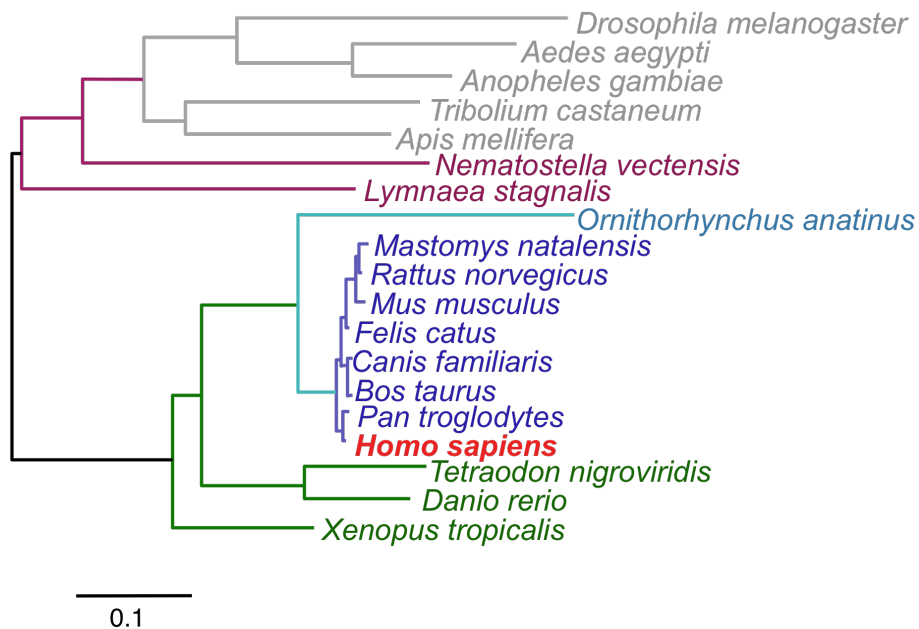


Figure 2. Arbre phylogénique de la Menin.

3.2 Structure

La Menin n'a pas d'homologie avec d'autres protéines connues (Guru *et al.*, 1998). Cependant, plusieurs motifs protéiques ont pu être identifiés (Figure 3).

Structure de la Menin

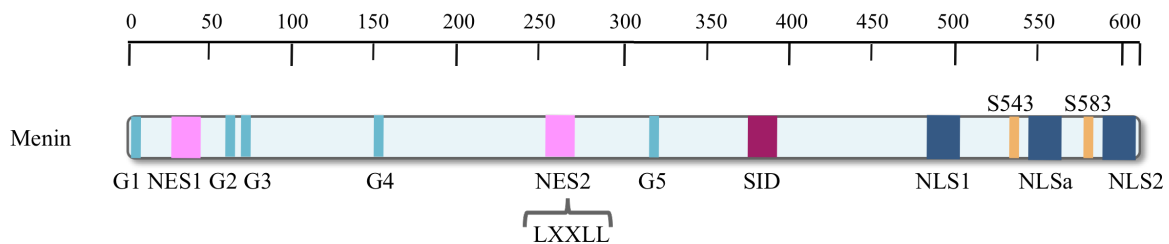


Figure 3. Représentation schématique de la structure de la Menin, contenant la position des différents motifs protéiques identifiés à ce jour.

- un motif comprenant cinq sites, caractéristiques d'une activité guanosine triphosphatase (GTPase), de G1 à G5 (Yaguchi *et al.*, 2002).
- deux signaux d'export nucléaire (NES, Nuclear Export Signal) fonctionnelles, NES1 (acides aminés 33 à 41) et NES2 (acides aminés 258 à 267) qui permettent à la Menin de se déplacer entre le noyau et le cytoplasme (Cao *et al.*, 2009).
- un motif LXXLL (acides aminés 263 à 267) (Dreijerink *et al.*, 2006).
- un domaine SID (mSin3A-Interaction Domain) (Kim *et al.*, 2003).
- trois signaux de localisation nucléaire (NLS, Nuclear Localization Signal) ont été localisés dans le domaine C-terminal de la séquence protéique, par Western Blot et immunofluorescence : NLS1 et NLS2 (acides aminés 479-497 et 588-608, respectivement) (Guru *et al.*, 1998), et NLSa (acides aminés 546-572) (La *et al.*, 2006). Ces trois sites semblent d'égale importance et doivent être tous mutés/délétés pour empêcher la totalité de Menin d'être présente dans le noyau de la cellule. Il est vraisemblable que la Menin est capable de se fixer directement sur l'ADN double brin grâce à ces mêmes séquences. Il a été affirmé que cette fixation se faisait sans spécificité de séquence (La *et al.*, 2004).
- deux sites de phosphorylation (sérines S543 et S583) (MacConaill *et al.*, 2006).

3.3 Expression tissulaire et cellulaire de *MEN1* et Menin

Il y a peu d'études concernant l'expression de la Menin dans les tissus humains. Par contre, il existe beaucoup de données sur l'expression du gène *MEN1* chez les rongeurs, obtenus par Western blot, Northern blot et hybridation *in situ*.

L'étude de l'expression de la Menin endogène sur 12 tissus humains normaux (issus de fœtus humains avortés après 20 semaines de gestation) a mis en évidence, une expression de la forme majoritaire de 68 kDa dans le cerveau, le thymus, les reins, les testicules et la thyroïde. Une forme de 40 kDa a été détectée dans les glandes surrénales, le cœur, les testicules, le thymus et une autre de 100 kDa dans l'hypophyse, les surrénales et les reins. On pourrait penser que la Menin de 100 kDa pourrait correspondre à la traduction du transcrit de 4,2 kb, mais aucune preuve dans ce sens n'a pu être trouvée à ce jour. Une hypothèse alternative serait que cette forme pourrait correspondre à des modifications post-traductionnelles de la protéine (Wautot *et al.*, 2000).

Ikeo et ses collaborateurs ont montré, par hybridation *in situ*, que le transcrit *MEN1* s'exprimait de façon ubiquitaire dans des tissus humains adultes. Mais aucune étude ne s'est penchée sur la répartition cellulaire et tissulaire des différents transcrits de *MEN1* qui ont été identifiés et qui, vraisemblablement ne peuvent pas être distingués par leur taille en Northern blot. Le transcrit *MEN1* est majoritairement détecté au niveau des zones en prolifération, comme l'endomètre utérin, le placenta, la muqueuse de l'œsophage et les cryptes intestinales. Il semble exister une corrélation entre l'expression de Menin et celle de Ki67, un marqueur de l'activité proliférative (Ikeo *et al.*, 2000).

Des lignées cellulaires de différentes espèces ont été étudiées pour l'expression de *Men1* (Ikeo *et al.*, 1999) (Kaji *et al.*, 1999). Les résultats obtenus confirment le caractère ubiquitaire de cette expression, au moins en ARN, sans qu'on puisse conclure en ce qui concerne la protéine. Ce résultat est aussi observé lors d'une analyse *in situ* dans la souris (Stewart *et al.*, 1998; Forsberg *et al.*, 2001).

3.4 Localisation cellulaire de la Menin

Selon les données de la littérature, la Menin se localise majoritairement dans le noyau. Cette localisation a été confirmée par immunofluorescence, Western-blot, fractionnement cellulaire

et aussi par des constructions contenant l'ADNc du gène *MEN1* fusionné à l'EGFP. Les résultats montrent une forte fluorescence verte au niveau du noyau avec une faible quantité au niveau du cytoplasme et des membranes cellulaires (Guru *et al.*, 1998). Par contre, Lopez-Egido et ses collaborateurs ont montré que la Menin est localisé dans le cytoplasme pendant la phase S et le début de la phase G2 du cycle cellulaire, notamment dans des cellules de tumeurs gliales (Lopez-Egido *et al.*, 2002).

Les fonctions attribuées à la Menin (régulation de la transcription, réplication et/ou réparation de l'ADN et contrôle de la progression du cycle cellulaire) sont cohérentes avec sa localisation majoritairement nucléaire, bien qu'il semble que la Menin puisse migrer entre le noyau et le cytoplasme (Cao *et al.*, 2009).

4 Les partenaires de la Menin

Les informations dont nous disposons sur la Menin proviennent de la séquence codante de l'ADN génomique. Elles n'ont jamais été corroborées par une caractérisation biochimique de la protéine. Par ailleurs, l'étude des partenariats que la Menin entretient avec des régulateurs clés du cycle cellulaire et de la stabilité du génome nous a mis sur des pistes concernant ses fonctions biologiques.

Le premier partenaire de la Menin identifié a été la protéine JunD, un facteur de transcription de la famille AP1 (activator protein 1). Cette interaction a été mise en évidence par la technique du double hybride puis confirmée par co-immunoprécipitation et co-sédimentation (GST pull-down). (Agarwal *et al.*, 1999; Gobl *et al.*, 1999). Les observations indiquent que la Menin inhibe l'activité transcriptionnelle de JunD, ce qui est un peu paradoxal, étant donné que JunD est un inhibiteur de la croissance cellulaire et la Menin est-elle même un gène suppresseur de tumeurs. Ce paradoxe a été expliqué, au moins en partie, par les expériences de Agarwal et ses collaborateurs (2003), qui montrent qu'en absence de la Menin, JunD peut avoir une fonction d'activateur de la croissance cellulaire (Agarwal *et al.*, 2003). Ce premier partenaire nous a mis sur la piste d'un possible rôle de la Menin dans la régulation de la transcription. De plus, Hughes et collaborateurs ont montré que la Menin est capable d'activer la transcription de certains gènes par modification des histones, grâce au complexe qu'elle forme avec MLL2 et Ash2L (Hughes *et al.*, 2004).

Ensuite, plusieurs partenaires ont été identifiés (voir Tableau 2, qui montre aussi la méthodologie utilisée et le rôle fonctionnel de l'interaction). Trois techniques sont classiquement utilisées pour mettre en évidence une interaction protéique : co-immunoprécipitation, technique de double hybride, technique de GST pull-down (co-sédimentation). Généralement, l'identification d'un partenaire doit être validée par au moins deux de ces méthodes. Cependant, il y a quelques partenaires de Menin qui ont été identifiés par seulement une des techniques.

La plupart des interactions se font au niveau de la régulation de la transcription, de la réplication, et de la croissance cellulaire. D'ailleurs, JunD, Smad3 et NF- κ B sont impliqués dans des voies de signalisation communes qui interviennent dans la régulation de la prolifération cellulaire. Le rôle des interactions entre Menin et RPA2, NM23 et FANCD2 est moins évident. Le partenariat de la Menin avec les protéines du cytosquelette (NMHC IIA, GFAP, vimentine) semble plus intervenir dans la régulation de sa localisation sub-cellulaire.

La Menin est vraisemblablement un gardien du génome, comme l'indiquent les fonctions, qui sont suggérées par les interactions qu'elle entretient avec d'autres protéines: contrôle de la croissance cellulaire, régulation du cycle cellulaire, régulation de la transcription génique, régulation de l'apoptose, stabilité génomique et réparation d'ADN.

Le nombre et la grande diversité des partenariats de la Menin dans la cellule, sans qu'il soit possible, dans bien des cas, de savoir si une interaction de la Menin s'effectue directement ou par association avec un complexe multiprotéique, obèrent notre compréhension de leur signification fonctionnelle.

Protéines	Type de protéine/ Fonction	Méthodologies	Rôle fonctionnel de l'interaction	Références
ASK	Régulation du cycle cellulaire	GST-PD, IP	Menin supprime la prolifération cellulaire induite par ASK	Schnepp <i>et al.</i> , 2004
CHES (FOXN3)	Réparation d'ADN / Facteur de transcription	GST-PD, IP	Menin agit dans la régulation transcriptionnelle au niveau du <i>checkpoint</i> en phase S, après endommagement de l'ADN en coopération avec le complexe CHES1/mSin3A/HDAC1/HDAC2	Busyгина <i>et al.</i> , 2006
Era	Récepteur nucléaire / Facteur de transcription	D.H. en levure	Menin est un co-activateur transcriptionnel de ERα en augmentant la méthylation de H3K4 sur le promoteur de certains gènes cibles des œstrogènes	Jin <i>et al.</i> , 2003
FANCD2	Réparation d'ADN	IP	Menin est peut être impliquée dans la réparation d'ADN en partenariat avec FANCD2	Jin <i>et al.</i> , 2003
GFAP & Vimentine	Protéines du cytosquelette	D.H. en levure, GST-PD, IP, co-localisation	Menin, protéine majoritairement nucléaire, est peut être séquestrée dans le cytoplasme en phase S et début de phase G2 du cycle cellulaire	Lopez-Egido <i>et al.</i> , 2002
HDAC1/2 & mSin3A	Dynamique de la chromatine	IP	Menin réprime JunD en recrutant HDAC1/2, par son association avec mSin3A	Kim <i>et al.</i> , 2003
IQGAP1	Adhésion cellulaire	TAP	Menin réduit l'interaction entre IQGAP1 et GTP-Rac, et augmente l'interaction entre IQGAP1 et la cadhérine épithéliale (E-cadhérine)/beta-catenine	Yan <i>et al.</i> , 2009
JunD	Facteur de transcription	D.H. en levure et mammifère, GST-PD, IP	Menin réprime la transactivation régulée par JunD	Agarwal <i>et al.</i> , 1999 Gobl <i>et al.</i> , 1999
LEDGF	Protéine associée à la chromatine	IP	Menin permet le recrutement du complexe HMT au niveau des promoteurs en interagissant avec LEDGF	Yokoyama and Clearly, 2008
MLL & MLL2	Dynamique de la chromatine	IP	Menin permet la méthylation de H3K4 sur les promoteurs, activant l'expression des gènes HOX et des CDKI p18 ^{INK4c} et p27 ^{Kip1}	Yokoyama <i>et al.</i> , 2004 Hughes <i>et al.</i> , 2004
NF-κB	Facteur de transcription	IP, GST-PD	Menin réprime la transactivation régulée par NF-κB	Heppner <i>et al.</i> , 2001
NM23-H1	Kinase NDP	D.H. en levure, GST-PD	L'activité GTP hydrolase atypique de la Menin est augmentée par l'interaction avec NM23-H	Okhura <i>et al.</i> , 2001
NMHC II-A	Protéine du cytosquelette	TAP, GST-PD, IP, Co-localisation	En se liant à NMHC II-A, la Menin est peut être impliquée dans le processus de division cellulaire et d'autres processus où intervient NMHC II-A	Obungu <i>et al.</i> , 2003
Pem	Facteur de transcription	D.H. en levure, GST-PD, IP	Il semble que l'interaction Pem-Menin puisse avoir un rôle dans la spermatogenèse murine	Lemmens <i>et al.</i> , 2001
PPARγ	Récepteur nucléaire / Facteur de transcription	GST-PD, IP	Menin est un co-facteur transcriptionnel de PPARγ en permettant la triméthylation de H3K4 sur les promoteurs de certains de ses gènes cibles	Dreijerink <i>et al.</i> , 2009
RPA2	Réplication d'ADN	D.H. en levure, GST-PD, co-localisation IP	L'interaction RPA2-Menin ne semble pas impliquée dans la réparation d'ADN	Sukhodolets <i>et al.</i> , 2003
Smad3	Facteur de transcription	IP	Menin permet l'interaction de Smad3 avec l'ADN, activant ainsi la transcription des gènes cibles de la voie TGFβ	Kaji <i>et al.</i> , 2001
Smad1/5 & Runx2	Facteur de transcription	IP	Menin est nécessaire à la transcription, régulée par Smad1/5, des gènes cibles de la voie des BMP dont Runx2, co-facteur transcriptionnel des Smads	Sowa <i>et al.</i> , 2003 Sowa <i>et al.</i> , 2004
β-catenin	Facteur de transcription	GST-PD, IP	- Menin est nécessaire à l'activation transcriptionnelle du gène Axin2 (gène cible de la voie Wnt/beta caténine), par la triméthylation de H3K4 sur son promoteur - Menin régule la localisation subcellulaire de beta-caténine	Chen <i>et al.</i> , 2008 Cao <i>et al.</i> , 2009

Tableau 2. Les partenaires de la Menin, impliqués dans la régulation de la transcription (noir), dans la prolifération cellulaire (bleu), dans la réparation d'ADN et stabilité génomique (rose), et dans la constitution du cytosquelette (vert). IP: immunoprécipitation ; D.H.: double-hybride ; GST-PD: GST-pulldown ; TAP: "tandem-affinity purification".

5 Menin et la croissance cellulaire

On attribue communément aux gènes suppresseurs de tumeurs de jouer leur rôle soit par inhibition de la prolifération cellulaire, soit par activation des mécanismes d'apoptose. La surexpression de la Menin dans les cellules NIH3T3 transformées par l'oncogène Ras entraîne une diminution de la prolifération. Par ailleurs, les cellules NIH3T3 transformées par l'oncogène Ras retrouvent une morphologie caractéristique des cellules NIH3T3 sauvages lorsqu'elles surexpriment Menin. (Kim *et al.*, 1999).

5.1 Observations générales

Scacheri et ses collaborateurs ont proposé une hypothèse sur la fonction de la Menin comme inhibiteur de la croissance cellulaire, impliquant les inhibiteurs des kinases dépendantes de cyclines, notamment p18^{INK4c} et p27^{Kip1} (Scacheri *et al.*, 2006). La Menin régule l'expression de p18^{INK4c} et p27^{Kip1}, en activant la transcription par recrutement de MLL vers ces deux gènes, en particulier dans leurs régions promotrices. La perte de fonction de la Menin ou MLL entraîne une sous-expression de p18^{INK4c} et p27^{Kip1}. Ces résultats suggèrent que ces deux CDKi soient régulés par une interaction coopérative entre Menin et MLL (Milne *et al.*, 2005). En effet, Karnik et ses collaborateurs ont montré que la Menin est capable de se lier directement sur les promoteurs de p18^{INK4c} et p27^{Kip1} et ainsi augmenter la méthylation de H3K4 associée à ces promoteurs (Karnik *et al.*, 2005).

Ces observations conduisent à postuler un rôle de la Menin dans la régulation du cycle cellulaire.

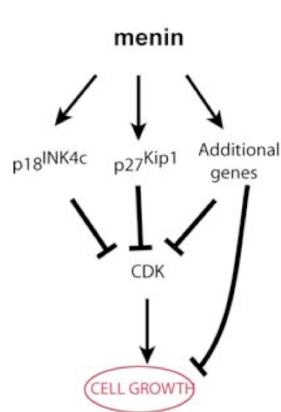


Figure 4. Représentation hypothétique sur la fonction de la Menin. Le symbole ↓ représente une activation et le symbole ⊥ représente une suppression. D'après (Scacheri *et al.*, 2006).

5.2 Rôle de Menin au cours du cycle cellulaire

5.2.1 Le cycle cellulaire

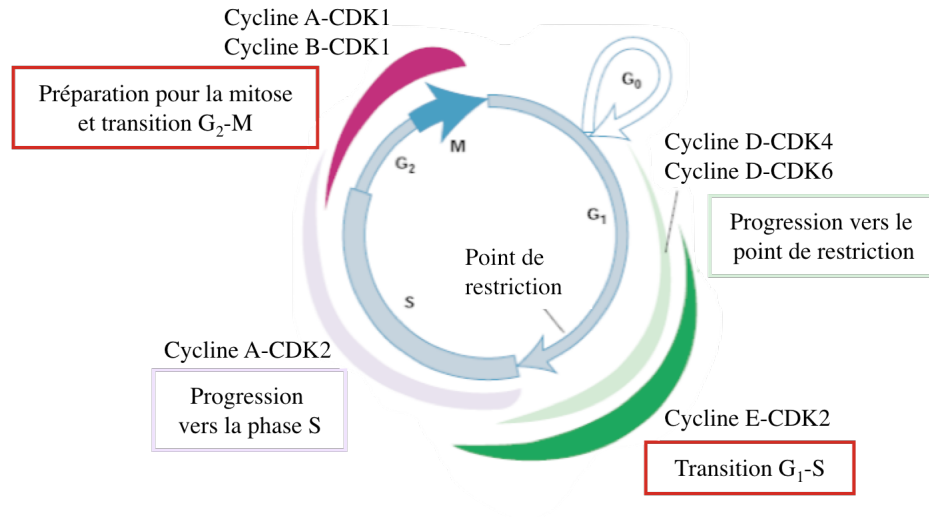


Figure 5. Les différentes phases du cycle cellulaire. D'après Lodish *et al.*, 2004.

Le cycle cellulaire se déroule en quatre phases successives: G1 (*Gap1*), S (synthèse), G2 (*Gap2*) et M (mitose). La phase dans laquelle les cellules sont temporairement ou en permanence en dehors du cycle cellulaire (quiescentes) est nommée de G₀. Pendant la phase G₁, les cellules augmentent de taille, et synthétisent ARN et protéines. Nutriments, mitogènes et facteurs de croissance extracellulaires induisent la transcription de gènes qui sont nécessaires pour la synthèse d'ADN et la cellule passe à la phase suivante, pendant laquelle a lieu la réplication d'ADN (phase S). Ensuite, il y a une phase nommée de G₂, pendant laquelle la cellule continue à grandir et à synthétiser de nouvelles protéines, pour ensuite se diviser dans la phase M. La durée du cycle cellulaire est variable selon le type cellulaire et les différences les plus importantes concernent la phase G₁.

Le cycle cellulaire est surveillé par trois points de contrôle (*checkpoints*) fondamentaux: le *checkpoint* G₁/S, qui permet d'évaluer si les conditions sont favorables pour la réplication de l'ADN, le *checkpoint* G₂/M qui vérifie s'il est nécessaire de réparer des erreurs de réplication d'ADN avant que la cellule entre en mitose et le *checkpoint* M, qui s'assure qu'il y a une distribution correcte des chromosomes dans les cellules filles. Une altération au niveau des *checkpoints* peut conduire à une instabilité génomique, et donc une accumulation de lésions

dans l'ADN et une augmentation de la prolifération cellulaire, des phénomènes qui sont liés à la progression tumorale (Elledge, 1996).

La progression du cycle cellulaire est régulée par un réseau de protéines kinases dépendantes des cyclines (CDK) dont l'activation est contrôlée par leurs cyclines à différents points spécifiques du cycle cellulaire.

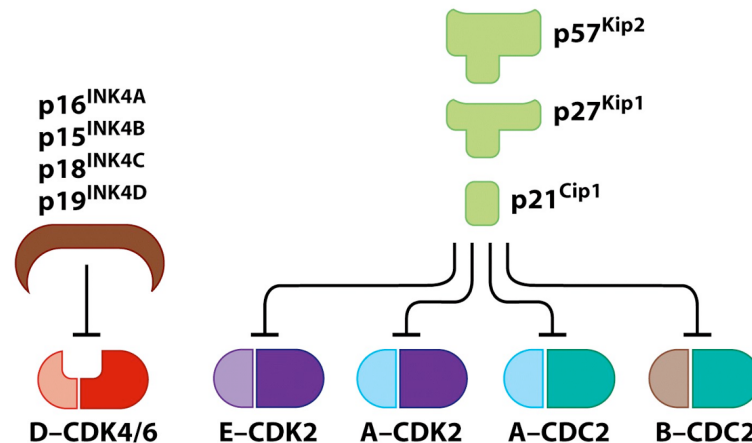


Figure 6. Les fonctions des CDKi. Le symbole $\perp$ représente une suppression. D'après Weinberg, 2007.

L'action des CDKs est régulée négativement par les CDKi (inhibiteurs de kinases dépendantes des cyclines), protéines qui empêchent la formation du complexe active cycline/CDK. D'entre ces inhibiteurs, nous pouvons trouver deux familles différentes : la famille INK4 comprend CDKN2A ($p16^{INK4a}$), CDKN2B ($p15^{INK4b}$), CDKN2C ($p18^{INK4c}$) et CDKN2D ($p19^{INK4d}$), qui inhibent spécifiquement l'activité des CDK4 et CDK6, empêchant leur association avec la Cycline D et bloquant le cycle cellulaire en phase G1 ; La famille Cip/Kip, comprend CDKN1C ($p57^{Kip2}$), CDKN1B ($p27^{Kip1}$) et CDKN1A ($p21^{Cip1}$), qui sont capables de bloquer l'action des cyclines A, D et E et des CDKs (Sherr and Roberts, 1999). Ceux qui nous intéressent le plus sont les trois CDKi, CDKN2C, CDKN1A et CDKN1B, que j'appellerai respectivement p18, p21 et p27, par la suite.

5.2.2 Régulation de l'expression de Menin et sa localisation au cours du cycle cellulaire

Une étude au niveau transcriptionnel a été menée par Northern Blot, après synchronisation des cellules et extraction des ARN totaux. Les résultats obtenus montrent que le taux d'ARNm diminue en phase G1 et augmente graduellement jusqu'à la entrée en phase S (Ikeo *et al.*, 2000). Il est donc vraisemblable que le gène *MEN1* soit régulé par un mécanisme dépendant du cycle cellulaire.

L'expression de Menin a été étudiée dans plusieurs lignées normales ou tumorales, par Western Blot, après synchronisation des cellules à différentes étapes du cycle cellulaire. La Menin est exprimée dans les cellules en quiescence (G0-G1), de la lignée tumorale GH4C1 d'hypophyse de rat. Son expression est diminuée en début de cycle (G1-S) et ré-augmente en phase S pour diminuer en phase G2-M. Ce profil d'expression, dans cette lignée cellulaire, est similaire à celui observé pour d'autres gènes suppresseurs de tumeurs, comme BRCA1, BRCA2 et p53, ce qui n'est pas incompatible avec le fait que la Menin puisse jouer un rôle de "checkpoint" dans le cycle cellulaire (Kaji *et al.*, 1999).

Par contre, les résultats obtenus dans les lignées cellulaires NIH3T3 (fibroblastes embryonnaires de souris) et HeLa (lignée épithéliale humaine issue d'un carcinome du col utérin) montrent que l'expression de Menin est constante au cours du cycle cellulaire (Guru *et al.*, 1999; Wautot *et al.*, 2000).

Huang et ses collaborateurs ont montré que la Menin se trouve dans le cytoplasme immédiatement après la phase M du cycle cellulaire (Huang *et al.*, 1999). Mais ce résultat est loin d'avoir été reproduit dans d'autres laboratoires. Il est néanmoins envisageable que la Menin soit un inhibiteur de la prolifération cellulaire lors du déclenchement de la phase M, quand la protéine se trouve dans le cytoplasme.

Il est remarquable que les résultats obtenus sur la dépendance de l'expression de Menin en fonction du cycle cellulaire soient aussi divergents dans la littérature. Il est encore plus remarquable que ce constat n'ait pas donné lieu à des études tentant de comprendre ces divergences et de les expliquer.

Il semble que la Menin soit impliquée pour bloquer le cycle cellulaire en réponse à des dommages à l'ADN. Cette implication semble prendre place au niveau transcriptionnel, par augmentation de l'expression de p21 (Bazzi *et al.*, 2008; Kottemann and Bale, 2009). La Menin pourrait ainsi jouer un rôle dans le choix entre blocage du cycle cellulaire et apoptose en cas de stress génotoxique, et que ce rôle varie selon le type cellulaire et les conditions de vie des cellules.

6 Menin, p53 et RB

La régulation du cycle cellulaire et l'apoptose dépendent essentiellement de deux oncosuppresseurs majeurs, *TP53* et *RB1*. Ce dernier est connu pour interférer avec le rôle de la cycline D1 et de E2F. Il est intéressant de noter que la cycline D1 est impliquée dans les tumeurs parathyroïdiennes dans lesquelles un réarrangement du chromosome 11 aboutit à placer l'expression du gène *CCND1* sous le contrôle du promoteur du gène *PTH*. Etant donné la prévalence des adénomes parathyroïdiens dans le cadre des NEM1, il était intéressant de chercher quelle place la Menin occupe dans cette voie de régulation, et en particulier de savoir si elle interagit fonctionnellement avec p53 et RB (Krebs and Arnold, 2002).

6.1 Menin et p53

Le gène suppresseur de tumeurs *TP53* a été identifié en 1979 et est localisé sur le bras court du chromosome 17 (Isobe *et al.*, 1986). Il code une phosphoprotéine nucléaire nommée par son poids moléculaire de 53 KDa (p53) avec 393 acides aminés, existant comme un tétramère dans sa forme active. Il a fallu attendre 1989 pour apprendre que ce gène était un gène onco-suppresseur et que cette protéine jouait un rôle très important dans la croissance et la prolifération des cellules en agissant dans le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose.

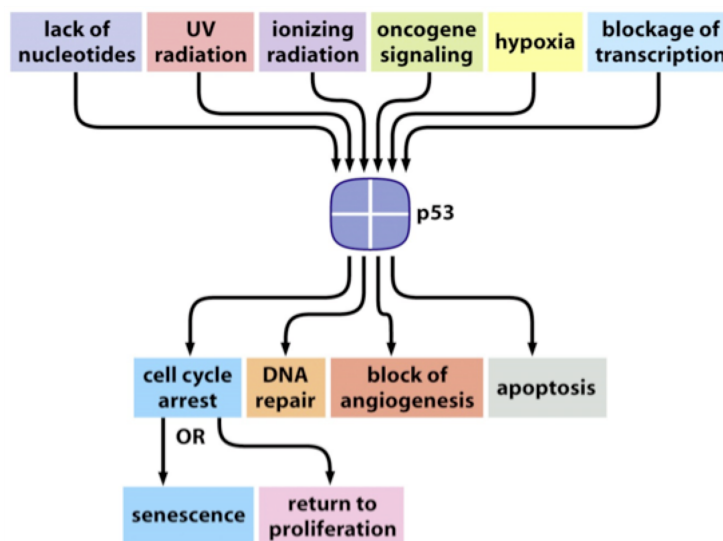


Figure 7. Les fonctions de p53. D'après Weinberg, 2007.

La protéine p53 est activée en réponse à des signaux de stress cellulaire, spécialement induit par des dommages à l'ADN (radiation UV, gamma ou X, carcinogènes, agents alkylants, mycotoxines, dépléction en ribonucléotides, inhibiteurs de topoisomérases), hypoxie et rupture d'adhésion cellulaire. L'action de p53 induit un blocage du cycle cellulaire en phase G1, qui peut être temporaire, avant la réplication d'ADN (phase S), permettant la réparation de l'ADN endommagé. Dans les cas où la réparation d'ADN n'est pas possible, p53 induit l'apoptose, à travers la signalisation vers des protéines inductrices de l'apoptose, comme *Bax*, *Bcl-2* et *c-Myc*. La protéine p53 est constitutivement exprimée dans tous les types cellulaires, mais elle ne s'accumule pas en raison de sa dégradation rapide dans le protéasome, après association avec une ligase d'ubiquitine (Mdm2). En réponse à un stimulus, p53 est phosphorylée en des sites multiples, puis acétylée et méthylée, ce qui conduit à la dissociation du facteur régulateur Mdm2. La conséquence est qu'elle s'accumule dans le noyau de la cellule.

Après l'activation de p53, la transcription de certains gènes inhibiteurs de kinases dépendantes de cycline, comme p21 est induite, déclenchant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1. L'effet immédiat de l'induction de p21 est l'inhibition de la phosphorylation par les complexes cycline-CDK4 et cycline-CDK6 et par conséquent de RB, induisant la permanence de la cellule en phase G1 (Levine, 1997).

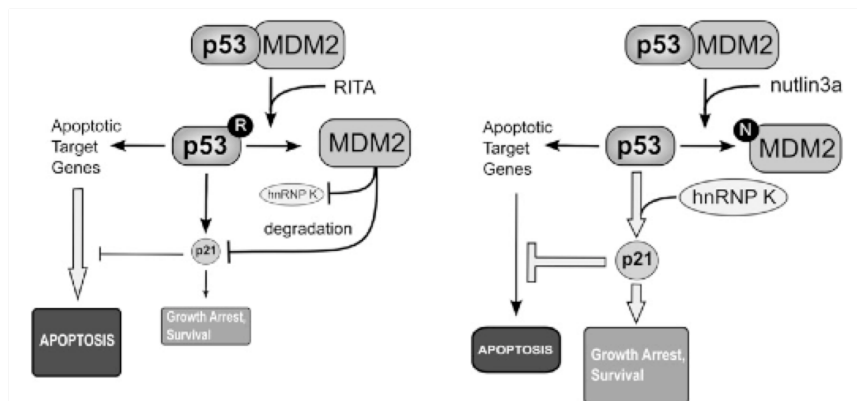


Figure 8. Contrôle des niveaux de p21 en fonction de p53. D'après (Enge *et al.*, 2009). Le symbole ↓ représente une activation et le symbole ⊥ représente une suppression. hnRNP K est une protéine capable d'interagir avec p53 et induire p21. RITA ("Reactivation of p53 and Induction of Tumor cells Apoptosis") est un composant de petite taille moléculaire capable d'induire une dissociation entre p53 et MDM2. Ainsi, MDM2 libre est capable de dégrader p21 et hnRNP K. La Nutlin3a est un composant qui se lie à MDM2, empêchant l'interaction entre p53 et MDM2, et la dégradation de p21 et hnRNP K, par celui-ci, ce qui favorise l'arrêt du cycle cellulaire.

Par ailleurs, la Menin co-immunoprécipite avec p53 dans des cellules d'insulinome de rat INS-r3 et il se peut qu'elle régule la transcription de p53. Par contre, dans les cellules présentant une sur-expression de Menin, cette co-immunoprécipitation n'est pas détectable (Bazzi *et al.*, 2008).

En conditions de stress génotoxique, p21 (une des cibles de p53) est connue comme étant sur-exprimée. Les cellules d'insulinome de rat surexprimant Menin ont une capacité accrue d'activation de p21 par rapport aux mêmes cellules exprimant une Menin mutées (mutations faux sens) (Bazzi *et al.*, 2008).

6.2 Menin et RB

Un autre gène suppresseur de tumeurs très étudié est le gène *RB1*. Il est localisé sur le chromosome 13q14 et code une phosphoprotéine nucléaire dénommée protéine RB ou p105Rb, de 105 à 110 KDa. La protéine RB joue un rôle clé dans la régulation de la progression du cycle cellulaire.

Dans sa forme active, RB est hypophosphorylée et agit comme répresseur de la progression des cellules de la phase G1 vers la phase S du cycle cellulaire, par liaison avec le facteur de transcription E2F. En début de phase G1, la cycline D est synthétisée, et se lie à CDK4 et CDK6, formant deux complexes. Ensuite, c'est la cycline E qui est synthétisée, et se lie à CDK2. Ces trois complexes agissent pour phosphoryler la protéine RB, et ainsi l'inactivent. En début de phase S, la forme phosphorylée de la protéine devient plus abondante, ce qui persiste pendant les phases S, G2 et M. Quand la cellule est stimulé pour se diviser, la protéine RB est phosphorylée par les complexes cycline-CDK, devient inactive et libère le facteur E2F. La protéine de régulation génique E2F est responsable pour la transcription de plusieurs gènes dont les produits sont nécessaires pour que la cellule entre en phase S (Sherr and McCormick, 2002).

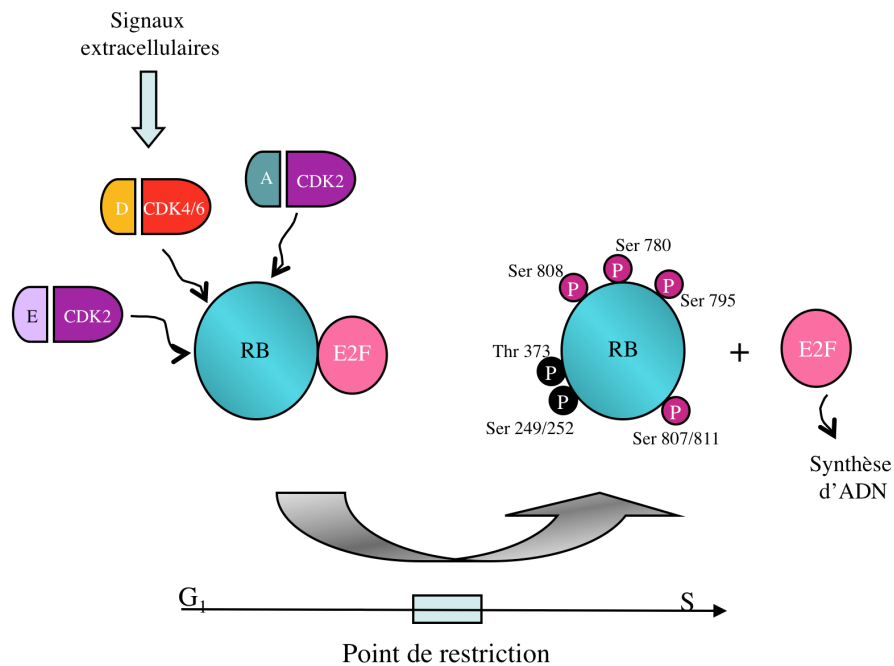


Figure 9. Régulation du cycle cellulaire par phosphorylation de la protéine RB.
D'après <http://www.cellsignal.com>.

Il existe deux autres protéines de structure proche de RB, les protéines p107 et p130, mais pour lesquelles on ne connaît pas de mutations associées au cancer (Sherr and McCormick, 2002).

Des souris double knock-out pour Menin et RB développent des tumeurs endocrines de la même façon que les souris simplement inactivées pour Menin ou RB, et sans augmentation de la sévérité tumorale ou diminution de l'âge des lésions. Ces résultats suggèrent que la Menin et RB agissent dans une voie moléculaire commune de régulation du cycle cellulaire et de suppression tumorale (Loffler *et al.*, 2007; Matoso *et al.*, 2008).

Par ailleurs, la Menin a la capacité de réguler l'expression de p18 et p27, qui sont capables d'inhiber les CDK, maintenir la forme active hypophosphorylée de RB et ainsi, empêcher la progression dans le cycle cellulaire (Milne *et al.*, 2005; Karnik *et al.*, 2005; Scacheri *et al.*, 2006).

6.3 p53 et RB

Les protéines p53 et RB sont capables d'arrêter le cycle cellulaire en phase G1. L'activation de la protéine p53 sous l'effet de dommages à l'ADN entraîne une activation de p21^{Cip1} qui inhibe la liaison cycline E-CDK4. Celle-ci inactive la liaison cycline E-CDK2 et ainsi empêche la libération de la protéine RB du facteur de transcription E2F. Ce mécanisme constitue une des voies de régulation du cycle cellulaire, par l'arrêt de la phase G1/S. D'un autre côté, RB est capable d'inactiver le facteur de transcription E2F par phosphorylation et ainsi éviter l'entrée en phase S.

Harvey et ses collaborateurs ont mis en évidence un rôle coopératif entre p53 et RB dans l'accélération de la tumorigenèse et développement des tumeurs endocrines. D'ailleurs, les tumeurs identifiées dans les souris knock-out RB et p53 progressent plus rapidement que celles des souris simple knock-out RB ou p53 (Harvey *et al.*, 1995).

7 Rôle physiologique de la Menin

7.1 Modèles animaux et fonctionnalités du gène *MEN1*

L'utilisation de modèles animaux est une approche méthodologique très importante pour la connaissance des fonctions attribuables à un gène.

7.1.1 Modèles souris knock-out

Le modèle knock-out permet de désactiver un gène en remplaçant son allèle normal par un allèle mutant non fonctionnel. Cette technique permet de mieux comprendre le fonctionnement d'un gène et les conséquences de son inactivation sur le développement et la physiologie de l'organisme. Son application au modèle murin représente donc un choix technologique judicieux afin de mieux comprendre l'implication de certains gènes chez les mammifères, et d'extrapoler, dans les limites du possible, ces résultats à nos connaissances en génétique humaine.

Chez la souris, le gène *Men1* est bien conservé et présente une homologie de séquence de 96,7% (en acides aminés) avec le gène *MEN1* humain (Stewart *et al.*, 1998). Plusieurs modèles de souris knock-out *Men1* hétérozygotes ont été développés et les résultats montrent que dès l'âge de 8 mois, les souris *Men1*^{+/-} développent des tumeurs dans les parathyroïdes, les îlots pancréatiques, l'hypophyse et les glandes surrénales, un spectre très similaire à celui trouvé chez les patients NEM1, et que certaines, ont développé aussi des tumeurs dans la thyroïde et gonades (Crabtree *et al.*, 2001; Bertolino *et al.*, 2003b; Loffler *et al.*, 2007). Cependant, certaines atteintes développées par les souris *Men1*^{+/-} ne sont pas décrites chez l'homme et certaines de ces tumeurs divergent d'un modèle murin à l'autre. Ainsi, Crabtree et ses collaborateurs ont observé des tumeurs au niveau de la prostate et des ovaires (Crabtree *et al.*, 2001). D'après les résultats de Bertolino et ses collaborateurs, les souris knock-out *Men1*^{+/-} développent des tumeurs dans les testicules (cellules de Leydig) (Bertolino *et al.*, 2003b).

Les souris homozygotes *Men1*^{-/-} présentent un phénotype embryonnaire létal (mortalité des embryons *in utero* au jour embryonnaire 11,5-13,5) (Bertolino *et al.*, 2003a; Crabtree *et al.*, 2001). Parmi les souris étudiées, 20% présentaient des anomalies au niveau du développement crânien et/ou facial, ce qui montre que le gène *Men1* est impliqué dans la différenciation osseuse et/ou hématopoïétique (Crabtree *et al.*, 2001).

Tous ces modèles de souris knock-out constituent donc de bons modèles d'étude du syndrome NEM1 chez l'homme.

7.1.2 Modèles souris knock-out tissu spécifique

Le modèle knock-out conditionnel permet l'inactivation d'un gène spécifiquement dans un tissu donné. Dans le cas de *Men1*, cela a permis de cibler les glandes endocrines affectées dans le syndrome NEM1.

Des observations faites sur les souris knock-out conditionnels apportent des éléments de compréhension sur le rôle du gène *Men1* dans la différenciation et fonctionnement des cellules beta des îlots pancréatiques (Bertolino *et al.*, 2003b); Crabtree *et al.*, 2003; Biondi *et al.*, 2004), mais aussi des cellules alfa (Lu *et al.*, 2010), des glandes parathyroïdes (Libutti *et al.*, 2003) et de l'hypophyse (Crabtree *et al.*, 2003; Biondi *et al.*, 2004).

Deux organes non endocrines ont été aussi étudiés, le foie et les cellules hématopoïétiques. La délétion homozygote du gène *Men1* dans les hépatocytes (cellules du foie) n'entraîne ni phénotype tumoral ni anomalie de développement de ce tissu, ce qui porte un doute sur le fait que la Menin est, de manière générale, essentielle pour la survie d'une cellule (Scacheri *et al.*, 2004a). Les études réalisées sur des cellules hématopoïétiques (érythroïdes, lymphoïdes et myéloïdes) montrent un rôle important de la Menin dans l'homéostasie des cellules souches hématopoïétiques et progéniteurs (Maillard *et al.*, 2009).

7.1.3 Autres modèles animaux

Un modèle animal qui a donné beaucoup d'information sur l'instabilité du génome est la drosophile (*Drosophila melanogaster*). Cet animal modèle a déjà été utilisé avec succès en cancérologie. Mais, la drosophile, bien qu'ayant un développement embryonnaire assez distinct de celui des mammifères, a été utilisée plus encore comme modèle de développement. En effet, la distance évolutive entre la mouche et l'homme permet d'attribuer aux protéines et

aux fonctions conservées entre les deux espèces une importance fondamentale. La drosophile a été utilisée également comme modèle dans le domaine de la neurobiologie. La destruction homozygote du gène *Mnn1* (homologue de *MEN1* chez la drosophile) est viable chez la drosophile, contrairement aux mammifères, ce qui indique que la fonction essentielle de la Menin au cours du développement de ces derniers n'est pas présente ou indispensable chez la mouche. Les mutants de *Mnn1* présentent une grande sensibilité aux rayonnements ionisants, et donc une hypersensibilité aux dommages à l'ADN. Ces résultats suggèrent que la Menin est impliquée dans les voies de réparation par excision de nucléotides (Busygina *et al.*, 2004).

Des études sur l'escargot *Lymnaea stagnalis* ont montré une implication de l'orthologue du gène *Men1* dans la régulation de la formation des synapses entre les neurones centraux (van Kesteren *et al.*, 2001). Alors qu'on pensait que cette fonction neurobiologique de la « Menin » de lymnée pouvait résider dans des domaines de la protéine qui étaient particuliers à cette espèce animale, ce rôle a été récemment observé chez le rat (Zhang *et al.*, 2010).

Le poisson zèbre (*Danio rerio*) est un bon modèle pour des études de biologie du développement. Le gène *Men1* y est bien conservé et il est vraisemblable qu'il soit impliqué dans le développement des cellules sanguines (Manickam *et al.*, 2000). Ce modèle est très important car il permet d'étudier des vertébrées, permettant ainsi, une comparaison des résultats entre des organismes comme la souris et le rat avec la Drosophile.

Tous ces modèles animaux ont permis de découvrir certains aspects du gène *MEN1*. Les résultats obtenus montrent que les fonctions particulières de la Menin par les différents modèles sont conservées au cours de l'évolution.

7.2 Autres fonctions attribuées à la Menin

Une autre façon de connaître la fonctionnalité d'un gène consiste à étudier le comportement cellulaire. Selon Sowa et ses collaborateurs, la Menin joue un rôle au niveau de la formation de la moelle osseuse, notamment dans la différenciation des ostéoblastes. Et en plus, celle-ci a la capacité d'inhiber la différenciation tardive, dans des cellules osteoblastiques. Ces capacités proviennent de son interaction avec les Smad et Runx2, impliquées dans les voies de signalisation TGF- β et BMP-2 (Sowa *et al.*, 2004). D'ailleurs, une inactivation de la Menin inhibe la différenciation des cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes (Sowa *et al.*,

2003). Ces observations servent à rapprocher des défauts de développement du squelette facial des embryons de souris homozygotes pour une délétion du gène *Men1*.

Il semble que la Menin joue un rôle comme oncogène dans les leucémies aiguës, par interaction avec MLL. D'autant plus que la présence de Menin dans ce complexe semble être essentielle pour la leucémogénèse myéloïde (Caslini *et al.*, 2007; Yokoyama *et al.*, 2005).

7.3 Menin et l'instabilité génomique

L'instabilité génomique et l'accumulation de mutations dans le genome (substitutions, délétions, insertions) peuvent être dû à des facteurs, comme :

- a) Une mauvaise incorporation de bases lors de la réplication d'ADN ;
- b) Des substances chimiques réactives, notamment celles d'oxygène, les produits dérivés de la réaction de phosphorylation oxydative ;
- c) Les agents mutagènes, comme les polluants, le tabac ou certains aliments ;
- d) Les rayons-x, qui provoquent des cassures d'ADN double-brin.

En conditions normales, ces agressions sont contenues par des mécanismes de réparation et de surveillance. Le cycle cellulaire doit être arrêté pour que le processus de réparation puisse avoir lieu. Cet arrêt se fait au niveau des *checkpoints*, par désactivation des complexes cycline-CDK (voir section 5.2.1). Des défauts à ce niveau entraînent une instabilité génomique qui est l'une des caractéristiques des cellules tumorales.

Des mécanismes épigénétiques, tels que la méthylation de l'ADN et des modifications d'histones peuvent aussi être liés à l'instabilité génétique, résultant en une activation ou perte de la transcription des gènes (Sieber *et al.*, 2005).

7.3.1 Le syndrome NEM1 est-il un syndrome d'instabilité génomique ?

D'après Hecht & Hecht (1991), le syndrome NEM1 pourrait être considéré comme un syndrome d'instabilité génomique au même titre, ou de manière analogue à l'ataxie télangiectasie (AT) ou l'anémie de Fanconi (AF), par exemple. Ce point est pourtant un sujet de débat qui est toujours actuel qui n'a jamais été tranché. Une des raisons de cette incertitude est sans doute le manque de clarté dans la définition du phénotype, un manque de clarté qui peut être dû, au moins en partie, au fait qu'il n'existe pas d'homozygotes pour un défaut du gène *MEN1*, en raison de la létalité des mutations homozygotes chez les mammifères. Au

contraire, le phénotype d'instabilité génomique ne s'exprime que chez les homozygotes dans le cas de l'AT ou de l'AF (Hecht and Hecht, 1991).

Tomassetti et ses collaborateurs ont montré que des lymphocytes de patients NEM1 présentaient des aberrations chromosomiques et chromatidiennes (cassures et "gaps"), notamment après un traitement avec diépoxybutane, un agent qui endommage l'ADN double-brin et auquel les cellules d'anémie de Fanconi sont aussi sensibles (Tomassetti *et al.*, 1995; Itakura *et al.*, 2000). L'exposition à cet agent augmente la fréquence de divisions prématurées des centromères dans des lymphocytes de patients NEM1. Ces résultats suggèrent que le gène *MEN1* puisse jouer un rôle dans la maintenance de l'intégrité de l'ADN (Sakurai *et al.*, 1999).

De plus, il a été montré que les tumeurs associées au syndrome NEM1 présentent une instabilité génomique plus importante que les tumeurs analogues en dehors du cadre NEM1. (Hessman *et al.*, 2001).

Une étude sur des drosophiles *Mnn1^{-/-}* a montré qu'elles sont sensibles à des agents intercalants, notamment au cisplatine et aux ions ammonium (Busygina *et al.*, 2004). Cependant, une étude faite sur des souris knock-out, n'ayant pas la Menin, montre que l'instabilité chromosomique n'est pas impliquée dans le processus de tumorigenèse (Scacheri *et al.*, 2004b).

La Menin est capable de s'associer à NM23H1 (Non metastatic protein 23), et ainsi, contribuer à l'intégrité chromosomique, par association au centrosome (Ohkura *et al.*, 2001). La présence de Menin a été détectée au niveau de centromères de cellules humaines (J. Grosgeorge et P. Gaudray, résultats non publiés).

7.3.2 Menin et la réparation de l'ADN

Nous avons vu que des mutants *Mnn1^{-/-}* de drosophile suggéraient que la Menin jouait un rôle dans la réparation de l'ADN (Busygina *et al.*, 2004). De plus, Jin et ses collaborateurs ont montré que Menin interagissait avec FANCD2, une protéine impliquée dans la réparation d'ADN et mutée dans l'anémie de Fanconi, un syndrome cancéreux héréditaire autosomique récessif. Les lymphocytes de patients atteints de cette maladie sont hypersensibles au diépoxybutane. L'interaction entre Menin et FANCD2 devient plus intense après irradiation

des cellules. De plus, la Menin est colocalisée avec FANCD2 au niveau de la chromatine. Ces résultats suggèrent que Menin interagit avec FANCD2, pour réparer l'ADN endommagé. Il est possible que la perte de Menin compromette la machinerie de réponse à l'ADN endommagé, menant à une accumulation d'altérations nucléotidiques qui contribuent à la tumorigenèse (Jin *et al.*, 2003).

Des résultats obtenus par Sukhodolets et ses collaborateurs montrent que la Menin est capable d'interagir avec la sous-unité RPA2 de 32KDa du complexe hétérotrimérique RPA (Replication protein A). Cette protéine se lie à l'ADN simple brin et joue un rôle très important dans la réplication, la réparation et la recombinaison chez les eucaryotes. Cependant, la liaison de Menin à RPA2 n'empêche pas la fixation de RPA2 à l'ADN. Cette interaction est inhibée par de nombreuses mutations faux-sens observées chez des patients NEM1 (Sukhodolets *et al.*, 2003).

7.3.3 Menin et les télomères

L'extrémité des chromosomes, qui sont des structures linéaires d'une particulière fragilité, est constituée de télomères, séquences répétées repliées en boucles qui jouent un rôle de protection, contribuant ainsi au maintien de l'intégrité du matériel génétique. En particulier, les télomères agissent pour empêcher la fusion des parties terminales des chromosomes qui conduisent à la constitution de chromosomes dicentriques qui peuvent casser de manière aléatoire lors d'une de la séparation des chromosomes fils en anaphase de mitose.

A chaque division cellulaire, l'ADN télomérique devient plus court. La régénération des télomères est possible grâce à l'action de l'enzyme télomérase, qui est une transcriptase inverse qui a en charge l'élongation de l'ADN télomérique à partir d'une matrice ARN. Dans les cellules humaines, la télomérase est composée de hTERT ("human telomerase reverse transcriptase") et un composant ARN, qui contient la séquence complémentaire nécessaire pour la synthèse de la séquence à ajouter aux extrémités des chromosomes. L'activation transcriptionnelle de hTERT est critique pour l'expression de la télomérase, qui joue un rôle clé dans la prolifération des cellules cancéreuses humaines (Weinberg, 2007).

La capacité des cellules de se répliquer indéfiniment a été liée à l'expression de la télomérase. Une grande pourcentage des cellules tumorales qui ont des caractéristiques immortalisées montrent une activité de la télomérase (Cong *et al.*, 2002).

La Menin s'associe avec les télomères pendant la méiose, ce qui peut suggérer une fonction de cette protéine dans l'alignement des chromosomes méiotiques, pour une recombinaison correcte. Cependant, la Menin ne régule pas directement l'activité de la télomérase. En effet, des cellules sur-exprimant la Menin montrent une activité télomérase normale et la taille des télomères n'est pas altérée dans des tumeurs contenant des mutations *MEN1* homozygotes (Suphapeetiporn *et al.*, 2002). Ces résultats paraissaient être contredits par Lin et Elledge, qui ont montré qu'une sur-expression de la Menin peut réduire l'expression et l'activité de hTERT (Lin and Elledge, 2003). Au contraire, il semble, d'après Hashimoto et collaborateurs, que bien que la Menin ait un effet inhibiteur sur le promoteur de hTERT, probablement par fixation sur ce promoteur sans spécificité de séquence, la Menin n'ait pas un rôle essentiel dans la régulation de l'activité de la télomérase dans des cellules normales aussi bien que cancéreuses (Hashimoto *et al.*, 2008).

Matériel et Méthodes

1 Production et purification de la Menin

L'objectif est la production de l'isoforme majeure de la Menin (68 KDa) purifiée par chromatographie d'affinité, en grande quantité et soluble, afin d'en caractériser la structure mais aussi les domaines fonctionnels, en particulier, ceux impliqués dans la liaison à l'ADN. Nous avons exploré deux systèmes en parallèle : système eucaryote en cellules S2 de drosophile et système procaryote en *E.coli*.

1.1 Système eucaryote (cellules S2 de drosophile)

1.1.1 Matériels

Lignée cellulaire

Les cellules S2 dérivent d'une culture primaire d'embryons de *Drosophila melanogaster* âgés de 20-24h (Schneider, 1972). Elles sont cultivées à 28°C ou à température ambiante sans CO₂. Ces cellules sont semi-adhérentes : elles poussent donc soit en monocouche soit en suspension.

Vecteurs

Vecteur d'expression pMT-BiP-Menin-Fc-His6

Le plasmide pMT-BiP-Menin-Fc-His6 contient un signal BiP SS, qui permet une sécrétion de Menin dans le milieu, la protéine de fusion Menin-Immunoglobulin Fc (qui permet une purification par affinité et qui peut être séparée par une protéase spécifique), 6 molécules d'histidine (His6, qui permettent une purification par une résine nickel) et le promoteur de metallothionéine, qui permet une activation par l'addition de métaux lourds divalents dans le milieu.

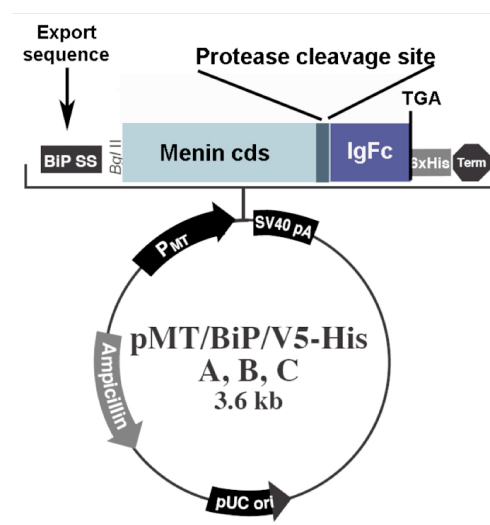


Figure 10. Stratégie de clonage pour préparer le vecteur d'expression pMT-BIPSS-Menin-Fc-His6.

Vecteur d'expression PCoBlast

Le plasmide PCoBlast a été choisi comme vecteur de sélection (3907 pb). Celui-ci peut être co-transfecté avec le vecteur d'expression (par la technique de calcium phosphate), pour créer des lignées cellulaires stables en *Drosophila*. Il contient le gène bsd de *Streptomyces griseochromogenes* sous le contrôle du promoteur copia de *Drosophila* pour conférer la résistance à la blasticidine dans les cellules S2. Les transfections, par calcium phosphate, intègrent des copies multiples dans le génome. L'utilisation d'un vecteur de sélection avec un excès moléculaire du vecteur d'expression permet d'assurer la présence des deux dans la sélection.

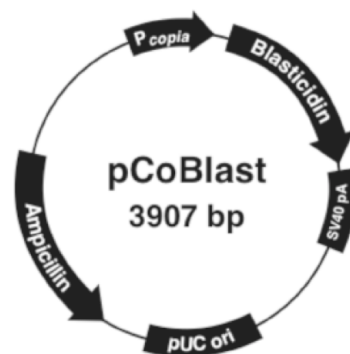


Figure 11. Vecteur de sélection pCoBlast.
D'après www.invitrogen.com.

1.1.2 Méthodes

Production de la protéine recombinante

Les cellules S2 ont été maintenues à température ambiante dans le milieu *Drosophila* Schneider avec addition de 10% SVF décomplémenté jusqu'à en avoir environ 5×10^5 cellules viables/ml dans 4 ml de milieu. Ensuite, les cellules ont été co-transfectées avec le vecteur d'expression pMT/BiP/V5-His (12 µg d'ADN plasmidique) et le vecteur de sélection pCoBlast par un ratio 1:20 (Calcium Phosphate Transfection Kit, Invitrogen) et sélectionnées par blasticidine à 20 µg/ml, en utilisant le protocole "*Drosophila* Expression System for the stable expression and purification of heterologous proteins in Schneider 2 cells" (Invitrogen). Les cellules ont été induites 4h, 8h, et 24h après transfection par addition de 0,5mM; 1,0mM; 2,5mM de CuSO₄ et ZnCl₂. Les surnageants cellulaires et les culots ont été collectés après 24h et 3 jours d'induction et analysés par Western Blot.

Purification de la protéine recombinante par la Protéine G agarose

La protéine de fusion Menin-Ig a été choisie pour stabiliser la protéine et promouvoir sa purification. La partie Fc de l'immunoglobuline a une affinité pour la protéine G. La fraction protéique (contenant aussi 0.1% de Tween20) est incubée avec la protéine G agarose (Prot.G

Plus-Agarose, Santa Cruz Biotechnology) pendant 1h sous rotation, à température ambiante. Après 4 lavages successifs de 15 min avec un tampon sodium phosphate 20mM à pH 7, les protéines retenues sont éluées par un tampon glycine.HCl à pH 4.5 puis à pH 3.5 et à pH 2.7. Les protéines éluées sont neutralisées par l'addition de 100 mM d'une solution Tris pH 8,8 et des échantillons sont déposés sur un gel d'acrylamide 8% pour une coloration au bleu de Coomassie et/ou à l'argent et une analyse Western-blot. Les éluats restants sont gardés à 4°C.

Purification de la protéine recombinante par Nickel-agarose

Nous avons utilisé une méthode alternative de purification par affinité, qui repose sur la capacité du nickel à se lier à un ensemble de molécules d'histidine tel que le motif His6 présent dans notre vecteur d'expression. La fraction protéique (contenant 0.1%Tween20, 300mM NaCl et 10mM d'imidazole) est incubée avec une résine NiNTA Agarose (QIAGEN), pendant 30 minutes sous rotation, à 4°C. Après 3 lavages successifs de 10 min avec un tampon NaH₂PO₄ 50mM à pH8, NaCl 300mM et Imidazole 20mM, les protéines retenues sont éluées par un tampon NaH₂PO₄ 50mM à pH8, NaCl 300mM et Imidazole 500mM. Trois fractions sont collectées et des échantillons sont déposés sur un gel d'acrylamide 8% pour une coloration au bleu de Coomassie et/ou une coloration au nitrate d'argent et une analyse Western-blot. Les fractions purifiées qui restent sont gardés à 4°C.

Clivage entre la Menin et l'Immunoglobuline

Un site de clivage d'une protéase spécifique se situe entre la Menin et la chaîne d'immunoglobuline, et permet de l'enlever ainsi que le tag his6 et ainsi, d'obtenir la Menin seule à grande échelle. Les fractions éluées sont incubées avec une résine sépharose G pendant 1h dans un appareil "Thermomixer Comfort" (Eppendorf) à 1000 rpm et ensuite lavées avec un tampon compatible avec le clivage ultérieur, 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM DTT. Après centrifugation, la résine est reprise dans 100 µl de tampon de clivage et 1 µl de protéase est ajoutée (PreScission Protease, GE Healthcare). L'incubation est faite ON à 4°C, dans le "Thermomixer Comfort") à 1000 rpm. Après centrifugation, le surnageant contenant Menin + Ig + protéase est passé sur une résine Protino® Glutathione Agarose 4B (Macherey-Nagel), pour isoler la Menin. Les protéines obtenues ont été analysées par Western Blot et aussi par une coloration de gels d'acrylamide, au bleu de coomassie et au nitrate d'argent.

Analyse des protéines par électrophorèse en gel d'acrylamide

La technique d'électrophorèse en conditions dénaturantes ("*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*" ou *SDS-PAGE*) a été décrite par Ulrich Laemmli en 1970. Des extraits de protéines totales sont additionnés de tampon SDS1X (100mM Tris HCl pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 0.2% bleu de bromophenol, 50mM DTT) et dénaturés 5 min à 95°C. Les gels d'acrylamide à 8% avec un gel de concentration de 4,5% contenant les échantillons à tester, une gamme de BSA (0.2/ 0.6/ 1.2/ 1.8 µg) et le marqueur "Precision Plus Protein™ Standards" (BIO-RAD) ou le marqueur "Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder" (Fermentas), sont migrés à 8mA pendant la nuit, dans un tampon de migration Tris-Glycine-SDS (40mM Tris-base, 0.1mM Glycine, 0.1% SDS) à l'aide de l'appareil "PowerPac™ HC" (BIO-RAD). Généralement, deux gels sont préparés, l'un est coloré au bleu de Coomassie et/ou au nitrate d'argent permettant de vérifier le profil électrophorétique et l'homogénéité des quantités de protéines chargées, l'autre est transféré sur une membrane de nitrocellulose pour réaliser un western blot.

Coloration au bleu de coomassie

Le bleu de Coomassie permet de détecter un minimum de 100 ng de protéine par spot et présente l'avantage de donner une intensité de coloration proportionnelle à la quantité de protéines. Les gels d'acrylamide sont placés 20 minutes dans le colorant bleu de Coomassie 0.2% (p/v) SERVA blueR, Réf 35079.01 (SERVA), acide acétique 10% (v/v), éthanol 40% (v/v) et 50% d'eau UP, préparé selon la méthode de Laemmli (1970). Les gels sont ensuite décolorés pendant une nuit sous agitation dans un mélange acide acétique 10% (v/v), éthanol 20% (v/v) et 70% d'eau UP.

Coloration au nitrate d'argent

Etant mille fois plus sensible que le bleu de Coomassie, la coloration au nitrate d'argent permet de détecter des spots contenant 0,1 ng de protéines. Elle présente néanmoins certains inconvénients: la stœchiométrie de la coloration n'est pas totalement linéaire, la reproductibilité est difficile à obtenir et certaines protéines sont peu ou pas colorées par cette méthode. Les gels sont colorés au nitrate d'argent, selon le protocole décrit par Sasse et Gallagher (Sasse and Gallagher, 2009).

Après migration, les protéines sont fixées dans le gel grâce à un mélange méthanol 40% (v/v) et formaldéhyde 13.5% (v/v) pendant 10 minutes. Après, le gel est lavé 2 fois avec de l'eau

ultra-pure pendant 5 minutes. Les protéines sont ensuite mises en contact avec une solution de thiosulfate de sodium 0.02% (p/v) pendant 1 minute. Le gel est ensuite rincé dans de l'eau ultra-pure deux fois 20 secondes avant d'être placé dans une solution de nitrate d'argent 0.1% (p/v) pendant 10 minutes. Après un rinçage du gel de 30 secondes dans de l'eau ultra-pure, les protéines sont révélées par une solution de carbonate de sodium 3% (p/v), thiosulfate de sodium 0.00004% (p/v) et formaldéhyde 0.05% (v/v). La coloration est stoppée par addition d'une solution d'acide acétique 2.3 M, à 20% du volume de solution de développement.

Cette coloration peut tout à fait être utilisée après coloration au bleu si cette dernière n'a pas donné de résultats satisfaisants. Cependant, la coloration au nitrate d'argent manque de reproductibilité, car l'intensité de coloration varie d'une protéine à l'autre.

Western Blot

Après électrophorèse, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose de 0.2 μ m (Amersham™ Hybond™ – ECL, GE Healthcare) sous une tension de 25V pendant 30 minutes à l'aide du "Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell" (BIO-RAD) dans un tampon de transfert (40mM Tris-base, 0.1M Glycine, 20% éthanol). La membrane est alors bloquée avec une solution de TBST (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% Tween20), contenant 5% (w/v) de lait en poudre, pendant 1h à température ambiante. Ensuite, elle est incubée une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire anti-Menin "M23C" (Innovagen, Se.) à une dilution de 1 :2000 dans la même solution que le blocage. L'excès d'anticorps est éliminé, en réalisant deux lavages successifs de 10 minutes dans une solution de TBS/Tween0.1% et un lavage de 10 minutes dans une solution de TBS/Tween0.1%/ lait5%(w/v). L'anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase "Donkey anti-rabbit IgG-HRP" (Santa Cruz Biotechnology) est incubé avec la membrane pendant 1h à température ambiante. Après quatre lavages successifs de 10 minutes avec une solution de TBS/Tween0.1%, la membrane est développée par une réaction de chemiluminescence (kit "Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit", GE Healthcare).

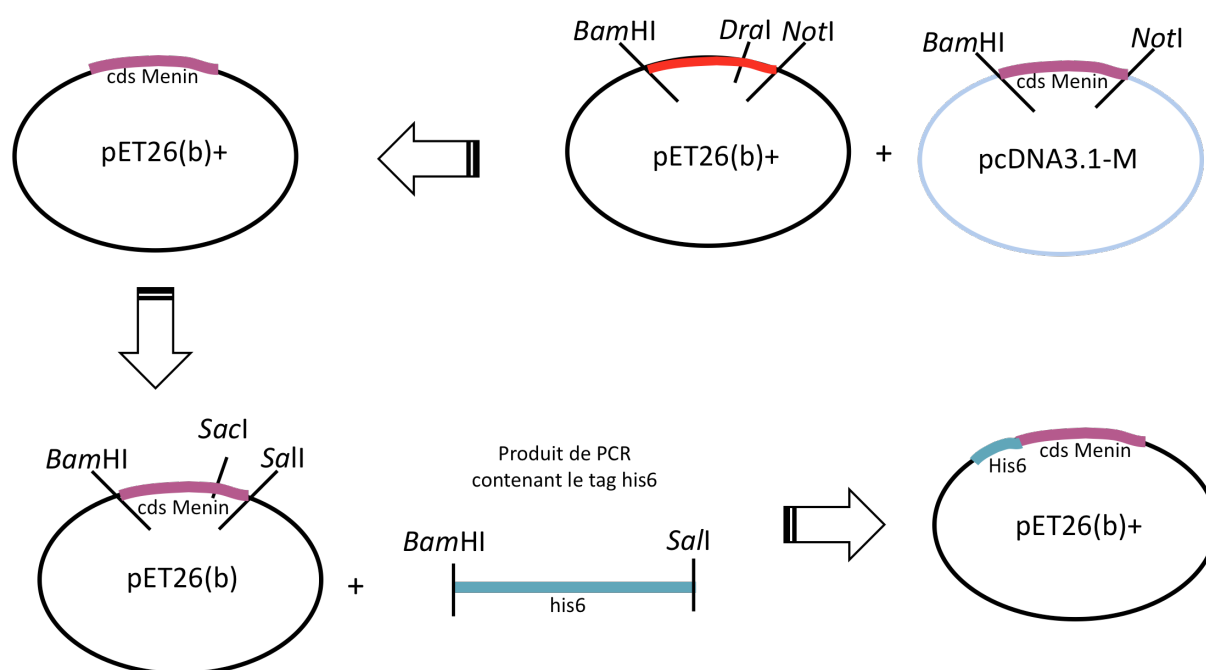


Figure 13. Stratégie de clonage pour préparer le vecteur d'expression pET-His6-Menin, contenant le tag His6 en N-terminal.

Préparation du vecteur pET-Menin

Vecteur

Le plasmide pET26(b)+ (5µg) a été digéré d'abord par les enzymes *Bam*HI et *Not*I et ensuite par *Dra*I, pour éviter une re-ligation après clonage.

Insert

Le plasmide pcDNA3.1-M (5µg) a été digéré par les enzymes *Bam*HI et *Not*I.

Clonage

Une électrophorèse en gel d'agarose à 1.2% permet de déterminer les quantités de vecteur et de fragment de PCR purifiés. Cette estimation permet de calculer le rendement de la purification et de déterminer les volumes à utiliser pour le clonage.

L'insert de 1,8 kb contenant la Menin (pcDNA3.1-M digéré par *Bam*HI et *Not*I) a été cloné avec le vecteur pET26(b)+ de 5,36 kb (digéré par *Bam*HI, *Not*I et *Dra*I) dans un volume total de 21 µl pendant 5 min à température ambiante, en utilisant 50.6ng de vecteur, 47.6 ng pBacM1-H, tampon de dilution 1X q.s.p. 10 µl, tampon de ligation T4 DNA 2X (10 µl) et 5U

de T4 DNA ligase (Roche), selon le kit "Rapid DNA Ligation Kit" (Roche), créant le plasmide pET-Menin. Les réactions de ligation ont été transformées dans des bactéries compétentes *E.coli* (XL-1 Blue, Stratagene) par choc thermique à 42°C, selon les recommandations du fournisseur. Les bactéries ont été, en parallèle, conservées en glycérol à -80°C. Les clones résistants à la kanamycine ont été mis en culture et l'ADN plasmidique a été isolé, en utilisant le kit "Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System" (Promega). Les ADN plasmidiques ont été linéarisés et séparés sur gel d'agarose. Une augmentation de la taille indique une insertion correcte du fragment contenant la Menin dans le vecteur pET26(b)+. Des midipreps ont été réalisées à partir des stocks congelés en glycérol, selon le kit "NucleoBond® Xtra Midi" (Macherey-Nagel), avec l'objectif d'isoler les ADN plasmidiques pour être séquencés. Trois clones positifs ont été séquencés et les résultats confirment l'insertion correcte du fragment contenant la Menin dans le vecteur pET26(b)+.

Préparation du vecteur pET-His6-Menin

Vecteur

Le plasmide pET-Menin a été digéré d'abord par les enzymes *Bam*HI et *Sal*I et ensuite par *Sac*I, pour éviter une re-ligation après clonage.

Insert

Le plasmide pcDNA3.1-Menin a été amplifié par PCR, en utilisant 10ng de pcDNA3.1-Menin, 10 pmol de chaque oligonucléotide (Tableau 3), 2mM dNTP, tampon Pfu 1X et 1U d'enzyme Pfu (Promega), dans un volume total de 50 µl.

Oligonucléotide	Séquence	Localisation
352r	5'- GTGAAGAAGGTCTCCGATGTCATAT	352-376
N-his	5'- GGCTGCATTGCGGATCCGCCACCATGGGGCACCACCACCACCACCATGGGGCTGAAGGC	
	BamHI début His6	1-15

Tableau 3. Oligonucléotides utilisés pour l'amplification de pcDNA3.1-Menin.

La PCR a été réalisée de la façon suivante: dénaturation à 94°C pendant 5 min, ensuite 15 cycles à 94°C pendant 1min, 52°C ou 56°C pendant 30s, 72°C pendant 1min30s, et élongation finale à 72°C pendant 10 min avant de refroidir à 4°C. Les produits de PCR ont été purifiés avec le kit de purification de Promega "Wizard Svel and PCR clean-up system" et ensuite, digérés par les enzymes *Bam*HI et *Sal*I. Les fragments de taille correcte ont été isolés par une électrophorèse en gel d'agarose LMP, en utilisant le kit "QIAquick gel elution kit"

(QIAGEN). Ensuite, l'insert contenant la Menin et l'His6 en N-terminal a été digéré par les enzymes *Bam*HI et *Sal*I.

Clonage

Le fragment de PCR contenant l'His6 en N-terminal a été cloné avec le vecteur pET26-Menin dans un volume total de 21 µl pendant 5 min à température ambiante, en utilisant 50.6ng de vecteur, 47.6 ng pBacM1-H, tampon de dilution 1X q.s.p. 10 µl, tampon de ligation T4 DNA 2X (10 µl) et 5U de T4 DNA ligase (Roche), selon le kit "Rapid DNA Ligation Kit" (Roche), créant le plasmide pET-His6-Menin. Le clonage a été réalisé de façon similaire à la préparation du vecteur pET-Menin (voir pages 58 et 59).

Préparation du vecteur d'expression pET-Menin-His6 (His6 en C-terminal)

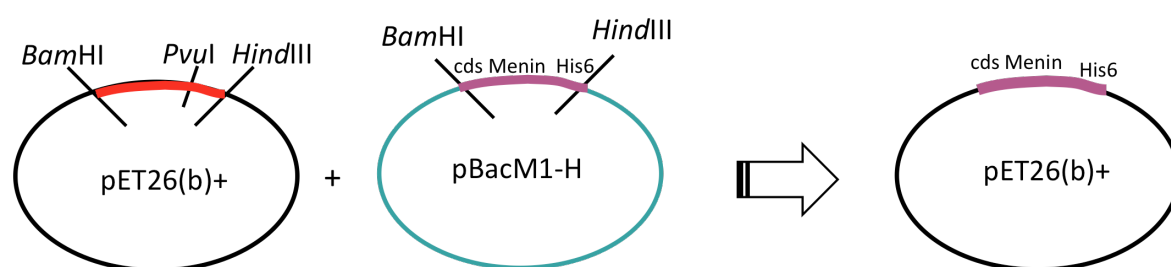


Figure 14. Stratégie de clonage pour préparer le vecteur d'expression pET-Menin-His6, contenant le tag His6 en C-terminal.

Vecteur

Le plasmide pET26(b)+ (5µg) a été digéré d'abord par *Bam*HI et *Hind*III et ensuite par *Pvu*I, pour éviter une re-ligation après clonage.

Insert

Le plasmide pcBacM1-H (5µg) a été digéré par *Bam*HI et *Hind*III.

Clonage

L'insert de 1,8 kb contenant la Menin avec l'His6 en C-terminal (pcDNA3.1-M digéré par *Bam*HI et *Hind*III) a été cloné avec le vecteur pET26(b)+ de 5,36 kb (digéré par *Bam*HI, *Not*I et *Dra*I) dans un volume total de 21 µl pendant 5 min à température ambiante, en utilisant 50.6 ng de vecteur, 47.6 ng pBacM1-H, tampon de dilution 1X q.s.p. 10 µl, tampon de ligation T4 DNA 2X (10 µl) et 5U de T4 DNA ligase (Roche), selon le kit "Rapid DNA Ligation Kit" (Roche), créant le plasmide pET-Menin-His6. Le clonage a été réalisé de façon similaire à la préparation du vecteur pET-Menin (voir pages 58 et 59).

Production et purification de la protéine recombinante

Une pré-culture est réalisée dans du milieu LB contenant 30 µg/ml de kanamycine (Merck) et mise en incubation pendant la nuit à 37°C, sous agitation. Ensuite, celle-ci est ensemencée au 1/10^{ème} avec du milieu complété par la kanamycine et mise en incubation à 37°C, sous agitation. La production de la Menin a été induite par ajout de 1mM d'isopropyl-B-D-thiogalactopyranoside (IPTG) à une densité optique (D.O.) de 0.5 à 600nm. Enfin, 250 µl de culture induite (extrait total) sont prélevés et le reste de la culture est centrifugé pendant 15 min à 5000g. Les culots bactériens ont été congelés à -80°C.

Nous avons utilisé une méthode de purification par affinité, qui repose sur la capacité du nickel à se lier par affinité à un ensemble de molécules d'histidine présentes dans notre vecteur d'expression. Dans notre système, la purification n'est possible qu'en condition dénaturante, en présence de 8M d'urée (Figure 15).

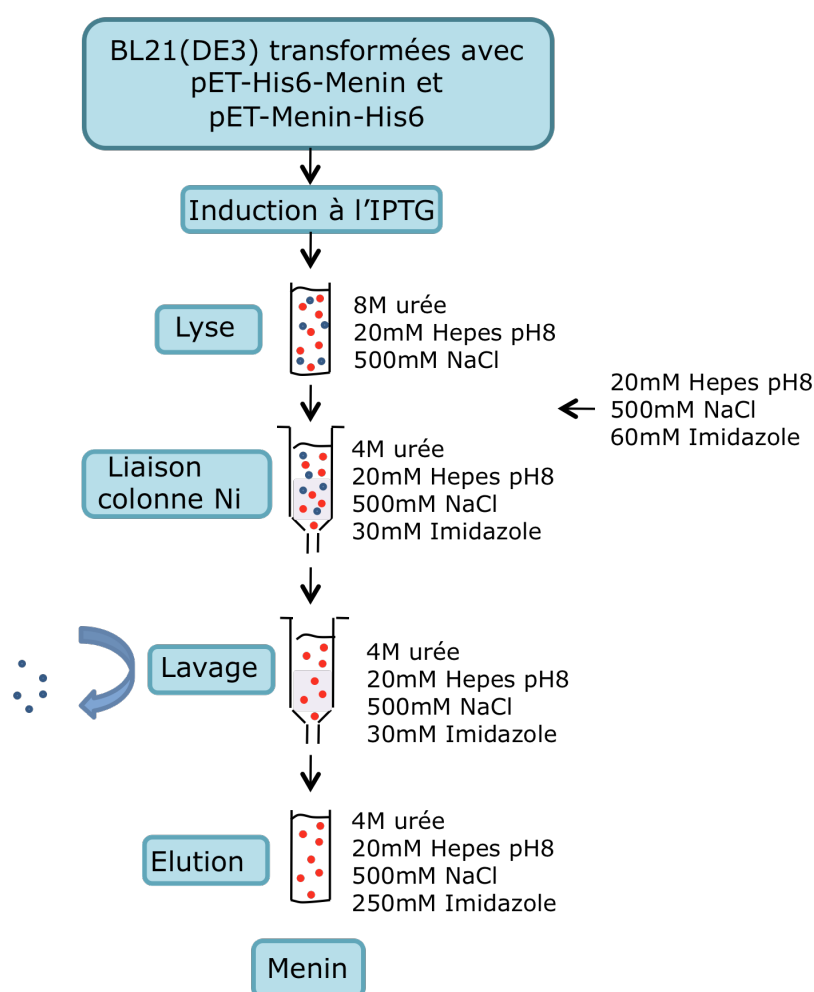


Figure 15. Schéma représentatif de la production et purification de la Menin en *E.coli*.

Le culot bactérien (gardé à -80°C) est repris dans 1 ml de tampon A (8M urée, 20mM Hepes, 500mM NaCl). Le lysat cellulaire est soumis ensuite à une sonication pendant 2 minutes à une amplitude de 40, avec des pulses de 10 secondes (Vibra Cell™, Bioblock Scientific). Ensuite, il est centrifugé pendant 5 min à 13200 rpm et le tampon B (Hepes 20 mM, 500 Mm NaCl, Imidazole 60 mM) est ajouté au surnageant, en réduisant la concentration de l'urée pour permettre la liaison à la colonne.

Ce surnageant représente alors notre lysat total (LT) et est ensuite déposé sur une colonne (Réf 30230 QIAGEN), contenant 1 ml de résine NiNTA (QIAGEN), préalablement équilibrée par le tampon C (4M urée, 20mM Hepes, 500mM NaCl, 30mM Imidazole). La colonne est rincée par 3 fois son volume de tampon C, puis le dépôt est élué par un tampon D (4M urée, 20mM Hepes, 500mM NaCl, 250mM Imidazole).

Deux fractions sont collectées et dialysées dans des boudins cellu-Sep 3500 diamètre 12.1 (Réf T1.19.15 Interchim), séparant les 2 fractions. Cette dialyse est faite dans du PBS stérile 3 x 1 heure à température ambiante sous agitation (600 ml pour 4 boudins de dialyse maximum) et un dernier lavage a été fait ON à 4°C. Deux gels ont été préparés, l'un est coloré au bleu de coomassie et/ou au nitrate d'argent, l'autre est transféré sur une membrane de nitrocellulose pour réaliser une analyse par Western Blot. Les éluats restants sont gardés à 4°C.

Analyse des protéines par électrophorèse en gel d'acrylamide

Voir page 55.

Coloration au bleu de coomassie

Voir page 55.

Western Blot

Voir page 56.

1.3 Production de TAT-Menin en *E.coli*

1.3.1 Matériels

Lignée cellulaire

Les bactéries compétentes *E.coli* BL21(DE3)pLysS contiennent le gène RNA polymérase T7 contrôlé par le promoteur lacUV5 inductible à l'IPTG, ce qui permet une grande expression de protéines recombinantes en systèmes bactériens. Cette souche contient en outre un

plasmide, pLysS, qui porte une résistance au chloramphénicol, code le lysozyme T7, un inhibiteur naturel de la polymérase T7, qui réduit et élimine presque la totalité de l'expression des gènes sous le contrôle du promoteur T7, en absence d'induction par l'IPTG. Le promoteur du lysozyme est un promoteur faible. Lors de l'induction, l'inhibiteur sera en trop faible quantité pour inhiber l'ARN polymérase T7 qui est alors produite en grande quantité.

Vecteurs

Notre vecteur d'expression, pTAT-HA-His6-Menin comporte en 5' un promoteur du type T7 à induction indirecte par l'IPTG, suivi de pTAT (plasmide contenant la séquence TAT qui code pour un peptide de 12 KDa, nécessaire pour une transduction efficace de protéines à travers la membrane plasmique); HA (épitope antigénique); His6 (permettant une chromatographie d'affinité sur colonnes de Nickel, mais pouvant être aussi utilisé comme épitope antigénique); la Menin et le gène de résistance à l'ampicilline.

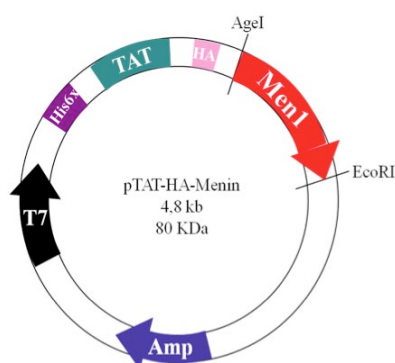


Figure 16. Vecteur d'expression pTAT-HA-His6-Menin.

1.3.2 Méthodes

L'expression de la TAT-Menin a été réalisée au laboratoire grâce à l'expertise de Fabrice Gouilleux dans la production de protéines TAT, selon Becker-Hapak and Dowdy (Becker-Hapak and Dowdy, 2003). Cette protéine génétiquement modifiée a la capacité de franchir la membrane cytoplasmique et de transformer la cellule réceptrice sans qu'il soit besoin de la transfecter avec un vecteur ADN. Ce système d'expression permet aussi d'étudier d'éventuelles modifications post-traductionnelles, comme par exemple, phosphorylation, méthylation, acétylation, ubiquitinylation. La première étape consiste à produire la protéine chez la bactérie *E.coli*, en utilisant le vecteur d'expression pTAT-HA-His6-Menin.

Production et purification de la protéine recombinante

Les bactéries compétentes utilisées, BL21(DE3)pLysS, sont transformées avec le plasmide pTAT-HA-Menin. 1/10^{ème} d'une préculture réalisée ON dans du milieu LB estensemencé et complémenté par de 50 µg/ml d'ampicilline et 34 µg/ml de chloramphénicol (Calbiochem®) dans un volume final de 20ml. La production et la purification de la TAT-Menin suivent la même procédure que celle utilisé pour la production de Menin en *E.coli* (Figure 15), bien que les cellules compétentes utilisées sont différentes, BL21(DE3)pLysS.

Production et purification des mutants de TAT-Menin

L'objectif est de produire des mutants de TAT-Menin. Nous avons choisi d'analyser deux mutations différentes : une mutation dans le codon n°418, qui introduit un codon STOP et une mutation dans le nucléotide n°1384, qui entraîne une perte d'un acide aminé (glutamate). Pour cela, nous avons préparé les vecteurs d'expression pTAT-HA-His6-Menin mut 418 et pTAT-HA-His6-Menin mut 1384.

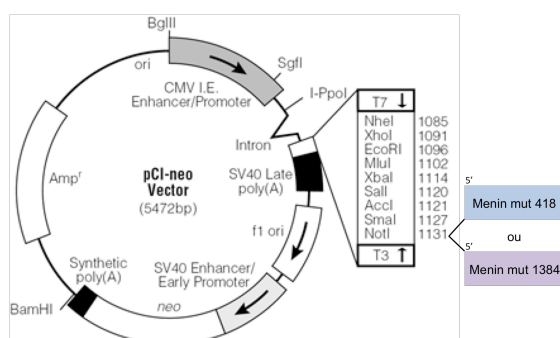


Figure 17. Plasmide pCIneo-Menin.

Le vecteur d'expression pTAT-HA-His6-Menin (Figure 16) et les plasmides pCI Menin mut 418 et pCI Menin mut 1384 (Wautot *et al.*, 2000) (Figure 17) ont été digérés par les enzymes de restriction *AccI* et *XmaI*. Après purification sur gel LMP agar, les respectifs fragments ont été clonés dans le vecteur.

Les plasmides sont ensuite transformés dans des bactéries compétentes BL21(DE3)pLysS par electroporation (choc électrique de 5 ms sous une tension de 2,5 kv, programme EC2 du MicropulserTM, Bio-Rad). Les bactéries ont été cultivées pendant 1h à 37°C dans du milieu SOC, puis étalées sur LB gélosé, contenant ampicilline 50 µg/ml et chloramphénicol 34 µg/ml.

A partir des clones obtenus, l'ADN plasmidique est isolé en utilisant un kit Promega "Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System", puis séquencé en parallèle. Un stock en glycérol a été conservé à -80°C.

La production et la purification des mutants de TAT-Menin suivent la même procédure que celle utilisée pour la production de TAT-Menin sauvage (voir page 64).

Détermination de la quantité de TAT-Menin nécessaire pour transduire les cellules LCT10 (MenI^{-/-})

Différentes quantités de TAT-Menin ont été introduites dans des cellules LCT10 (cellules de Leydig MenI^{-/-}) et des extraits totaux ont été analysés par Western Blot, en utilisant un anticorps anti-Menin (M23Cr). Des cellules LM8 (MenI^{+/+}) ont été utilisées pour comparer le niveau d'expression de Menin endogène avec celui de la TAT-Menin.

Les cellules LCT10 et LM8 sont cultivées dans un milieu Optimem à 37°C sous 5% CO₂. A confluence, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS et détachées par la trypsine puis comptées. Ensuite, 300.000 cellules sont mises dans chaque puits d'une boîte à 6 puits.

Différentes quantités de TAT-Menin purifiée sont introduites dans les cellules LCT10 : 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 et 2 µg.

Après 12h d'incubation à 30°C, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS, lysées avec du tampon de charge SDS1X + 50mM DTT (tampon de charge 2X dilué avec du tampon de resuspension 10mM Tris HCl pH 7.6, 0.1M NaCl, 1mM EDTA pH8.0) puis incubées à 95°C pendant 5 minutes. Les résultats ont été analysés par Western Blot.

Détermination de la stabilité de la TAT-Menin après introduction dans les cellules LCT10 (cellules de Leydig MenI^{-/-})

Une cinétique de disparition de la TAT-Menin dans les cellules LCT10 a été réalisée à différents temps. En parallèle, nous avons traité des cellules U2OS, SAOS et H1299 avec 10 µg/ml de cycloheximide (Sigma) à différents temps, pour déterminer la demi-vie de la Menin, par blocage de la traduction, en normalisant les valeurs avec la protéine actine (Abcam).

Les cellules ont été ensuite lysées avec du tampon SDS1X contenant 50mM DTT, récupérées et incubées à 95°C pendant 5 minutes. Les résultats ont été analysés par Western Blot.

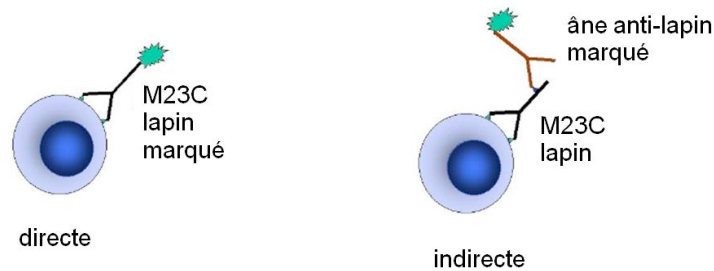
Localisation de la TAT-Menin par immunofluorescence (IF)

Figure 18. Schéma représentatif des deux techniques différentes d'immunofluorescence.

Deux techniques différentes ont été réalisées : immunofluorescence directe et immunofluorescence indirecte, qui utilisent des anticorps spécifiques contre Menin.

IF directe

Les cellules LCT10 (*Men1^{-/-}*) sont préparées en milieu Optimem et mises dans des boîtes à 6 puits. Ensuite, elles sont transduites avec la TAT-Menin et 12h après, sont lavées avec du PBS. L'anticorps M23C (de lapin), directement marqué par le kit "DyLight™ 594 Microscale Antibody Labeling Kit #53045 (Thermo Scientific)", est incubé avec les cellules pendant 2h à température ambiante, dans le noir.

IF indirecte

Les cellules LCT10 (300.000 cellules/mL) sont préparées dans des boîtes à 6 puits sur des lamelles de verre et ensuite, transduites avec la TAT-Menin pendant 12h. Après trois lavages de 5 minutes dans le PBS, les cellules sont fixées par 2 méthodes différentes: incubation pendant 2 minutes avec un mélange méthanol-acétone (50:50) ou pendant 15 minutes avec du paraformaldéhyde 3%. Après trois lavages de 5 minutes dans le PBS, les sites non spécifiques sont saturés par incubation pendant une heure à température ambiante avec une solution de saturation (BSA 2% (p/v) diluée dans le PBS). Les cellules sont ensuite incubées ON à 4°C avec l'anticorps primaire M23C (lapin) dilué dans une solution de BSA 2 % (p/v) / PBS. Le lendemain, les cellules sont lavées trois fois 5 minutes dans le PBS, et incubées pendant une heure à température ambiante, dans le noir, avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorophore "Anti-Rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment Alexa® Fluor 647 Conjugate #4414 (Cell Signaling Technology, Inc.)". Après trois lavages dans le PBS, les lamelles contenant les cellules sont montées sur des lames de verre à l'aide de "Antifade Kit for Microscopy (FluoProbes®)" ou du milieu de montage "Shandon Immu-Mount™ Aqueous Non-

fluorescing Mounting Medium (Thermo Scientific)". La fluorescence émise est ensuite analysée au microscope à fluorescence (Nikon, type 108).

Analyse des protéines par électrophorèse en gel d'acrylamide

Voir page 55.

Coloration au bleu de coomassie

Voir page 55.

Western Blot

Voir page 56.

2 Isoformes et Modifications post-traductionnelles de la Menin

2.1 Isoformes

2.1.1 Matériels

Lignée Cellulaire	Type Cellulaire	Espèce
BON-1	Lignée établie à partir d'un adénocarcinome du pancréas endocrine	Homme
CGTHW-1	Lignée établie à partir d'un carcinome du sein	Homme
H1299	Lignée établie à partir d'une tumeur du poumon	Homme
HEK-293	Lignée établie à partir de cellules de rein d'un embryon humain transformées avec un adénovirus	Homme
HL60	Lignée établie à partir d'une leucémie promyelocytaire	Homme
Hela	Lignée établie à partir d'un carcinome cervical	Homme
MCF7	Lignée établie à partir d'un adénocarcinome du sein	Homme
Saos-2	Lignée établie à partir d'un ostéosarcome	Homme
ZR75-1	Lignée établie à partir d'un carcinome du sein	Homme
LCT10	Lignée établie à partir d'une tumeur de Leydig (<i>Men1</i> ^{-/-})	Murine
LM1	Lignée établie à partir de LCT10, où la séquence codante de la Menin humaine a été introduite (<i>Men1</i> ^{+/+})	Murine
CER2+	Lignée établie à partir de LCT10, où <i>Men1</i> est exprimé (Cre-ER ^{Tm+} <i>Men1</i> ^{f/f})	Murine
CER2-	Lignée établie à partir de LCT10, où <i>Men1</i> n'est pas exprimé (Cre-ER ^{Tm-} <i>Men1</i> ^{f/f})	Murine

Tableau 4. Lignées cellulaires utilisées pour l'étude sur les isoformes de Menin.

2.1.2 Méthodes

Extraits totaux

Des extraits totaux ont été faits pour 15 lignées cellulaires différentes. Des cellules ont été préparées dans des boîtes à 6 puits dans du milieu Optimem. A confluence, les cellules sont lavées trois fois avec du PBS, lysées avec du tampon SDS1X contenant 50mM DTT puis incubées à 95°C pendant 5 minutes, pour une analyse Western Blot sur gel d'acrylamide 8%.

Extraits cytoplasmiques et nucléaires

Des extraits cytoplasmiques et nucléaires ont été faits sur des cellules HL60, une lignée cellulaire établie à partir d'une leucémie promyélocytique.

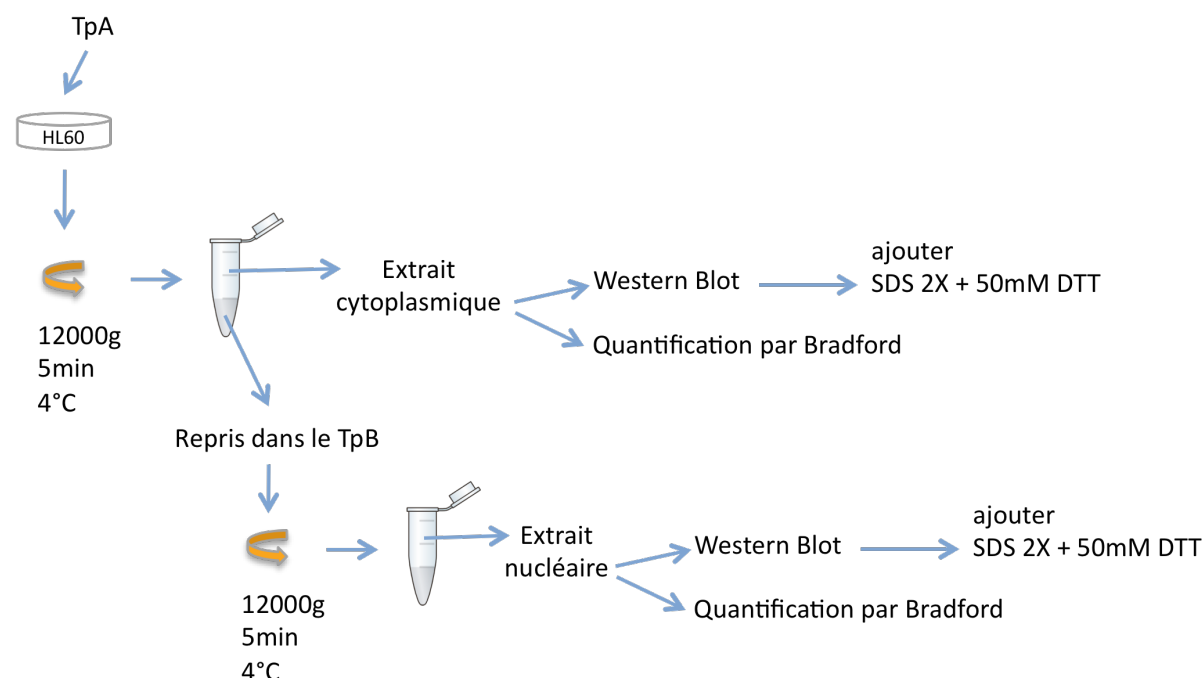


Figure 19. Schéma représentatif de l'extraction cytoplasmique et nucléaire. TpA: 10mM Hepes pH 7.9 ; 1mM DTT ; 1mM MgCl₂ ; 1mM PMSF ; inhibiteur de phosphatases 1X ; inhibiteur de protéases 1X (Complete, Roche). TpB : 20mM Hepes pH 7.9 ; 0,2mM KCl ; 1mM EDTA ; 1mM MgCl₂ ; 1mM PMSF ; inhibiteur de phosphatases 1X ; inhibiteur de protéases 1X (Complete, Roche).

Nous avons préparé 2 boîtes de petri, contenant 3 millions de cellules chacune. A confluence, les cellules sont maintenues dans les boîtes de petri sur glace et ensuite lavées trois fois avec du PBS froid et un dernier lavage avec du PBS, contenant des inhibiteurs: 100mM NaF, 200mM Na₃VO₄ et 200mM PMSF. Pour chaque boîte de pétri, 600µl de tampon A [10mM Hepes pH 7.9; 1mM DTT; 1mM MgCl₂; 1mM PMSF; inhibiteur de phosphatases 1X (à partir

d'une solution à 20X contenant 6.25mM NaF, 12.5mM β -Glycerolphosphate, 12.5mM PNPP et 1.25mM Na_3VO_4); inhibiteur de protéase 1X (à partir d'une solution à 25X, Complete Roche without EDTA)] sont additionnés et incubés en chambre froide pendant 10 min.

Après l'ajout de NP40 et mise des boîtes sous agitation pendant 20 min, les cellules sont grattées, et centrifugées à une vitesse de 12000g, pendant 5 min à 4°C. Deux aliquots de 50 μ l de surnageant ont été préparés (dans du tampon SDS 2X contenant 50mM DTT et mis à 95°C pendant 5 min) : un pour une analyse Western Blot sur gel d'acrylamide 8% et l'autre pour une détermination de la concentration de protéine par la technique de Bradford. Ensuite, le précipitat est ressuspendu dans 30 μ l de tampon B [20mM Hepes pH 7.9; 0,2mM KCl; 1mM EDTA; 1mM MgCl_2 ; 1mM PMSF; inhibiteur de phosphatases 1X; inhibiteur de protéase 1X, vortexé et laissé en chambre froide pendant 30 min sous agitation. Après centrifugation à une vitesse de 12000g, pendant 5 min à 4°C, le surnageant est récupéré, constituant notre extrait nucléaire. Similairement aux extraits cytoplasmiques, deux aliquots de 10 μ l de surnageant ont été préparés : un pour une analyse Western Blot et l'autre pour une détermination de la concentration de protéine par la technique de Bradford. Des aliquots de 30 μ l sont stockés à -80°C.

Pour l'analyse Western Blot, trois anticorps (Bethyl Laboratories, Inc) ont été utilisés pour caractériser la Menin présente dans les fractions cytoplasmiques et nucléaires: A300-114A, dirigé contre les résidus 275 à 325 de la Menin, A300-115A contre les résidus 500 à 550 et A300-105A dirigé contre les 35 aminoacides carboxy terminaux de la protéine.

2.2 Modifications post-traductionnelles de la Menin

2.2.1 Matériels

Lignées cellulaires

Pour étudier les modifications post-traductionnelles de la Menin, nous avons utilisé la lignée cellulaire LCT10 après transduction de la TAT-Menin (Tableau 4).

2.2.2 Méthodes

Ubiquitination

Des cellules LCT10 ont été préparées dans des boîtes à 6 puits (2ml par puits, dans du milieu Optimem) et transduites avec la TAT-Menin sauvage et les mutants (déjà purifiés par chromatographie d'affinité, en utilisant une colonne contenant 1ml de résine NiNTA) pendant 12h. Après trois lavages des cellules avec du PBS, une extraction a été faite, en utilisant 350 µl de Tampon IP à 50mM Tris pH 8, 200mM KCl, 0.5% NP40, contenant des inhibiteurs : Inhibiteur protéases (Complete Roche without EDTA), inhibiteur phosphatase (6.25mM NaF, 12.5mM β-Glycerolphosphate, 12.5mM PNPP, 1.25mM Na₃VO₄), 1mM PMSF et 1mM β-mercaptoéthanol. Les échantillons ont été incubés pendant 30min dans la glace et ensuite centrifugés à une vitesse de 12000g pendant 15min à 4°C. Le lysat cellulaire est incubé avec une résine NiNTA, pendant 5 min. Après centrifugation, le culot est repris avec du tampon SDS1X (100 µl) pendant 5 min à 95°C, centrifugé et le surnageant est récupéré et déposé sur un gel de polyacrylamide. Les contrôles sont préparés de la même façon, mais à partir de la fraction total obtenue lors de la purification par affinité, c'est à dire, toutes les protéines qui ne se lient pas à la colonne NiNTA.

Les résultats sont analysés par Western Blot, en utilisant un anticorps anti-ubiquitine à une dilution de 1/5000 (Anti-Ubiquitin Antibody NB300-130 Lot L1, Novus Biologicals).

3 Interaction Menin-p53

3.1 Matériels

Lignée Cellulaire	Type Cellulaire	Espèce
SAOS	Lignée établie à partir d'un ostéosarcome	Homme
U2OS	Lignée établie à partir d'un ostéosarcome	Homme

Tableau 5. Lignées cellulaires utilisées pour l'étude sur l'interaction entre Menin et p53.

3.2 Méthodes

La Figure 20 montre un schéma représentatif de la procédure d'immunoprécipitation qui a permis d'étudier l'interaction Menin-p53.

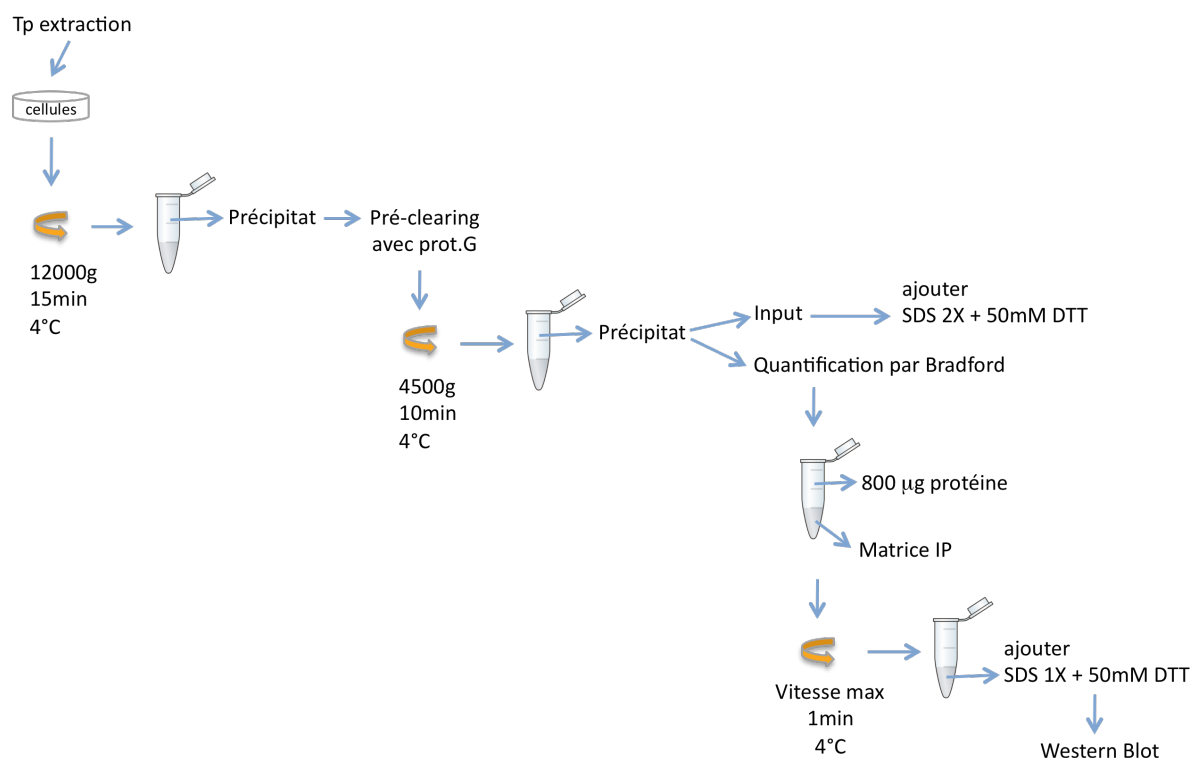


Figure 20. Schéma représentatif de l'immunoprécipitation. Tp extraction: 10mM Hepes pH 7.9 ; 1mM DTT ; 1mM MgCl₂ ; 1mM PMSF ; inhibiteur de phosphatases 1X ; inhibiteur de protéases 1X (Complete, Roche). Matrice IP (40µl Goat Exactacruz A Rabbit IP Matrix + 3µl Anticorps anti-Menin M23C + 500µl PBS); Western Blot avec Anticorps anti-p53 DOI (Santa Cruz Biotechnology).

4 Rôle de Menin sur RB

4.1 Matériels

4.1.1 Lignées cellulaires

Lignée Cellulaire	Type Cellulaire	Espèce
H1299	Lignée établie à partir d'une tumeur du poumon	Homme
M3-7	Lignée dérivée de H1299, contenant un promoteur inductible à la tétracycline, permettant d'inhiber l'expression du gène <i>MEN1</i>	Homme
M2-6	Lignée dérivée de H1299, contenant un promoteur inductible à la tétracycline, permettant d'inhiber l'expression du gène <i>MEN1</i>	Homme
U2OS	Lignée établie à partir d'un ostéosarcome	Homme
LCT10	Lignée établie à partir d'une tumeur de Leydig (<i>Men1^{-/-}</i>)	Murine
LM8	Lignée établie à partir de LCT10, où la séquence codante de la Menin humaine a été introduite (<i>Men1^{+/+}</i>)	Murine

Tableau 6. Lignées cellulaires utilisées pour l'étude du rôle de Menin sur RB.

Les cellules U2OS ont été cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) contenant 10% de SVF et les autres cellules (H1299, M3-7, M2-6, LCT10 et LM8), dans du milieu Optimem (Invitrogen), contenant aussi 10% de SVF.

4.1.2 Anticorps utilisés pour les analyses par Western Blot.

Anticorps primaires anti:	caracteristiques	Bandes attendues vers
Menin (M23C) (dirigé contre les résidus aminés 588-610 de la Menin humaine) (Invitrogen)	anticorps polyclonal de lapin	68 KDa
Rb total ("Rb Antibody Sampler Kit" – Cell Signaling Technology, Inc.)	anticorps polyclonal de souris	110 KDa

Anticorps secondaires anti:	caracteristiques
Lapin (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	anticorps polyclonal d'âne
Souris (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	anticorps polyclonal d'âne

Tableau 7. Les différents anticorps utilisés pour les analyses par Western Blot.

4.1.3 siRNA utilisés pour la transfection des cellules U2OS.

SiRNA	Sequences and characteristics
M1 (Eurogentec)	AGCUCACCUUCCAGCCCAGdTdT - target from 164 th base of Menin ORF we expect a high suppression
MC4 (Eurogentec)	ACCCUGACCUUCCAGCCGACdTdT - Negatif control of M1 specificity, sequence identical to M1 with a few mutated nucleotides who involve mismatches We expect no suppression
All Stars Negative Control (QIAGEN)	- A mix of siRNA without homologies with some mammalian genes (sequences no provided) ; Negatif control and control of transfection effect (used as a reference) We expect no suppression

Tableau 8. Les différents siRNA utilisés pour transfecter les cellules U2OS.

4.1.4 Oligonucléotides utilisés pour la qRT-PCR.

Primers (Eurogentec)	Sequence
RNA 18S (551 pb) forward	CGGCTACCACATCCAAGGAA
RNA 18S (737 pb) reverse	GCTGGAATTACCGCGGCT
<i>MEN1</i> (890 pb) forward	CCCACTCACCTCTACCACA
<i>MEN1</i> reverse	GGGTAGATGTGTTCATCCAG
<i>RB1</i> (1730 pb) forward	ACCACCGAGAAGGACCAACT
<i>RB1</i> (1907 pb) reverse	AAGGCTGAGGTTGCTTGTGT

Tableau 9. Oligonucléotides utilisés pour l'analyse qRT-PCR.

4.2 Méthodes

SiRNA contre Menin par transfection des cellules U2OS

Pour supprimer la protéine Menin, on utilise la technique de siRNA, qui se base sur de petits ARN interférents complémentaires à l'ARNm cible dont on veut éteindre l'expression. Par leur complémentarité de séquences, ils se fixent sur le transcrit et entraînent sa destruction. Cette technique induit une suppression de l'expression entre 24 à 96h si le niveau protéique est proportionnel au niveau transcriptionnel.

Les cellules U2OS sont lavées deux fois au PBS puis trypsinisées. Elles sont ensuite transfectées en suspension par les siRNA grâce à un agent chimique, l'ICAFectine 442 (In-Cell-Art) en suivant le protocole du fabricant (ICAFectine ®442: Reagent for siRNA transfection in primary and stem cells, Transfection of suspension cells; In-Cell-Art). Le protocole préconise d'utiliser les siRNA à une concentration de 500nM, or des études menées préalablement dans l'équipe ont montrées qu'une concentration de 10 nM suffisaient à induire une suppression. Pour observer l'effet de la suppression de Menin sur RB, l'expérience de siRNA a été réalisée avec les siRNA suivants: M1, All Stars Negative et MC4. Les échantillons sont notés M1, ca et MC. Cependant, dans le but d'optimiser la suppression par le siRNA, une autre expérience a été faite, par la suite, en réalisant une première transfection avec les SiRNA à 10 nM, puis en faisant 24h après, une seconde transfection selon le même protocole que la première. Les différents siRNA utilisés pour transfecter les cellules U2OS sont présentés dans le Tableau 8.

Les cellules ont été lavées trois fois avec du PBS, 48h après transfection de siRNA et lysées avec du tampon SDS1X + 50mM DTT et mises ensuite à 95°C pendant 5 minutes, pour une analyse par Western Blot.

SiRNA contre Menin par traitement des cellules M3-7 et M2-6 avec doxycycline

Les cellules M3-7 and M2-6 sont dérivées de la lignée cellulaire H1299, et elles contiennent un gène codant un siRNA dirigé contre *MEN1* sous le contrôle d'un promoteur inductible à la tétracycline. Ainsi, dans ces cellules, on peut inhiber l'expression du gène *MEN1* par la doxycycline, un analogue de la tétracycline. La lignée cellulaire H1299 a été utilisée comme contrôle négatif.

Ces lignées cellulaires ont été cultivées dans des boîtes à 6 puits (100,000 cells) et synchronisées en G0 par enlèvement du SVF. Ensuite, elles ont été traitées ou pas avec doxycycline 1 µM pour 48h. Le redémarrage du cycle cellulaire a lieu après l'ajout de SVF 10% à différents temps (0, 6h, 12h, 24h and 48h), de façon à "simuler" les phases du cycle cellulaire, notamment la phase G1. Cette expérience a été aussi faite sur les cellules LCT10 (*Men1*^{-/-}) et les cellules LM8 (*Men1*^{+/+}). Les différentes lignées cellulaires ont été lavées trois fois avec du PBS, lysées dans du tampon SDS1X + 50mM DTT et mises ensuite à 95°C pendant 5 minutes, pour une analyse par Western Blot.

Western Blot

Les extraits protéiques totaux sont analysés par Western Blot (voir protocole dans le paragraphe 1.1.2.4.3 de ce chapitre Matériel et Méthodes), en utilisant un anticorps primaire dirigé contre Menin ou la protéine RB total diluée au 1/2000 puis un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire dilué au 1/2000 aussi (Tableau 7). La révélation se fait par luminescence en utilisant le kit ECL Advance Western Blotting Detection et un système d'analyse de la luminescence, LAS 4000 (Fujifilm). La membrane a été une première fois marquée par l'anticorps anti-Menin M23C (68kDa) puis par l'anticorps anti-Rb total (110 KDa).

qRT-PCR Analysis

Les cellules U2OS, cultivées dans des boîtes à 6 puits ont été lavées au PBS 1X, 48h après la transfection de siRNA. Les ARN totaux ont été extraits et purifiés selon le kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel).

La suppression de Menin et son effet sur la transcription du gène *RBI* sont testés par qRT-PCR (Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). Cette technique permet d'étudier quantitativement le niveau transcriptionnel de *MEN1* et du gène *RBI*. La reverse transcription a été faite selon le kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis. On a ainsi obtenu 1µg de cDNA dilué dans un volume de 50µL pour chaque échantillon. Ces cDNA ont ensuite été amplifiés et quantifiés par qPCR en utilisant le réactif MESA Green qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay (Eurogentec) à une concentration finale de 1X et un mélange d'amorces for et reverse spécifiques du gène à amplifier, utilisé à une concentration finale de 200nM. Les amorces utilisées pour la qPCR sont présentées dans le Tableau 9. Le volume réactionnel de chaque puits de la plaque de qPCR a été ajusté à 15µL par l'ajout d'eau DEPC pour parvenir à un volume final de 20µL après l'ajout de 5µL d'ADNc à une certaine dilution. La gamme d'étalonnage a été réalisée à partir de quatre dilutions de l'échantillon NT, chaque point de la gamme étant répété trois fois. Tandis que chaque échantillon à tester a été déposé quatre fois.

La qPCR a été faite sur un thermocycleur MJ Mini™ avec le système Opticon™ Real-Time. On a normalisé par l'ARN18S en utilisant, pour la gamme d'étalonnage, les dilutions 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000 et la dilution 1/1000 pour les échantillons et en suivant le programme PCR suivant: une première incubation de 3 minutes à 94°C, puis 40 cycles commençant par la dénaturation en incubant 30 secondes à 94°C, puis l'hybridation à 55°C pendant 15 secondes, puis en finissant par l'étape d'élongation à 72 °C pendant 30 secondes et enfin, la lecture de la plaque. Les PCR avec les amorces *MEN1* et *RBI* ont été réalisées avec les dilutions 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 pour la gamme d'étalonnage et la dilution 1/100 pour les échantillons en suivant le même protocole PCR que pour l'ARN 18S tout en adaptant les températures d'hybridation des amorces utilisées: 55°C pour *MEN1* et 58°C pour *RBI*.

Résultats et Discussion

Les résultats obtenus au cours de ma thèse seront présentés et discutés en quatre parties:

1. Production et purification de la Menin recombinante

1.1 Système eucaryote en cellules S2 de drosophile

1.2 Système procaryote dans *E.coli*

1.3 TAT-Menin (*E.coli*)

2. Données structurales de la Menin

2.1 Demi-vie et localisation de la Menin

2.2 Isoformes de la Menin

2.3 La monoubiquitination, possible Modification Post-Traductionnelle de la Menin

3. Interaction Menin-p53

4. Rôle de Menin sur RB

4.1 Publication

4.2 Bilan des résultats

1 Production et purification de la Menin

Un progrès important dans la connaissance de la Menin a été de montrer qu'elle est un régulateur de la transcription, de la prolifération cellulaire, de l'apoptose, et de la stabilité du génome, par des interactions avec d'autres protéines. Par contre, il y a peu d'information concernant la structure de la Menin et ses activités biochimiques. A ce moment, nous savons que la Menin est phosphorylée sur trois sites différents et des logiciels de prédiction de structure secondaire de la Menin ont montré qu'elle posséderait au moins 15 hélices- α . Par contre, il y a une certaine désorganisation sur quelques acides aminés en N-terminal, et surtout dans le dernier tiers de la protéine, correspondant à la partie C-terminal.

C'est pour cela qu'un de nos objectifs était de produire la Menin en grande quantité pour réaliser une étude structurale de la Menin en collaboration avec l'IBS à Grenoble, dans le cadre du GDR2906. En parallèle, cette production pourrait nous permettre de produire, et donc de disposer d'anticorps efficaces et bien caractérisés reconnaissant un ensemble d'épitopes peptidiques ainsi que des motifs conformationnels de la protéine pour étudier la présence et la diversité de la Menin dans les différents tissus. En effet, les anticorps dont nous disposons aujourd'hui sont dirigés contre quelques peptides et ne nous donnent accès ni à l'ensemble des domaines de la protéine, ni à la manière dont elle est structurée.

Pour pouvoir explorer la relation entre fonction et structure de la Menin, nous avons décidé de produire cette protéine dans trois systèmes différents: un système eucaryote en cellules S2 de drosophile, un système procaryote dans *E.coli* et en alternative, la production de TAT-Menin dans *E.coli*.

1.1 Système eucaryote en cellules S2 de drosophile

Pour caractériser la structure et les domaines fonctionnels de la Menin, nous avons décidé de produire la Menin dans un système eucaryote (cellules S2 de *Drosophila melanogaster*). Pour cela, nous avons fait une co-transfection par la technique de calcium phosphate, une sélection par blasticidine et ensuite une induction par des métaux lourds divalents, comme le CuSO_4 et le ZnCl_2 . Cette induction permet la production de la Menin qui est sécrétée dans le milieu,

grâce à la présence d'une séquence BiPSS présente dans notre vecteur d'expression. L'intérêt d'avoir une protéine secrétée dans le milieu est lié au fait qu'on puisse obtenir une grande quantité de protéine soluble et avec un certain degré de pureté.

Les résultats sont obtenus par Western Blot, en utilisant un anticorps anti-Menin M23C reconnaissant les 23 acides aminés C-terminaux de la protéine. Différentes conditions ont été essayées: temps de transfection, temps d'induction, métaux lourds utilisés et milieu de culture supplémenté ou non de SVF. La Menin est produite comme une protéine de fusion contenant la fraction Fc d'une immunoglobuline. Elle a une taille d'environ 100 KDa.

La Figure 21 montre l'expression de Menin dans les cellules S2 en différentes conditions, notamment absence ou présence de SVF et absence ou présence d'induction au CuSO₄.

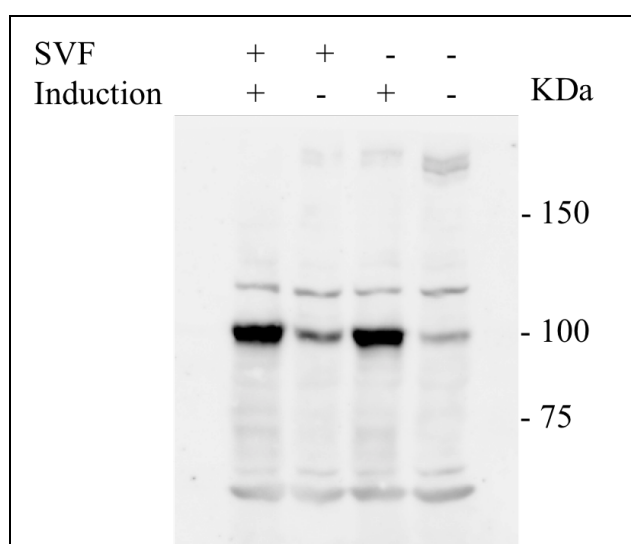


Figure 21. Expression de Menin dans les cellules S2. Ici, la condition la plus favorable a été obtenue après 5h de transfection et une induction pendant 48h, en utilisant 1mM de CuSO₄.

Les résultats montrent qu'il y a une forte induction après ajout de 1mM de CuSO₄ dans les cellules S2. Par contre, ce qu'on cherche c'est de produire la Menin dans un système qui permet sa sécrétion dans le milieu et ainsi, produire de la Menin en grandes quantités et avec un certain degré de pureté.

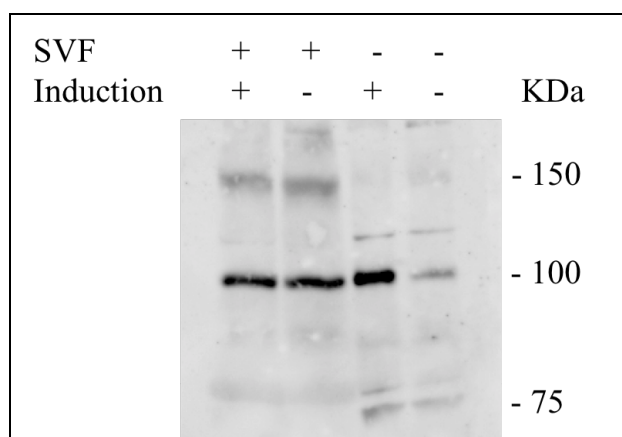


Figure 22. Expression de Menin sécrétée dans le milieu. Ici, la condition la plus favorable a été obtenue après 5h de transfection et une induction pendant 48h, en utilisant 1mM de CuSO_4 et du milieu Schneider sans SVF.

La protéine de fusion, Menin-Ig, est produite et sécrétée en partie, dans le milieu S2, en absence de SVF et après 48h d'induction avec 1mM de CuSO_4 . Cependant, il y a une grande partie de la protéine qui n'est pas sécrétée dans le milieu et reste alors dans les cellules S2. Après production, nous avons choisi deux méthodes différentes de purification par affinité.

1.1.1 Purification par colonne d'affinité nickel-agarose

Cette purification repose sur la capacité des 6 résidus d'histidine (présentes dans la protéine de fusion) à se lier au nickel. Les résultats ont été obtenus par coloration des gels d'acrylamide au bleu de Coomassie et au nitrate d'argent, pour détecter la pureté, mais aussi par Western Blot, pour détecter la présence de la protéine de fusion, en utilisant un anticorps anti-Menin, M23C.

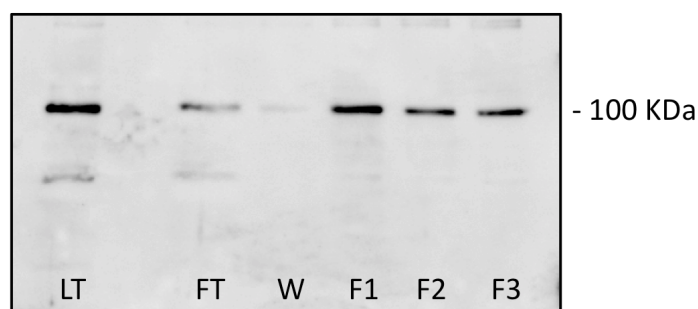


Figure 23. Expression de Menin purifiée par une colonne nickel-agarose. Analyse Western Blot des fractions contenant le lysat total (LT), la fraction totale qui n'est pas liée à la résine (FT), le contrôle après lavages (W) et les fractions éluées (F1, F2 et F3).

Nous avons réussi à produire la protéine de fusion, Menin-Ig. Par contre, il a été impossible de produire des grandes quantités de Menin, car on la détecte pas après une coloration des gels d'acrylamide au bleu de Coomassie.

1.1.2 Purification par affinité avec la protéine G agarose

Cette purification repose sur la capacité de l'immunoglobuline (présente dans la protéine de fusion) se lier à la protéine G agarose.

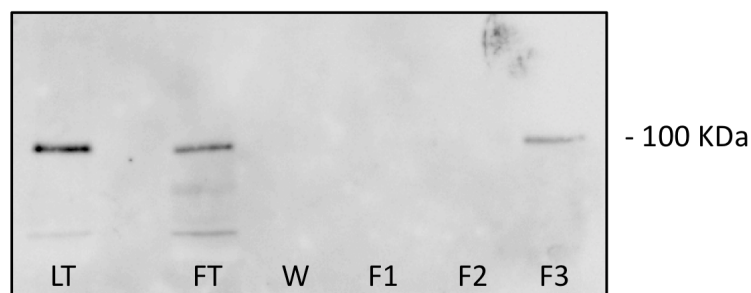


Figure 24. Expression de Menin purifiée par la protéine G agarose. Analyse Western Blot des fractions contenant le lysat total (LT), la fraction totale qui n'est pas liée à la résine (FT), le contrôle après lavages (W) et les fractions éluées (F1, F2 et F3).

Similairement à la purification par la colonne d'affinité nickel-agarose, nous n'avons pas réussi à produire de la Menin en grande quantité.

Ce système de purification par protéine G a été optimisé, en utilisant une concentration initiale de NaCl de 300mM, au lieu de 150mM. Les lavages ont été faites avec un tampon phosphate de sodium à pH 7, 5.0 et 3.5. L'élution a été faite à pH 3,5 et 2,7 (Glycine.HCl) et 4 fractions de 500 µl ont été collectées et analysées par Western Blot, en utilisant un anticorps anti-Menin, M23C.

A partir de ces trois fractions éluées à pH 2,7, nous allons tester l'action de la protéase "PreScission" (GE Healthcare), qui est une protéine de fusion de glutathione S-transferase (GST) et protéase type 1403C de rhinovirus humain (HRV). Cette protéase a une taille de 46 KDa et reconnaît la séquence Leu-Phe-Gln/Gly-Pro, en clivant entre les résidus Gln et Gly et en permettant ainsi de cliver entre notre protéine d'intérêt, la Menin et la partie Fc de l'immunoglobuline. La Menin est ensuite isolé par une résine Protino® Glutathione Agarose 4B (Macherey-Nagel). Les résultats ont été obtenus par Western Blot, en utilisant un anticorps anti-Menin M23C.

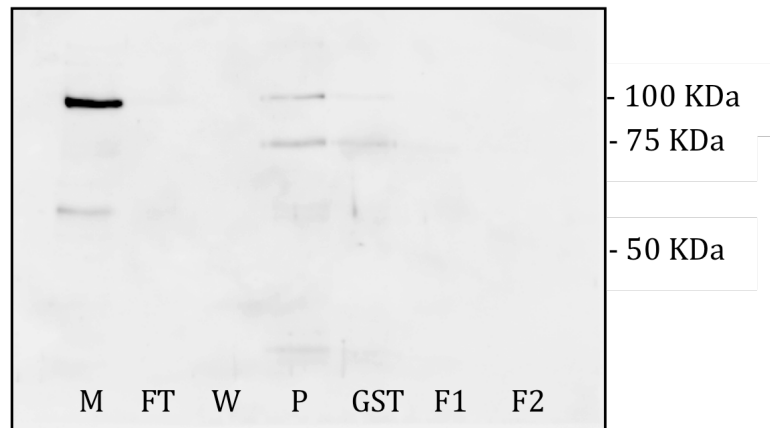


Figure 25. Expression de Menin purifiée après coupure par la protéase spécifique. Analyse Western Blot des fractions contenant la Menin purifiée (M), la fraction totale qui n'est pas liée à la résine (FT), le contrôle après lavages (W), control après clivage de la protéine de fusion avec la protéase spécifique (P), contrôle après incubation avec une résine GST (GST), fractions éluées (F1 et F2).

La protéine de fusion Menin-Ig n'a pas été spécifiquement clivée. Comme alternative, nous avons essayé de purifier la Menin avec des billes magnétiques contenant une protéine recombinante AG qui permet la purification des Ig (Bio-Adembeads PAG 04630, Ademtech), selon les recommandations du fournisseur et ensuite, la cliver par la protéase spécifique.

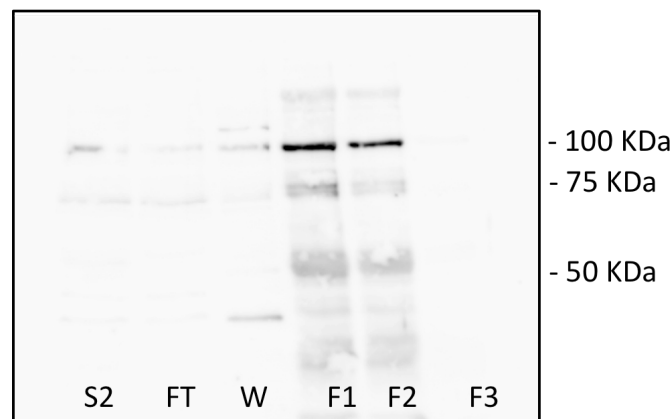


Figure 26. Expression de Menin purifiée par les billes magnétiques. Analyse Western Blot des fractions contenant la Menin sécrétée dans le milieu S2 (S2), la fraction total qui n'est pas liée aux billes (FT), le contrôle après lavages (W), et les fractions éluées (F1, F2 et F3).

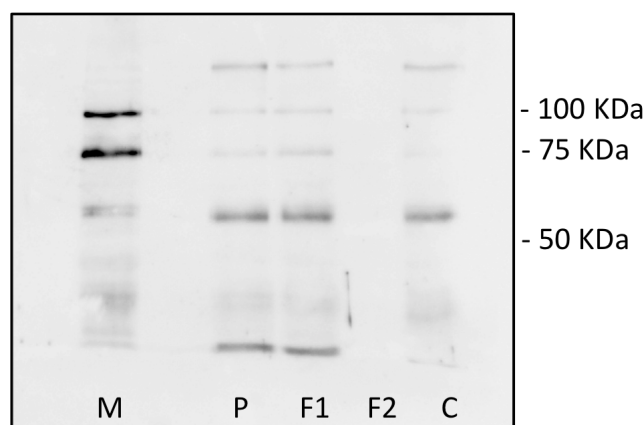


Figure 27. Expression de Menin purifiée après coupure par la protéase spécifique. Analyse Western Blot des fractions contenant la Menin purifiée par les billes magnétiques (M), le contrôle après coupure avec la protéase spécifique (P), les fractions éluées après incubation avec la résine GST (F1 et F2), et le culot cellulaire (C).

La protéine de fusion Menin-Ig n'a pas été spécifiquement clivée et la Menin s'est liée à la résine GST.

Tous ces résultats montrent la possibilité de produire la protéine de fusion Menin-Ig dans les cellules S2 de drosophile. Nous avons essayé une purification par chromatographie d'affinité, en utilisant une résine nickel, et aussi la protéine G, qui permet une stratégie alternative de purification, mais celles-ci n'ont pas été optimales. En conclusion, il n'a pas été possible d'obtenir de clones stables exprimant des quantités importantes de protéine.

Par ailleurs, Valle et ses collaborateurs (2001) ont réussi à cloner et exprimer la Menin humaine dans les cellules S2 de *Drosophila melanogaster*. Pour cela, ils ont utilisé des fermenteurs de 10 l. Ils ont ainsi pu obtenir une purification de 1mg de protéine par litre de culture. Ce rendement est faible, comparé aux niveaux d'expression d'autres protéines humaines en *E.coli*. La Menin exprimée dans ce système est soluble et intracellulaire (Valle *et al.*, 2001).

Un système d'expression de protéines en baculovirus a été utilisé par Koen Dreijerink (thèse de Koen Dreikerink, 2009), pour obtenir une grande quantité de protéine recombinante pour des expériences biochimiques. Une infection des cellules Sf9 par un baculovirus contenant le cDNA de Menin suivi du protocole de purification en trois étapes (colonne d'affinité NiNTA,

colonne d'échange anionique MonoQHR et colonne d'exclusion Superdex) a permis une production d'environ 100 mg de Menin purifiée. La protéine purifiée a été analysée par spectrométrie de masse et le poids moléculaire coïncide avec le poids prédit par la séquence. Cependant, ils n'ont pas pu obtenir des cristaux de Menin pour une analyse par diffraction de rayons X.

1.2 Système procaryote dans *E.coli*

Afin de poursuivre l'objectif qui était de réaliser une étude structurale de la Menin, nous avons exploré un système d'expression procaryote en *E.coli*.

Nous avons donc construit un vecteur bactérien permettant d'exprimer de grandes quantités de Menin possédant 6 résidus d'histidine en position soit N-terminal, soit C-terminal. Après production de la Menin en *E.coli* et purification par une résine d'affinité NiNTA, les résultats ont été analysés par Western Blot, pour détecter la présence de Menin, en utilisant un anticorps anti-Menin M23C et par coloration d'un gel d'acrylamide au bleu de Coomassie, pour déterminer la pureté de la protéine.

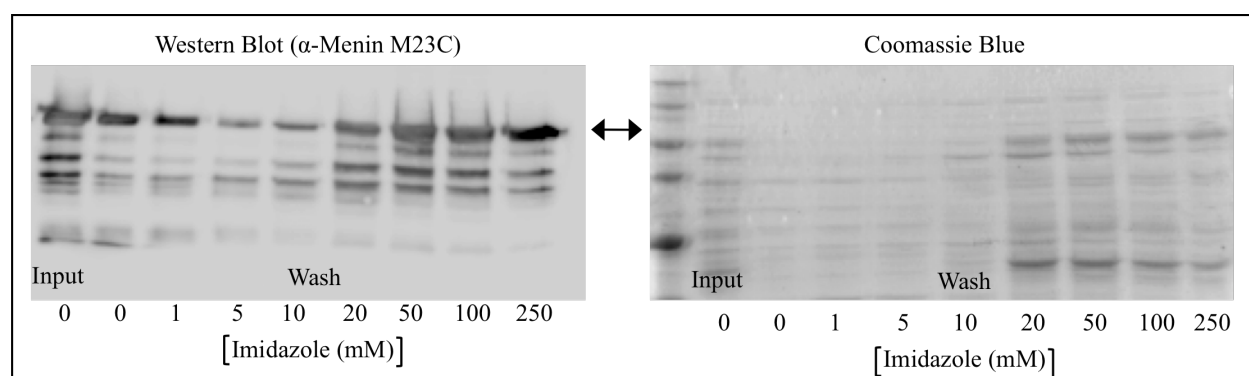


Figure 28. Expression de Menin chez *E.coli*. Analyse SDS-Page et Western Blot à partir de 4 ml de culture bactérienne. L'élution a été faite à différentes concentrations d'imidazole. Cette figure montre les résultats obtenus pour le vecteur d'expression contenant His6 en N-terminal.

Il est possible de produire de la Menin possédant 6 résidus d'histidine en position soit N-terminal, soit C-terminal, malgré la présence de fragments de dégradation, qui existent également avec le vecteur d'expression contenant His6 en C-terminal. Ce résultat ne nous permet pas de réaliser notre étude structurale. Une alternative à cette procédure est la production de TAT-Menin dans *E.coli*.

1.3 TAT-Menin (*E.coli*)

L'adjonction d'un peptide TAT, provenant du génome de HIV, à une protéine lui permet de franchir la membrane cytoplasmique d'une cellule réceptrice et d'étudier son comportement dans la cellule sans qu'il soit besoin de la transfecter avec un vecteur ADN. Cette stratégie permet ainsi de limiter un stress génotoxique qui se produit lors de la transfection d'ADN dans une cellule.

La lyse bactérienne a été réalisée en conditions dénaturantes en 8M urée, et le lysat total a été déposé sur une colonne, contenant une résine nickel, préalablement équilibrée. Les fractions éluées sont ensuite dialysées contre du PBS stérile. Une coloration au bleu de Coomassie d'un gel d'acrylamide 7% a permis de calculer la quantité de TAT-Menin produite, mais aussi de vérifier la pureté de la protéine, comme le montre la figure ci-dessous. Après purification, nous avons obtenu $\approx 40 \mu\text{g/ml}$ de TAT-Menin produite en *E.coli*.

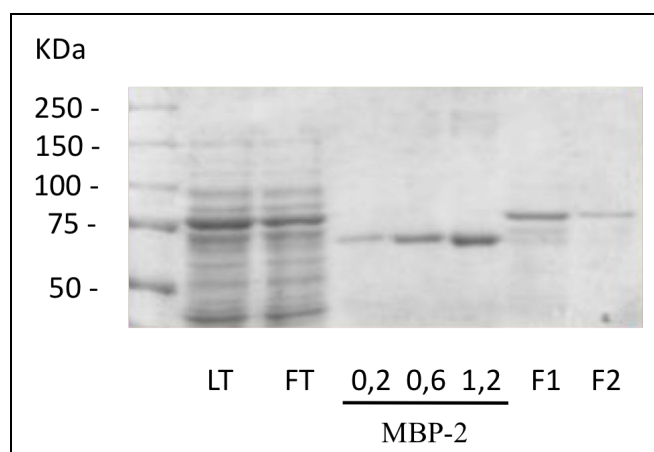


Figure 29. Expression de la protéine Menin chez *E.coli*. Analyse SDS-page des fractions insolubles resolubilisées dans l'urée 8M (LT), contrôle après liaison à la colonne de nickel (FT), gamme de MBP-2 pour quantifier la TAT-Menin produite (0,2 ; 0,6 et 1,2 μg), et les fractions éluées (F1 et F2).

1.3.1 Détermination de la quantité de TAT-Menin à transduire dans les cellules LCT10

Nous avons déterminé la concentration de TAT-Menin purifiée à transduire dans des cellules de tumeur de Leydig *MenI*^{-/-} (LCT10) pour obtenir le même niveau d'expression de Menin endogène présente dans les cellules LM8 (lignée dérivée de LCT10, dans laquelle l'expression de Menin a été restituée sur un niveau physiologique). Les résultats sont obtenus par Western Blot, en utilisant un anticorps anti-Menin.

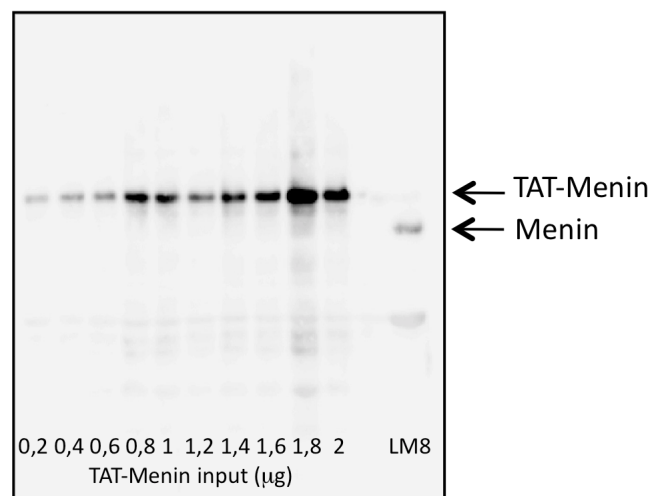


Figure 30. Expression de Menin dans les cellules LCT10 (*MenI*^{-/-}) contenant différentes quantités de TAT-Menin, extraites à 24h après transduction. La lignée cellulaire LM8 (*MenI*^{+/+}) donne le niveau d'expression de la Menin endogène.

Nous avons observé que la quantité de TAT-Menin nécessaire pour atteindre le même niveau d'expression que la Menin endogène est de 0,6-1,2 μ g dans 50,000 cellules à une confluence de 50%, et à 24h après transduction. Mais il est peu vraisemblable que cette quantité totale (comparée ici à la quantité de Menin présente dans une cellule de souris *MenI*^{+/+}, LM8) reflète celle de Menin nucléaire fonctionnelle, puisque la protéine qui est mise au contact des cellules est dénaturée en urée et qu'elle doit se renaturer lors – et après son passage au travers de la membrane cytoplasmique.

1.3.2 Mutants de TAT-Menin

Nous disposons de la TAT-Menin sauvage, mais aussi des mutants, notamment une TAT-Menin tronqué (dans le codon n°418) et une TAT-Menin avec une perte d'un acide aminé glutamate (dans le nucléotide n°1384), pour explorer les possibles modifications post-traductionnelles (comme par exemple phosphorylation, méthylation, acétylation et ubiquitination).

L'objectif est de produire et purifier des mutants de TAT-Menin : pTAT-HA-His6-Menin mut 418, qui introduit un codon STOP dans le codon n°418 et pTAT-HA-His6-Menin mut 1384, qui entraîne une perte d'un acide aminé glutamate dans le nucléotide n°1384. Ces deux mutations ont été trouvées chez des patients NEM1.

Le deux TAT-Menin mutantes et la protéine TAT-HA (contrôle négatif) ont été produites et purifiées de façon similaire à la TAT-Menin sauvage. Une coloration au bleu de Coomassie d'un gel de polyacrylamide a permis de vérifier la pureté de la protéine, comme le montre la figure ci-dessous. Une gamme de MBP-2 a été utilisée pour quantifier les protéines produites.

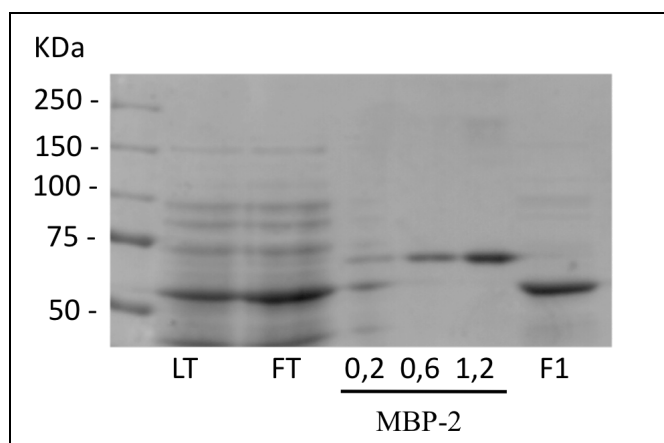


Figure 31. Expression de la protéine TAT-Menin mut 418 chez *E.coli*. Analyse SDS-page des fractions insolubles resolubilisées dans l'urée 8M (LT), control après liaison à la colonne de nickel (FT), Fraction éluée (F1), gamme de MBP-2 pour quantifier la TAT-Menin mut 418 produite (0.2 ; 0,6 et 1,2 µg).

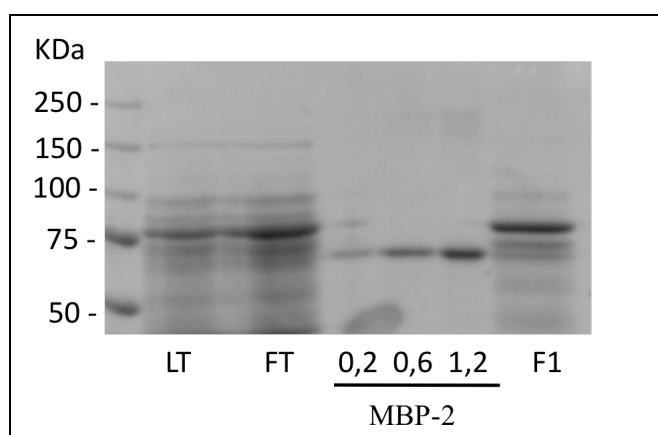


Figure 32. Expression de la protéine TAT-Menin mut 1384 chez *E.coli*. Analyse SDS-page des fractions insolubles resolubilisées dans l'urée 8M (LT), control après liaison à la colonne de nickel (FT), Fraction éluee (F1), gamme de MBP-2 pour quantifier la TAT-Menin mut 1384 produite (0,2 ; 0,6 et 1,2 µg).

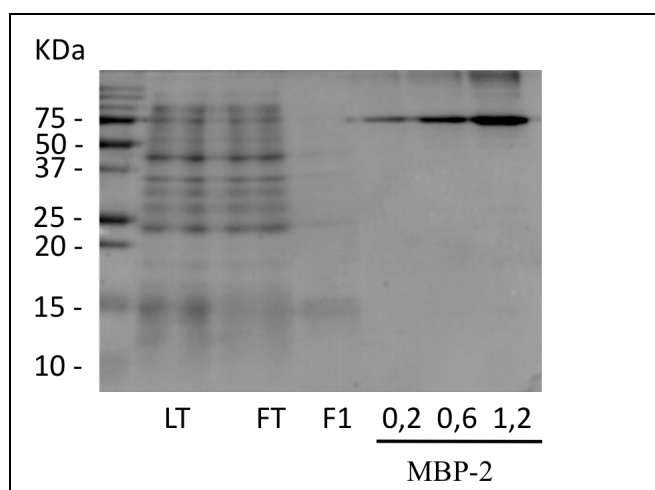


Figure 33. Expression de la protéine TAT-HA chez *E.coli*. Analyse SDS-page des fractions insolubles resolubilisées dans l'urée 8M (LT), control après liaison à la colonne de nickel (FT), Fraction éluee (F1), gamme de MBP-2 pour quantifier la protéine TAT-HA produite (0,2 ; 0,6 et 1,2 µg).

Ces TAT-Menin mutantes ont servi à réaliser des expériences d'ubiquitination.

2 Données structurales de la Menin

2.1 Demi-vie et localisation de la Menin

D'abord, nous avons étudié la stabilité de la TAT-Menin après introduction dans des cellules de souris dépourvues de Menin (LCT10). Les résultats sont obtenus par Western Blot, en utilisant un anticorps anti-Menin.

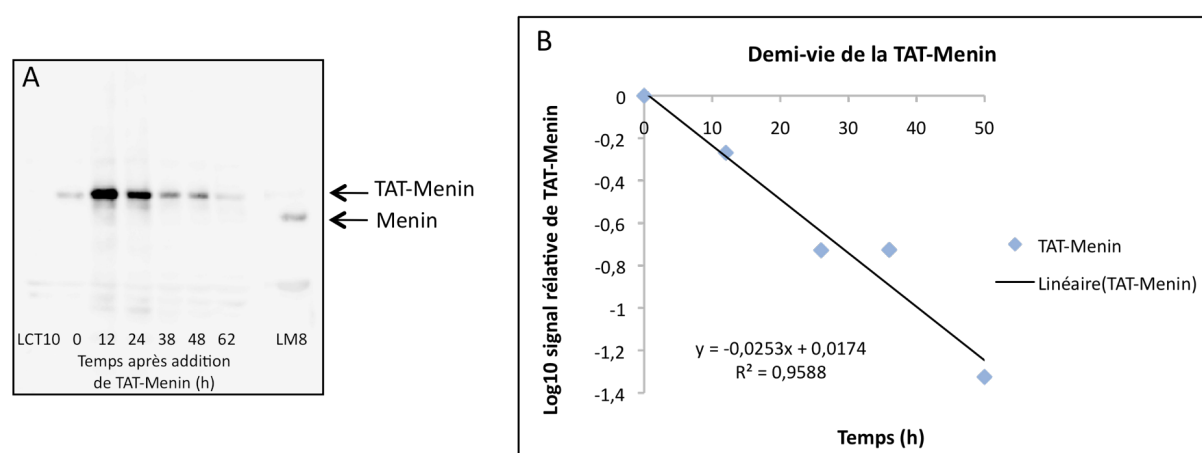


Figure 34. Etude de la stabilité de la TAT-Menin dans les LCT10 (*Men1*^{-/-}). **A.** Western Blot sur des extraits totaux repris avec du SDS1X, après 0h, 12h, 24h, 38h, 48h et 62h de transduction. La lignée cellulaire LM8 (*Men1*^{+/+}) donne le niveau d'expression de la Menin endogène. **B.** Calcul du temps de demi-vie de la TAT-Menin par quantification des Western Blot, contre une coloration au rouge ponceau.

Après 24h, il y a une diminution significative de la quantité de Menin dans les cellules. Entre 38h et 48h, l'intensité du signal est proche de la Menin endogène. En tenant en compte la quantification du Western Blot, nous avons observé que le temps de demi-vie de la TAT-Menin est d'à peu près 12h.

Ensuite, nous avons voulu évaluer le temps de demi-vie de la Menin endogène dans les lignées cellulaires U2OS, SAOS et H1299, par une analyse par Western Blot sur des extraits totaux repris dans du SDS1X, après différents temps de traitement avec 10 µg/ml de cycloheximide, permettant le blocage de la traduction.

De façon reproductible, il semble que la Menin aie un temps de demi-vie d'un peu près 25h dans les cellules U2OS. Dans les cellules dépourvues de p53 (SAOS), nous avons observé que le temps de demi-vie varie d'un peu près 50h à 100h. Une autre lignée cellulaire p53^{-/-} (H1299) donne un peu près les mêmes valeurs que ceux obtenus avec les SAOS. Ce traitement avec la cycloheximide nous a posé quelques problèmes pour évaluer correctement les temps de demi-vie. Effectivement, après un certains temps, les cellules sont affectées par ce traitement, qui finit par être létale.

Nous avons donc observé que la Menin endogène présente dans les cellules U2OS est beaucoup plus stable que la TAT-Menin que nous avons transduit dans les cellules *Men1^{-/-}* (LCT10). Et d'un autre côté, il semble que la Menin est beaucoup plus stable dans les deux lignées cellulaires dépourvues de p53 (SAOS et H1299).

Selon la méthode utilisée pour calculer le temps de demi-vie, nous pouvons trouver différentes valeurs dans la littérature. Yaguchi et ses collaborateurs ont montré des valeurs de l'ordre de 6 à 8h dans les cellules HEK293, sur base de la technique de pulse-chase (Yaguchi *et al.*, 2004). Selon Ikeo et ses collaborateurs, les temps de demi-vie de la Menin seraient de 10h et 24h dans les cellules COS sur base de cycloheximide et actinomycine, respectivement (Ikeo *et al.*, 1999).

Une autre question importante concerne la localisation de la Menin. Pour déterminer la cinétique de migration de TAT-Menin entre noyau et cytoplasme, nous avons choisi l'immunofluorescence. Deux différentes techniques ont été réalisées : immunofluorescence directe et immunofluorescence indirecte, qui utilisent des anticorps spécifiques contre Menin.

Une expérience obtenue par immunofluorescence indirecte, est présentée ci-dessous.

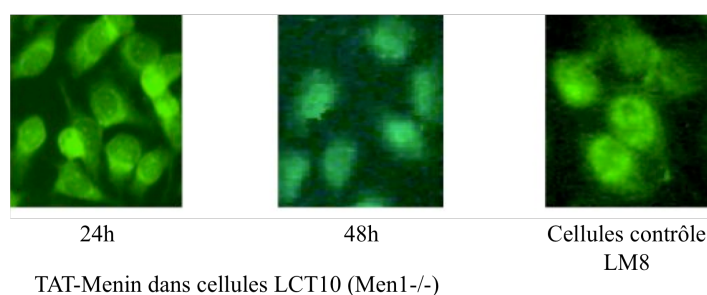


Figure 35. Cinétique de migration de la TAT-Menin vers le noyau par immunofluorescence.

Il semble que la majorité de la TAT-Menin présente dans les cellules après 24 h soit plutôt cytoplasmique, alors qu'après 48 h, malgré la faiblesse du signal, la protéine est présente au moins en partie dans le noyau.

Lors de l'analyse par Western Blot d'extraits totaux de cellules LCT10 transduites avec la TAT-Menin purifiée, nous avons observé un polypeptide grande taille de 100 KDa. Dans la fraction purifiée de TAT-Menin, cette bande n'était pas présente.

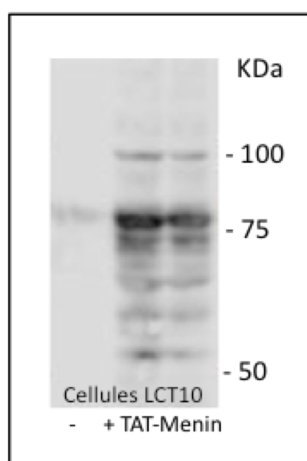


Figure 36. Analyse Western Blot d'extraits totaux de protéines sur les cellules LCT10, contenant ou pas la TAT-Menin purifiée. La protéine de fusion a une taille de ≈ 80 KDa et a été reconnue par un anticorps anti-Menin M23Cr.

Par ailleurs, une expérience d'ARN interférence dans des cellules H1299 (p53-/-), utilisant un ARN contre Menin, a montré aussi ce polypeptide de grande taille une bande qui est peut être une isoforme de Menin.

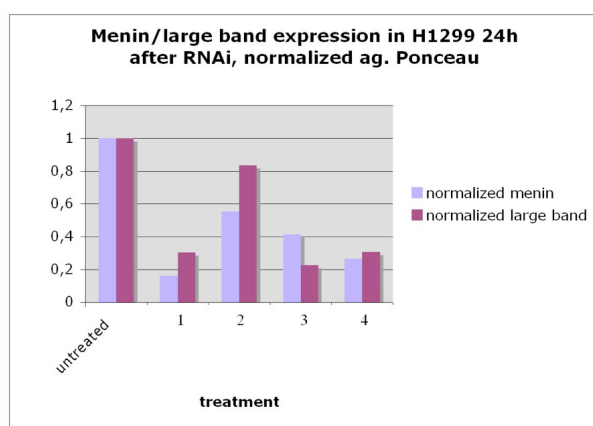


Figure 37. Analyse Western Blot d'une expérience de RNAi contre Menin (24h) dans les cellules H1299 (p53-/-).

Ces résultats montrent que lorsque la Menin    68 KDa est supprimée, le polypeptide de grande taille est aussi supprimé. La question se pose de savoir ce qu'est cette bande à 100 KDa ? Une isoforme ? Une modification post-traductionnelle ?

2.2 Isoformes de la Menin

Nous avons analysé différentes lignées cellulaires par Western Blot, en utilisant un anticorps anti-Menin, M23C.

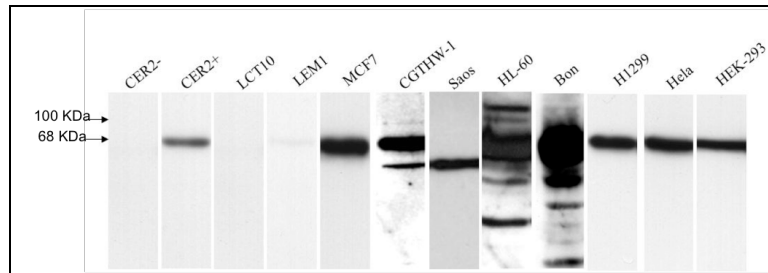


Figure 38. Analyse de différentes lignées cellulaires par Western Blot. La Menin a une taille de 68 KDa. Les résultats montrent une bande additionnelle à 100 KDa dans certaines lignées cellulaires.

Une bande additionnelle de 100 KDa a été trouvée dans les extraits totaux des cellules Bon-1, CGTHW-1 et HL-60.

Nous avons cherché si cette bande est toujours présente en différentes conditions, notamment le milieu de culture utilisé, la confluence des cellules et l'induction de stress génotoxique.

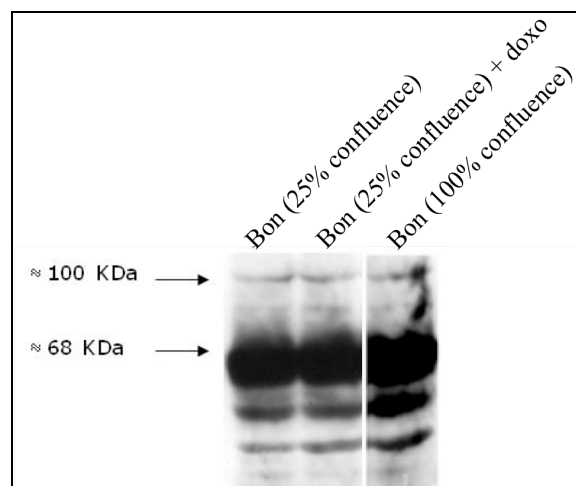


Figure 39. Analyse de la lignée cellulaire Bon-1 par Western Blot, en conditions d'arrêt de croissance des cellules induction d'un stress génotoxique par l'addition de doxorubicine.

Les résultats montrent que l'arrêt de croissance des cellules ou l'induction d'un stress génotoxique par la doxorubicine n'a aucun effet sur l'expression de Menin. Nous avons observé aussi que le milieu de culture ne joue aucun rôle non plus.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à caractériser la Menin présente dans les fractions cytoplasmiques (EC) et nucléaires (EN) de la lignée cellulaire HL-60.

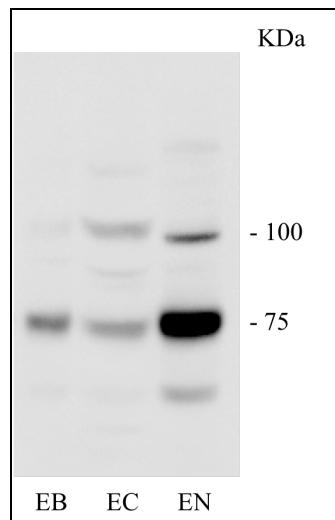


Figure 40. Analyse Western Blot sur des extraits nucléaires et cytoplasmiques de la lignée.

Nous pouvons observer que l'anticorps anti-Menin M23C est capable de révéler des isoformes de taille supérieure, surtout présentes dans le cytoplasme de ces cellules.

Tous ces résultats sont originaux et inédits et donc intéressants à explorer. Nous ne savons pas encore ce qu'est cette bande et s'il s'agit vraiment d'une isoforme de la Menin. Par ailleurs, le "European Consortium on MEN1" a décrit l'existence d'un transcrit *MEN1* de 4,2 kb. La question se pose donc de savoir si la Menin de plus grande taille apparente pourrait être une isoforme codée par ce transcrit additionnel. Nous avons tenté de découvrir des exons supplémentaires du gène *MEN1*. Etant donné la structure de ce gène, nous les avons cherché en 5' de l'exon 2. Mais cette région est très riche en séquences répétées de type LINE/Alu, ce qui peut sans doute expliquer notre insuccès. Une autre possibilité pour expliquer la présence de ce polypeptide de grande taille serait l'existence de modifications post-traductionnelles de la Menin.

2.3 La monoubiquitination, possible Modification Post-Traductionnelle de la Menin

Les résultats obtenus lors de l'étude des isoformes de Menin indiquent fortement que cette protéine peut être modifiée. Les propriétés migratoires de la Menin en électrophorèse en conditions dénaturantes sont suggestives d'une modification de type ubiquitination ou sumoylation (migration en barreaux d'échelle). Cette observation a été faite aussi bien sur la Menin endogène (LM8) que sur une protéine génétiquement modifiée dans la bactérie pour pouvoir être introduite, en tant que protéine, dans des cellules dépourvues de Menin endogène (LCT10 + TAT-Menin). La nature exacte et les conditions d'apparition de cette bande à 100 KDa devront être précisées. Il reste qu'en conditions normales de croissance, la plupart des cellules humaines que nous avons étudiées présentent une bande de 100 kDa qui est vraisemblablement un résultat particulier de cette modification et, si l'on en croit les résultats que nous avons obtenus sur la lignée cellulaire leucémique HL60, qu'elle soit caractéristique de la Menin présente dans le cytoplasme. La question demeure de savoir si cette bande à 100 KDa a une signification fonctionnelle.

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle d'une protéine par la liaison covalente d'un ou plusieurs monomères d'ubiquitine. L'ubiquitine est une protéine régulatrice de petite taille (76 a.a. et masse moléculaire de 8,5 KDa) bien conservée au cours de l'évolution, et qui est exprimée de façon ubiquiste chez les eucaryotes. L'ubiquitine humaine et celle de la levure ont une identité de séquence de 96%. Ubiquitination contrôle aussi la stabilité, fonction, et localisation intracellulaire d'une grande variété de protéines.

2.3.1 Ubiquitination

Les TAT-Menin purifiées (sauvage et mutantes) et les fractions totales (c'est à dire, toutes les protéines qui ne lient pas à la résine nickel-agarose lors de la purification et qui constituent les contrôles négatifs) ont été introduites dans des cellules LCT10. Ensuite, les cellules LCT10 contenant les TAT-Menin (sauvage et mutantes) ou les fractions totales ont été extraites avec un tampon approprié (voir Matériel et Méthodes, paragraphe 2.2.2.1) et les lysats cellulaires ont été purifiés par une résine nickel. Les résultats sont obtenus par Western Blot, en utilisant des anticorps anti-Menin et anti-Ubiquitine.

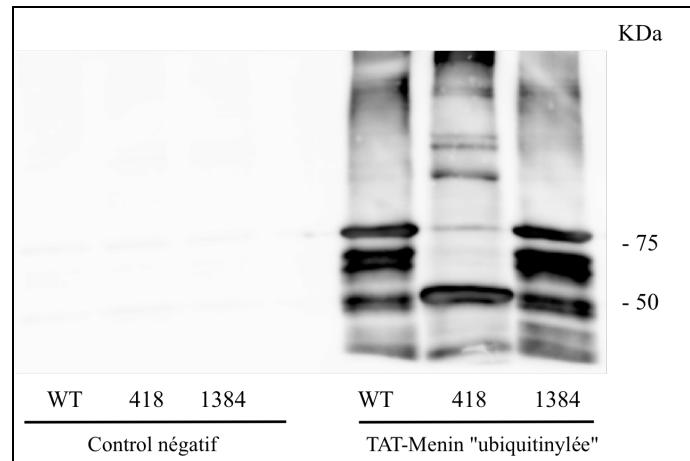


Figure 41. Expression de Menin dans les cellules LCT10 contenant la TAT-Menin sauvage et les TAT-Menin mutantes, 418 et 1384. Analyses SDS-PAGE des fractions contenant la TAT-Menin sauvage (WT), la TAT-Menin mutante dans le codon n°418, qui entraîne un codon STOP (418) ; et la TAT-Menin mutante dans le nucléotide n°1384, qui entraîne une perte d'un acide aminé glutamate (1384).

Nous observons la TAT-Menin sauvage (WT) et la TAT-Menin mutante 1384 à la taille attendue, c'est à dire, un peu près 80 KDa. La TAT-Menin mutante 418 est une protéine tronquée et donc, nous observons une bande à un peu près 50 KDa, ce qui est aussi en accord avec l'hypothèse.

Les contrôles négatifs (les fractions totales récupérées lors de la purification) ont été aussi transduites dans les cellules LCT10. Après extraction des protéines et re-purification sur une résine nickel-agarose, nous les avons testé sur Western Blot, en utilisant un anticorps anti-Menin. Comme attendu, nous n'observons aucune bande dans ces conditions.

Ensuite, nous avons testé nos échantillons sur un Western Blot, en utilisant un anticorps anti-ubiquitine, pour voir si la Menin était ubiquitinée ou pas.

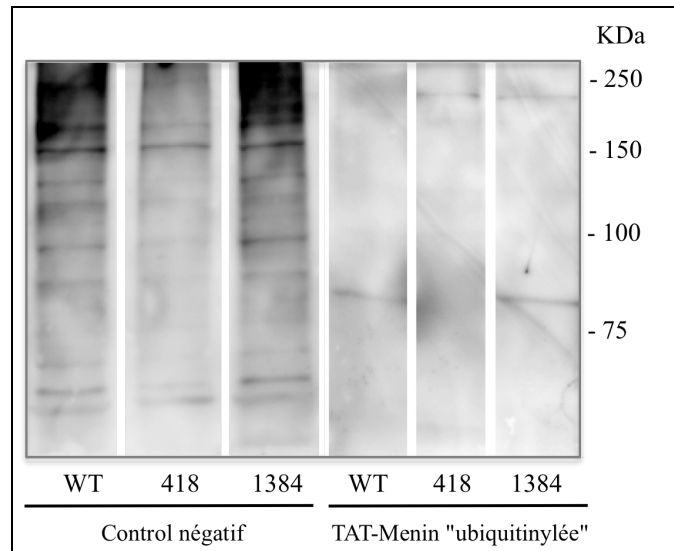


Figure 42. Expression d'Ubiquitine dans les cellules LCT10 contenant la TAT-Menin sauvage et les TAT-Menin mutantes, 418 et 1384. Analyses SDS-PAGE des fractions contenant la TAT-Menin sauvage (WT), la TAT-Menin mutante dans le codon n°418, qui entraîne un codon STOP (418) ; et la TAT-Menin mutante dans le nucléotide n°1384, qui entraîne une perte d'un acide aminé glutamate (1384).

Les résultats montrent des bandes à un peu près 80 KDa pour la TAT-Menin WT et la TAT-Menin mutante dans le nucléotide n°1384. Cette bande n'est pas présente sur les contrôles négatifs. Mais le fait que cette bande ne soit pas présente dans la TAT-Menin mutante dans le codon n°418, suggère que la Menin pourrait être modifiée par mono-ubiquitination, en C-terminal. Ceci est un résultat original et intéressant à explorer.

Selon Hicke (2001), la mono-ubiquitination régule des processus comme le transport membranaire et la régulation de la transcription, au lieu de promouvoir la dégradation par le protéasome, fonction attribuée à la poly-ubiquitination. Ce mécanisme n'est pas très connu, mais il semble que l'ubiquitine puisse altérer la structure des histones pour contrôler comment elles interagissent entre elles ou avec l'ADN. Cette altération pourrait modifier l'organisation de la chromatine et rendre le promoteur plus ou moins accessible à la machinerie de transcription. Une autre possibilité (non exclusive de celle-ci) est que l'ubiquitine puisse activer ou inhiber la liaison de protéines régulatrices qui interagissent avec des histones pour réguler la transcription (Hicke, 2001).

La mono-ubiquitination de l'histone de drosophile H1 est importante pour une régulation appropriée de l'activité transcriptionnelle dans des embryons de *Drosophila* (Pham and Sauer, 2000).

Mettei et ses collaborateurs ont montré que la mono-ubiquitination de FANCD2 est une étape clé dans la réponse à l'ADN endommagé, par redistribution de celle-ci dans le foci nucléaire contenant BRCA1 (Meetei *et al.*, 2004). En addition, ça a été montré que la mono-ubiquitination régule la localisation endosomal de LST2, un régulateur négatif de la voie de signalisation EGFR (Mosesson *et al.*, 2009).

Récemment, Boutet et ses collaborateurs ont décrit un mécanisme unique de dégradation par le protéasome impliquant la mono-ubiquitination de protéines. Il semble que la protéine Pax3 (un régulateur de la myogenèse pendant le développement embryonnaire), est régulée par la voie ubiquitine-protéasome (Boutet *et al.*, 2007).

Une autre fonction attribuée à la mono-ubiquitination est sa capacité de réguler le trafic entre le noyau et le cytoplasme. P53 est exportée hors du noyau par mono-ubiquitination en présence de niveaux bas de Mdm2 (Brooks *et al.*, 2004). Par contre, la protéine oncosuppressive PTEN est importée vers le noyau par mono-ubiquitination (Trotman *et al.*, 2007).

3 Interaction Menin-p53

Les protéines p53 et Menin partagent certaines fonctions, comme l'inhibition de la prolifération cellulaire, le maintien de la stabilité génomique et l'apoptose. Pour distinguer si ces deux oncosuppresseurs agissent en parallèle ou interagissent, des études ont été réalisées afin de mettre en évidence un lien possible physique et/ou un lien fonctionnel entre ces deux protéines.

Des travaux de thèse par Ariane Poisson, sous la direction de mon directeur de thèse, Patrick Gaudray (thèse de Ariane Poisson, 2005), ont permis de mettre en évidence une interaction entre p53 et la Menin *in vitro*. Il a été montré que les 3 domaines C-terminaux de p53 sont nécessaires et suffisants pour l'interaction avec la Menin. Cette interaction a été confirmée *in vivo*, dans les cellules MCF7, U2OS, dans lesquelles p53 est stabilisée après un stress génotoxique par un traitement aux UV et dans les cellules Cos, où p53 est stabilisée dans des conditions basales par la protéine T de SV40 avec laquelle elle interagit. Dans les cellules H1299 (p53^{-/-}), cette interaction n'est bien sûr pas visible.

L'objectif de mon étude est de confirmer l'interaction entre Menin et p53 et d'essayer de comprendre la mécanique de cette interaction.

Pour cela, nous avons fait des immunoprécipitations sur les lignées cellulaires U2OS (lignée cellulaire dérivée d'un ostéosarcome) et SAOS (lignée cellulaire dérivée d'un ostéosarcome et dépourvue de p53), en précipitant les cellules avec un anticorps anti-Menin (M23C) et en regardant par Western Blot avec un anticorps anti-p53 (DOI), comme le montre la figure suivante.

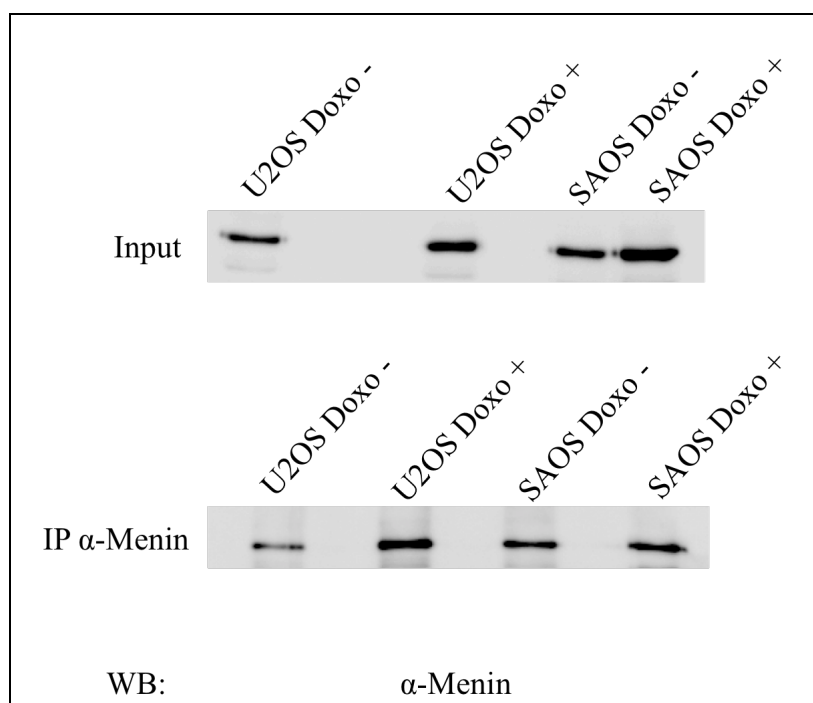
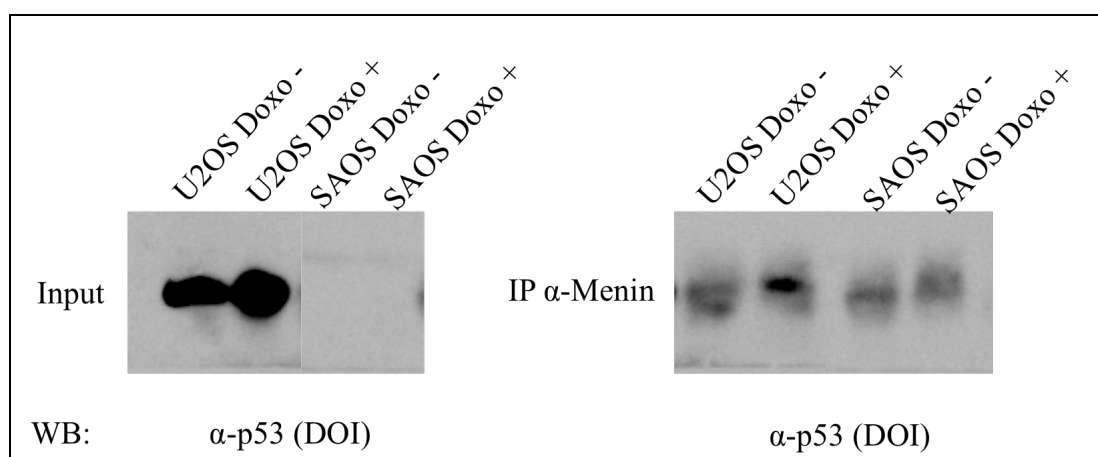


Figure 43. Etude de l'interaction entre Menin et p53 dans les lignées cellulaires U2OS et SAOS, en présence et absence de traitement à la doxorubicine. L'immunoprécipitation est réalisée avec une matrice contenant un anticorps anti-Menin (M23C) et l'Western Blot est révélé par un anticorps anti-p53 (DOI). La présence de la Menin dans les extraits est détectée par un anticorps anti-Menin (M23C). Les input représentent 10% des extraits cellulaires utilisés dans l'expérience d'immunoprécipitation.

Les résultats montrent de manière très reproductible que la Menin endogène immunoprécipite avec p53 dans la lignée cellulaire U2OS après une induction d'un stress génotoxique, par l'addition de doxorubicine. Par contre, nous n'avons pas pu faire l'immunoprécipitation dans le sens inversé, c'est à dire, en immunoprécipitant p53 et prenant un anticorps anti-Menin sur

l'Western Blot. Comme attendu, la Menin n'interagit pas avec p53 dans la lignée cellulaire SAOS (p53^{-/-}).

Ce résultat est consistant avec celui obtenu par Bazzi et collaborateurs, qui ont montré que la Menin co-immunoprécipite avec p53 dans des cellules d'insulinome de rat INS-r3, régulant peut être la transcription de p53. Cet effet n'est pas visible après une sur-expression de Menin (Bazzi *et al.*, 2008).

Ensuite, nous avons voulu vérifier s'il existe une interaction entre la Menin et la p53 mutée dans les 3 lysines carboxy-terminales de p53 (mutation en arginine des lysines K320, K373 et K382). L'acétylation de ces trois lysines est une modification post-traductionnelle de p53 déterminante pour son activité et sa stabilité en réponse à un stress génotoxique. Pour cela, nous avons transfecté les lignées cellulaires U2OS et SAOS avec le triple mutant de p53, le plasmide pcDNA3.1 (pour contrôler l'effet de la transfection elle-même) ou la p53 wild-type (pour contrôler l'interaction entre Menin et la p53 wild-type).

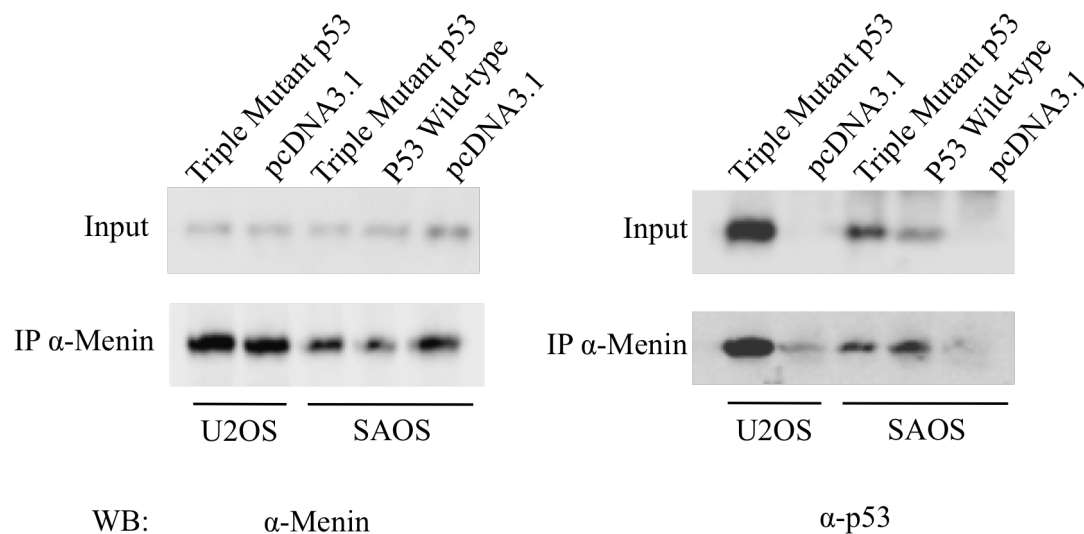


Figure 44. Interaction entre la Menin et p53 dans les lignées cellulaires U2OS et SAOS, après transfection avec le triple mutant, le plasmide pcDNA3.1 ou la p53 wild-type. Les input représentent 10% des extraits cellulaires utilisés dans l'expérience d'immunoprécipitation.

Nous observons que la Menin est capable d'interagir avec la protéine p53 mutée (triple mutant) dans la lignée cellulaire U2OS. Par ailleurs, cette interaction est aussi observée dans les cellules U2OS transfectées avec le plasmide pcDNA3.1, ce qui semble montrer que la transfection elle-même est capable d'induire un stress cellulaire. Additionnellement, lorsqu'on

transfecte les cellules U2OS avec la p53 sauvage (WT), les cellules meurent. Une surexpression de p53 est donc toxique pour nos cellules U2OS.

La Menin est capable d'interagir avec p53, lorsqu'on transfecte la lignée cellulaire SAOS (p53^{-/-}) avec la p53 sauvage. Cette interaction n'est pas visible si on la transfecte avec le plasmide pcDNA3.1. En addition, la mutation en arginine des trois lysines carboxy-terminales de p53 dans des cellules SAOS n'a aucune influence sur l'interaction entre la Menin et p53. Il est donc possible que l'interaction entre ces deux protéines soit liée aux modifications post-traductionnelles de la Menin, et non de p53. La quantité de Menin est un peu près la même dans les deux lignées cellulaires, dans n'importe quelle condition.

Les travaux d'Ariane Poisson avaient montré que l'interaction entre Menin et p53 est influencée par différents stress génotoxiques (thèse de Ariane Poisson, 2005). Un exemple en est la différence de comportement des deux protéines à la suite d'un traitement soit par l'ALLN, un inhibiteur des calpaïnes qui stabilise la protéine p53 sans la modifier, soit par un rayonnement UV ou par la Doxorubicine, qui induit des cassures double-brin de l'ADN et induit une phosphorylation et une acétylation de p53 (Figure 45).

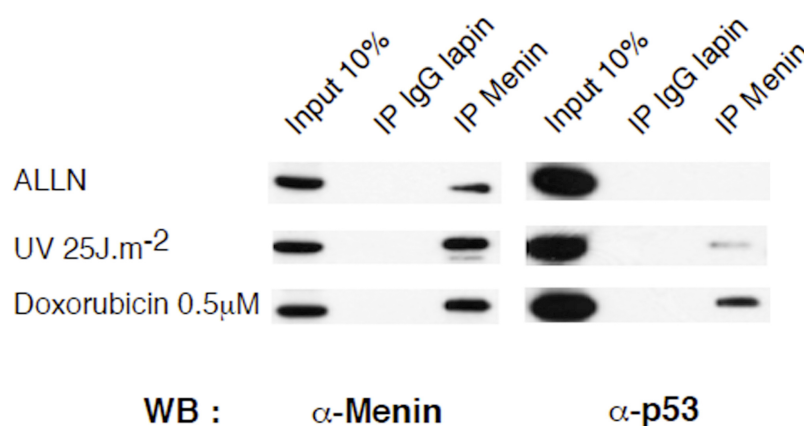


Figure 45. Interaction entre la Menin et p53 *in vivo*, dans la lignée cellulaire U2OS non traitée, traitée à l'ALLN, aux UV ou traitée à la Doxorubicine. La lignée cellulaire U2OS a été utilisée soit dans des conditions basales, soit après un traitement à l'ALLN (10nM), aux UV (25J.m⁻²) ou à la Doxorubicine (0,5μM). Des extraits cellulaires ont été préparés 3h après le traitement à l'ALLN et 8h après le traitement aux UV. Des immunoprécipitations ont été réalisées avec un anti-Menin couplé à des billes agarose (α-Menin AC). Après plusieurs lavages, les complexes communs ont été analysés par western blot avec un anti-Menin et un anti-p53. L'input représente 10% des extraits cellulaires utilisés dans l'expérience d'immunoprécipitation.

Bien que la quantité de p53 soit équivalente dans les trois conditions, la co-immunoprécipitation de Menin et p53, absente en présence d'ALLN et à peine détectable en présence d'un rayonnement UV, est très nettement présente (de façon très reproductible), bien que faible, lorsque les cellules sont traitées par la Doxorubicine.

Lorsque la cellule subit un stress cellulaire (cassure de l'ADN, hypoxie, choc thermique), la protéine p53 change de conformation et l'interaction MDM2/p53 est inhibée, libérant alors p53 sous sa forme active. Ensuite, la protéine p53 se fixe sur le promoteur du gène p21 afin d'activer l'expression de la protéine p21. Celle-ci inhibe tous les complexes cyclines/cdk et ainsi, pRB n'est pas phosphorylé et le facteur de transcription E2F reste inactif. Donc, p21 est capable de bloquer le cycle cellulaire entre la phase G1 et S de façon transitoire afin de permettre aux différents systèmes de réparation de restaurer l'ADN et de poursuivre le cycle cellulaire. Lorsque la réparation de l'ADN, n'est pas possible, la protéine p53 dirige la cellule vers un processus de mort cellulaire (apoptose).

Des expériences faites par l'ancienne équipe suédoise de Günther Weber, ont montré que Menin inhibe l'expression du gène p21. Ces résultats ont été obtenus par 3 expériences différentes : une analyse par microarray, transfection des lignées cellulaires HeLa et BON par siRNA (small interference) et RT-PCR quantitative. Ces résultats ont été confirmés par Arianne Poisson dans une étude de la régulation d'un promoteur p21 synthétique qui gouvernait l'expression de luciférase.

Cependant, Bazzi et collaborateurs ont montré qu'une sur-expression de Menin dans les cellules d'insulinome de rat entraîne une capacité d'activation de p21 supérieure à celle observée dans les cellules exprimant une Menin mutée (Bazzi *et al.*, 2008).

Pour le moment, nous ne savons pas encore quel est le rôle de Menin dans ces processus. Il semble que la Menin puisse jouer un rôle dans le trafic entre le noyau et cytoplasme par des interactions avec d'autres protéines et ainsi expliquer la multiplicité de rôles de cette petite protéine de 68 KDa. Ceci est simplement une hypothèse qu'il faudrait développer plus en détail, et qui nous permettrait de comprendre un peu mieux les fonctions de la Menin et dans la Néoplasie Endocrinienne Multiple de Type 1.

Ces résultats font parti d'une publication, qui est actuellement en préparation.

4 Rôle de Menin sur RB

Pendant nos études sur Menin et p53, nous avons observé, de façon inattendue que la concentration de la protéine RB changeait lorsqu'on supprimait la Menin par ARN interférence, dans les cellules U2OS. Dans un premier temps, je présenterai les résultats sous forme d'une publication soumise au journal *Molecular Cancer*. Ensuite, dans un second temps, je les discuterai.

4.1 Publication

La publication soumise est incluse dans les pages suivantes.

Menin controls the concentration of Retinoblastoma protein

Dina Ivo^{1,2}, Laetitia Corset^{1,2}, Laura Desbourdes¹, Patrick Gaudray^{1,2}, and Günther Weber^{1,2*}

Affiliations.

¹Université François Rabelais de Tours, GICC, UFR des Sciences et Techniques, Parc de Grandmont, 37200 Tours

²CNRS, UMR 6239, Parc de Grandmont, 37200 Tours.

* corresponding author

Email addresses:

DI: dinaisabel.antunesivo@etu.univ-tours.fr

LC: laetitia.babin@univ-tours.fr

LD: laura.desbourdes@hotmail.fr

PG: patrick.gaudray@univ-tours.fr

GW: gunther.weber@univ-tours.fr

Abstract

Menin, the protein encoded by the Multiple Endocrine Neoplasia type 1 gene, is involved in the cell cycle control through its participation in functional dynamics of chromatin and regulation of transcription. RB, the protein of the retinoblastoma gene *RBI*, controls the progression of the cell cycle and is regulated in its activity by means of a feedback by phosphorylation. Studies in double heterozygous knockout mice for *Men1* and the Retinoblastoma gene *Rb1* have recently indicated that both genes may be implicated in the same pathways. In the course of our studies on Menin, we found that after suppression or in absence of Menin, *RBI* expression was strongly reduced in a posttranscriptional manner. Under conditions of growth arrest, the hyperphosphorylated form of RB was most strongly affected, whereas its hypophosphorylated form was less or not at all reduced. Our findings confirm the hypothesis that the pathways of two tumor suppressor genes are connected.

Findings

Menin is a 68 KDa protein encoded by the *MEN1* gene, a tumor suppressor gene mutated in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 [1]. This protein is localised mainly in the nucleus [2], but in some circumstances it can be found also in the cytoplasm [3], and it is able to shuttle between one and the other [4]. Menin's functions are inferred from its interactions with other proteins, like JunD, Nf-kB and p53, among many others [5]. Hence, it seems that Menin plays a role in transcription regulation, cellular proliferation, apoptosis and genome stability.

RB (or p105Rb) is a 105 to 110 KDa nuclear phosphoprotein encoded by the tumor suppressor gene *RBI*, localized at chromosome 13q14. *RBI* is the first tumor suppressor gene identified [6] [7] and plays a key role in the regulation of cell cycle progression. In the active form, RB is hypophosphorylated, avoiding the cell cycle progression by binding to the E2F transcription factor family [8].

Menin has been linked to cell cycle regulation since it is able to regulate the expression of CDKi p18^{INK4c} and p27^{Kip1}, which suppress cyclin-dependent kinases (CDK) [9] [10]. This may indirectly regulate the activity of pRB, which would then block cell cycle progression unless being hyperphosphorylated by the CDK.

Recently, double heterozygous *Men1* and *Rb1* knockout mice were shown to develop the same tumor pattern as than the respective single knockout mice [11] [12]. Cooperative activities of the two genes were expected to accelerate tumorigenesis or alter the tumor spectrum, as being observed for double knockouts on *Rb1* and *Tp53* [13]. The absence of cumulative effects of *Men1* and *Rb1* mutations leads to the suggestion that Menin and RB are in the same molecular pathway of cell cycle regulation and tumor suppression.

During studies in U2OS osteosarcoma cells, we noticed that a 80% suppression of Menin by RNA interference by 80% appeared to diminish the amount of the retinoblastoma protein in the cell. The hyperphosphorylated slow-migrating band (further on referred to as ppRB) appeared to be affected selectively while the hypophosphorylated band (pRB) appeared unaltered. We did not see these alterations when treating the cells with a mismatched siRNA, or with a transfection with an negative control siRNA. While Menin and the *MEN1* transcript were equally well suppressed, *RB1* transcription remained unchanged, as verified by qRT-PCR (Fig. 1).

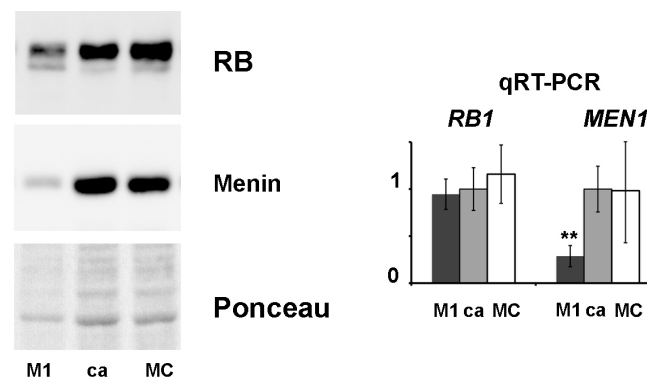


Figure 1: Impact of Menin expression on ppRB/RB in U2OS.

Leftside, Western blot analysis on U2OS cells after treatment with siRNA against *MEN1* (M1), an inert control siRNA (ca), and a mismatched siRNA against the same target site as M1. Right, transcript analysis by qPCR of identically treated samples, revealing no change of *RB1* transcription despite significant suppression of *MEN1* expression.

Menin influences the expression of cell cycle related proteins, [9, 10], which could alter the degree of RB phosphorylation starting from the late G1 phase. To avoid these effects, which would perturb any observations of a more direct impact of Menin on RB, we were prompted to perform our further studies under conditions of cell cycle arrest and without the need for inefficient transfections. Therefore a *Men1*^{-/-} Leydig cell tumor line (LCT10) was used that originated from a knockout mouse model [14]. For a stable counterpart, we generated the line

LM8, in which we reconstituted stable Menin expression with an expression vector for human Menin under control of its own promoter [15] to obtain an expression level similar to those observed on most other cell lines (Fig 2A). After starving the cells for 48h in medium without any serum, an 85% reduction of ppRB was found in LCT10 relative to LM8. The hypophosphorylated pRB was significantly reduced as well, although clearly weaker (50%). Menin has been shown to interact with p53 [16]. As p53 is known to interplay with RB to regulate cell cycle, a possibility could be that the impact of Menin on RB could be mediated by p53. Therefore, we decided to use the p53 negative cell line H1299 [17] to investigate whether Menin exerted its influence on RB in absence of p53. For this purpose we established two derivatives from H1299, M2-6 and M3-7, which permitted an inducible expression of shRNA against two different sites of the *MEN1* mRNA. Simultaneous to RNAi induction by doxycyclin, cells were starved for 48h as above. The suppression of Menin by 40% in M2-6, and 50% in M3-7, was accompanied by a decrease of ppRB by 50% and 70%, respectively. (fig. 2B). Remarkably, the hypophosphorylated pRB remained unchanged, confirming a selective effect of the suppression of Menin. When the parental control line H1299, which expresses the tetracycline repressor but no shRNA, was treated identically, neither forms of RB protein showed significant changes.

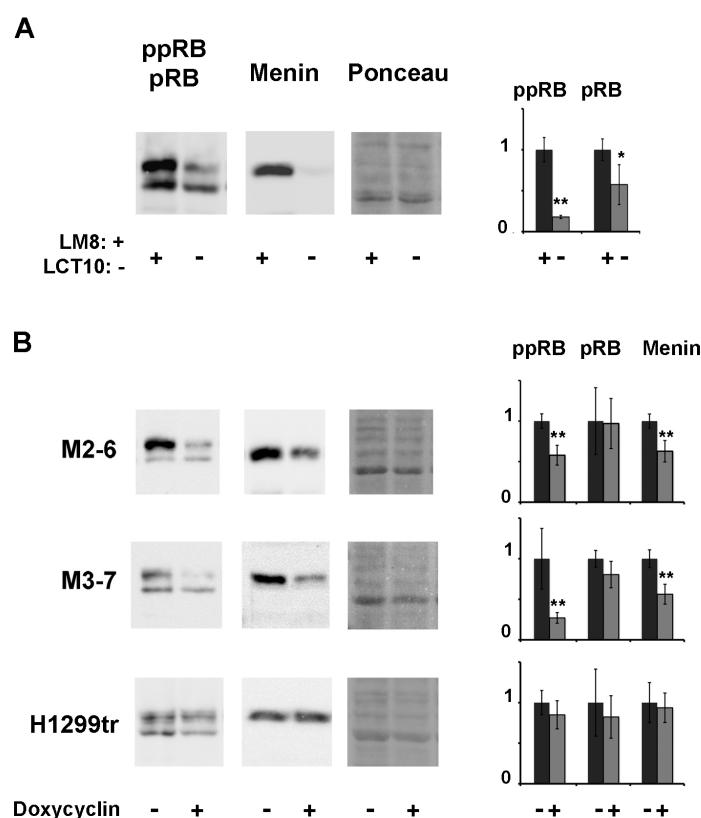


Figure 2. Menin influences the concentration of ppRB/pRB

A. ppRB and pRB are suppressed in a mouse Leydig tumor cell line in absence of Menin. Left, a Western blot of Retinoblastoma protein and Menin is displayed for LCT10, a *Men1*^{-/-} tumor line, and its reconstituted counterpart LM8, after starvation for 48h. Also displayed is the Ponceau stain, which is used for normalization. +/- indicate the Menin status of the lines. Right, the quantitative evaluation of a triplicate of independent samples.

B. ppRB is suppressed in H1299 derivatives after RNA interference against *MEN1*. Left, a Western blot sample of two inducible cell lines, and its parental noninducible control line, after 48 of starvation and with/without Doxycyclin-induction of RNA interference. The signal of total RB protein and Menin is displayed together with the Ponceau stain as above. Stars (* and **) indicate the significance values ($p < 0.01$, and < 0.001 , resp).

Taken together, our observations indicate that the amounts of Menin and Retinoblastoma proteins are correlated, and that Menin is involved in the control the maintenance of ppRB in a posttranscriptional manner. We were surprised that even a comparably inefficient suppression of Menin in H1299 cells had such a considerable effect on ppRB, equal to the effects on its complete absence in the LCT10 cells. This favors the idea of a threshold effect of Menin, a concept that has been introduced recently for the regulatory activities of Mdmx on p53 [18] [19]. Clearly, the ppRB is more strongly affected than the active pRB, although even this form becomes eventually reduced in the total absence of Menin.

Little is known about the control of ppRB/pRB stability. MDM2 induces degradation of RB by ubiquitination [20-22], which is independent of p53 [23] and can be inhibited by MDMX [24].

The impact of Menin on RB that we observed is certainly independent of p53 as we have observed the same effect on the p53 ^{-/-} H1299 cell line. The preferential suppression of the hyperphosphorylated ppRB is a feature that, to our knowledge, has not been reported before, and it is remarkable given the fact that MDM2 targets the hypophosphorylated form [20][21]. It is tempting to hypothesize that the degradation of ppRB in absence of Menin, instead of its recycling by phosphatases into its active form, may present an alternative form of regulating the activities of RB.

It presently appears difficult to discriminate these effects from other cell cycle regulation pathways, given the multiplicity -and variety- of cell cycle related proteins that interplay with Menin, and in the absence of knowledge of which proteins may assist Menin in regulating RB. However, our observations may help to explain the previous findings that no additive

effects have been observed for the tumor spectrum in the double heterozygous mice for *Rb1* and *Men1*, and support the hypothesis that the signalling pathways of both proteins are strongly related.

Materials and methods

Cell lines

U2OS cells were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). All other cells were grown in Optimem (Invitrogen) supplemented with 10% FCS.

H1299 cells were transfected with pcDNA6tr (Invitrogen) and selected with 3 µg/ml of Blasticidin to obtain H1299tr, a stable clone constitutively expressing the tetracycline repressor. H1299tr was then transfected with pSuperior.neo+GFP (Oligoengine) containing oligonucleotide inserts coding for either of two shRNA against *MEN1*. After 2 weeks of selection on Geneticin (2mg/ml) and FACS selection for GFP expression, cells were cloned in 0.35% soft agar and individually expanded. Target sites for RNAi are listed below.

LCT10 cells were kindly provided from C.X.Zhang, Lyon. For reconstitution of Menin expression cells were transfected with pcDNA 3.1 (Invitrogen) containing the cds of human *MEN1*, where in addition the *AmaI*/*HinDIII* fragment with the CMV promoter had been replaced with a *SmaI* fragment of the human *MEN1* promoter (-1248/+138). The stable clone LM8 was obtained after selection with G418 and verified by Western blot analysis.

RNA interference

RNAi was induced in U2OS by siRNA transfection with ICAfectin 442 (In-Cell-Art), at a concentration of 10 nM. For induction of RNA interference in the inducible cell lines, cells were treated with Doxycyclin, 1 µg/ml, for 48h. Sequences for siRNA and shRNA constructs are displayed in Table 1.

Table 1. Target sequences for RNA interference.

Name, purpose	Sequence (DNA)	Position in <i>MEN1</i> cds
siRNA M1, line M2-6	AGCTCACCTTCCAGCCCAG	179-197
siRNA MC, mismatched to M1	ACCTGACCTTCCAGCCGAC	
control ca	Allstars RNAi control (Qiagen)	
line M3-7	AGATGGAGGTGGCGTTCAT	698-716

qRT-PCR analysis

RNA from U2OS cells was reverse transcribed (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas) and 10ng - 100 pg of the cDNA used for quantification of *MEN1* and *RB1* by qPCR using MESA Green qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay (Eurogentec) in an MiniOpticon (BioRad) qPCR analyser. Primers were used at a final concentration of 200nM and are listed in Table 2.

Table 2. Primers used in qPCR analysis.

Name	Sequence
RNA 18S forward	CGGCTACCACATCCAAGGAA
RNA 18S reverse	GCTGGAATTACCGCGGCT
<i>MEN1</i> forward	CCCACTCACCTCTACCACA
<i>MEN1</i> reverse	GGGTAGATGTGTTCATCCAG
<i>RB1</i> forward	ACCACCGAGAAGGACCAACT
<i>RB1</i> reverse	AAGGCTGAGGTTGCTTGTGT

Western blot analysis.

The mouse monoclonal antibody RB-C2 (Santa Cruz) against RB, and a purified rabbit antiserum against the 23 C-terminal amino acids of Menin (produced by Innovagen AB) were used at a 1/2000 dilution for either. Western blot analysis was performed under standard conditions, by quantifying an ECL signal (GE healthcare) by a CCD camera (Fuji LAS4000), and normalizing the signal against Ponceau staining.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

DI produced experimental data and contributed to the manuscript, LC contributed to the cell line production and made the initial observations, LD performed the analyses on U2OS lines, GW contributed to the experimental data, and, together with PG, coordinated the study and contributed to the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Acknowledgements

We thank Dr. C.X.Zhang, Centre Léon Bérard, Lyon, for providing us with the LCT10 cells, and Yves Levern, Cytometry core facility, INRA Nouzilly, for FACS selection of the H1299 lines. D.I was supported by a fellowship from the “Fundação para a Ciência e a Tecnologia”. This work was supported by the “Ligue Contre le Cancer, Interrégion Grand-Ouest”.

References

1. Gaudray P, Weber G: **Genetic background of MEN1: from genetic homogeneity to functional diversity.** *Adv Exp Med Biol* 2009, **668**:17-26.
2. La P, Desmond A, Hou Z, Silva AC, Schnepf RW, Hua X: **Tumor suppressor menin: the essential role of nuclear localization signal domains in coordinating gene expression.** *Oncogene* 2006, **25**:3537-3546.
3. Lopez-Egido J, Cunningham J, Berg M, Oberg K, Bongcam-Rudloff E, Gobl A: **Menin's interaction with glial fibrillary acidic protein and vimentin suggests a role for the intermediate filament network in regulating menin activity.** *Exp Cell Res* 2002, **278**:175-183.
4. Cao Y, Liu R, Jiang X, Lu J, Jiang J, Zhang C, Li X, Ning G: **Nuclear-cytoplasmic shuttling of menin regulates nuclear translocation of {beta}-catenin.** *Mol Cell Biol* 2009, **29**:5477-5487.
5. Poisson A, Zablewska B, Gaudray P: **Menin interacting proteins as clues toward the understanding of multiple endocrine neoplasia type 1.** *Cancer Lett* 2003, **189**:1-10.
6. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP: **A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma.** *Nature* 1986, **323**:643-646.
7. Lee WH, Bookstein R, Hong F, Young LJ, Shew JY, Lee EY: **Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence.** *Science* 1987, **235**:1394-1399.
8. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**:57-70.
9. Milne TA, Hughes CM, Lloyd R, Yang Z, Rozenblatt-Rosen O, Dou Y, Schnepf RW, Krankel C, Livolsi VA, Gibbs D, Hua X, Roeder RG, Meyerson M, Hess JL: **Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:749-754.

10. Karnik SK, Hughes CM, Gu X, Rozenblatt-Rosen O, McLean GW, Xiong Y, Meyerson M, Kim SK: **Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27Kip1 and p18INK4c.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**:14659-14664.
11. Loffler KA, Biondi CA, Gartside MG, Serewko-Auret MM, Duncan R, Tonks ID, Mould AW, Waring P, Muller HK, Kay GF, Hayward NK: **Lack of augmentation of tumor spectrum or severity in dual heterozygous Men1 and Rb1 knockout mice.** *Oncogene* 2007, **26**:4009-4017.
12. Matoso A, Zhou Z, Hayama R, Flesken-Nikitin A, Nikitin AY: **Cell lineage-specific interactions between Men1 and Rb in neuroendocrine neoplasia.** *Carcinogenesis* 2008, **29**:620-628.
13. Harvey M, Vogel H, Lee EY, Bradley A, Donehower LA: **Mice deficient in both p53 and Rb develop tumors primarily of endocrine origin.** *Cancer Res* 1995, **55**:1146-1151.
14. Hussein N, Casse H, Fontaniere S, Morera AM, Asensio MJ, Bakeli S, Lu JL, Coste I, Di Clemente N, Bertolino P, Zhang CX: **Reconstituted expression of menin in Men1-deficient mouse Leydig tumour cells induces cell cycle arrest and apoptosis.** *Eur J Cancer* 2007, **43**:402-414.
15. Zablewska B, Bylund L, Mandic SA, Fromaget M, Gaudray P, Weber G: **Transcription regulation of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene in human and mouse.** *J Clin Endocrinol Metab* 2003, **88**:3845-3851.
16. Bazzi W, Renon M, Vercherat C, Hamze Z, Lacheretz-Bernigaud A, Wang H, Blanc M, Roche C, Calender A, Chayvialle JA, Scoazec JY, Cordier-Bussat M: **MEN1 missense mutations impair sensitization to apoptosis induced by wild-type menin in endocrine pancreatic tumor cells.** *Gastroenterology* 2008, **135**:1698-1709.e2.
17. Lin DL, Chang C: **p53 is a mediator for radiation-repressed human TR2 orphan receptor expression in MCF-7 cells, a new pathway from tumor suppressor to member of the steroid receptor superfamily.** *J Biol Chem* 1996, **271**:14649-14652.
18. Wang YV, Leblanc M, Wade M, Jochemsen AG, Wahl GM: **Increased radioresistance and accelerated B cell lymphomas in mice with Mdmx mutations that prevent modifications by DNA-damage-activated kinases.** *Cancer Cell* 2009, **16**:33-43.
19. Wang YV, Wade M, Wahl GM: **Guarding the guardian: Mdmx plays important roles in setting p53 basal activity and determining biological responses in vivo.** *Cell Cycle* 2009, **8**:3443-3444.

20. Xiao ZX, Chen J, Levine AJ, Modjtahedi N, Xing J, Sellers WR, Livingston DM: **Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2.** *Nature* 1995, **375**:694-698.
21. Ying H, Xiao ZX: **Targeting retinoblastoma protein for degradation by proteasomes.** *Cell Cycle* 2006, **5**:506-508.
22. Uchida C, Miwa S, Kitagawa K, Hattori T, Isobe T, Otani S, Oda T, Sugimura H, Kamijo T, Ookawa K, Yasuda H, Kitagawa M: **Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation.** *EMBO J* 2005, **24**:160-169.
23. Miwa S, Uchida C, Kitagawa K, Hattori T, Oda T, Sugimura H, Yasuda H, Nakamura H, Chida K, Kitagawa M: **Mdm2-mediated pRB downregulation is involved in carcinogenesis in a p53-independent manner.** *Biochem Biophys Res Commun* 2006, **340**:54-61.
24. Uchida C, Miwa S, Isobe T, Kitagawa K, Hattori T, Oda T, Yasuda H, Kitagawa M: **Effects of MdmX on Mdm2-mediated downregulation of pRB.** *FEBS Lett* 2006, **580**:1753-1758.

4.2 Bilan des résultats

Pendant nos études sur Menin et p53, nous avons observé de façon inattendue que lorsque la quantité de Menin diminuait dans les cellules, la quantité de la protéine RB diminuait aussi. Pour confirmer cette observation, nous avons utilisé la lignée cellulaire U2OS pour supprimer la Menin par transfection avec du siRNA. Des expériences menées préalablement au sein de l'équipe ont montré qu'avec la lignée cellulaire U2OS, on atteignait un fort taux de suppression de la Menin en comparaison avec d'autres lignées cellulaires ($\approx 80\%$). Dans ces conditions, il semble que la Menin ait une influence sur la quantité de la protéine RB dans la cellule, notamment sur la forme hyperphosphorylée (ppRB), mais pas sur la forme hypophosphorylée (pRB). Nous avons observé aussi que cet effet n'a pas lieu au niveau transcriptionnel, car des analyses qRT-PCR nous montrent une expression de *RB1* indépendante de la quantité de Menin.

La distribution des deux formes de RB est dépendante du cycle cellulaire. Pour étudier si la Menin a une influence directe dans cette distribution, nous avons fait nos expériences en conditions d'arrêt du cycle cellulaire, sur des lignées cellulaires murines, contenant (LM8) ou pas (LCT10) de la Menin, et éviter ainsi la transfection des cellules. Les résultats montrent que la forme hyperphosphorylée est réduite en 85% en absence de Menin. Contrairement aux études faites sur les cellules U2OS, la forme hypophosphorylée est aussi réduite, mais plus faiblement (50%).

Ensuite, nous nous sommes intéressés à chercher si l'influence de Menin sur RB était dépendante de p53. Pour cela, nous avons décidé d'utiliser deux lignées cellulaires (M3-7 et M2-6), dérivées de la lignée cellulaire H1299 (p53^{-/-}), établies à partir d'un système inductible par la doxycycline (un analogue de la tétracycline), qui induit la synthèse de siRNA anti-Menin et ainsi la suppression transitoire de la Menin. Nous avons synchronisé les cellules en G0 et nous les avons traités avec de la doxycycline pendant 48h. Par l'addition de SVF, les cellules ont redémarrées le cycle cellulaire. Dans ces conditions, une suppression de Menin de 40% (dans les cellules M2-6) et 50% (dans les cellules M3-7), entraîne une diminution de la forme hyperphosphorylée (forme inactive), en 50% et 70%, respectivement. Comme dans le cas des cellules U2OS, la forme hypophosphorylée n'est pas affectée.

Pour étudier la distribution des deux formes à plus long term, nous avons fait la même expérience que précédemment, mais en ajoutant du SVF à différents temps, sur la lignée

cellulaire M2-6. Cette expérience nous a permis de "simuler" différentes étapes du cycle cellulaire, notamment la phase G1, pour étudier si Menin avait toujours une influence sur la concentration de RB.

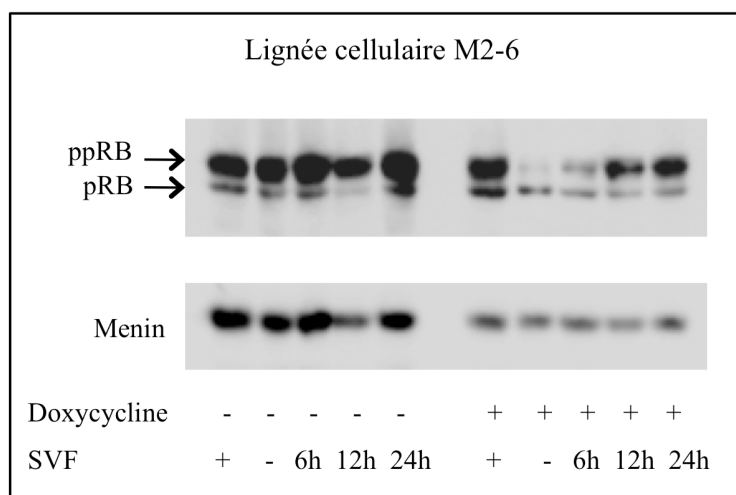


Figure 46. Analyse par Western Blot la protéine RB (formes hyperphosphorylée et hypophosphorylée) et de la Menin, sur la lignée cellulaire M2-6 synchronisée en phase G0, traitée ou pas à la doxycycline, et après "simulation" du redémarrage du cycle cellulaire par ajout de SVF à différents temps. ppRB: forme hyperphosphorylée de RB ; pRB: forme hypophosphorylée de RB.

Nos résultats confirment qu'il semble exister une corrélation entre la concentration totale de la RB et celle de Menin. Ces résultats sont en accord avec d'autres résultats antérieurs qui indiquent que RB et Menin agissent dans la même voie de régulation du cycle cellulaire et suppression tumorale (Loffler *et al.*, 2007; Matoso *et al.*, 2008). En effet, lorsque nous supprimons la Menin, nous observons une diminution de la forme hyperphosphorylée (forme inactive). Une observation intéressante est le fait que cette forme hyperphosphorylée est supprimée à 6h après l'ajout du SVF, mais après 12h, le signal de cette forme augmente et à 24h, on obtient un signal très proche de celui qu'on a obtenu initialement. Ceci semble montrer que nous avons re-commencé un nouveau cycle. Concernant la forme hypophosphorylée, nous nous sommes rendu compte que celle-ci finit par disparaître au bout de quelques jours.

Jusqu'à maintenant, on pensait que *RBI* était seulement régulé au niveau de sa phosphorylation. Cependant, Uchida et ses collaborateurs ont pu montré que Mdm2 régule la fonction de la protéine RB, en stimulant son ubiquitination et donc sa dégradation (Uchida *et al.*, 2005).

Le fait que Menin semble interagir fonctionnellement avec les protéines RB et p53 qui sont soumises à dégradation par la voie Mdm2, nous amène à poser la question d'un rôle éventuel de Menin dans cette voie.

Conclusion et Perspectives

Un des objectifs de ma thèse était de produire de la Menin en grande quantité, pour étudier sa structure et ses propriétés biochimiques. Nous avons pu produire de la Menin dans un système eucaryote (en cellules S2 de drosophile) et dans un système eucaryote (en *E.coli*), mais cette protéine semble avoir des effets toxiques difficilement maîtrisables. L'étude de la relation structure/fonction n'est peut être pas la meilleure façon d'aborder les choses. C'est pourquoi nous nous sommes concentré sur l'étude des effets de la Menin dans une cellule, pour comprendre, par exemple, pourquoi elle est toxique. Dans un premier temps, nous avons étudié la demi-vie dans des cellules ayant ou pas de p53. Dans les cellules U2OS, nous avons pu obtenir de façon reproductible, un temps de demi-vie d'un peu près 30h. Pour les cellules SAOS, nous avons observé que le temps de demi-vie est beaucoup plus élevé (jusqu'à 3 fois plus). Cette évaluation a été faite par blocage de la traduction (par l'action de la cycloheximide), et analyse par Western Blot, en utilisant la protéine actine pour la normalisation. Donc, ce que nous observons est le temps de demi-vie de la Menin relative à celui de l'actine. Cette protéine de normalisation est-elle même dégradée, donc pour des protéines ayant des temps longs de demi-vie, c'est difficile d'estimer les valeurs par cette technique.

Les résultats antérieurs du laboratoire nous ont appris que Menin modifie l'interaction de p53 avec ses séquences de reconnaissance sur le promoteur du gène p21. Ceci constitue une confirmation de nos observations premières sur l'implication de Menin dans le choix entre apoptose et cytotase dans la réponse cellulaire à un stress génotoxique (induit par la doxorubicine, par exemple). Cette interaction semble varier en fonction de la cellule utilisée ainsi que les conditions physiologiques dans lesquelles se trouve cette cellule. Dans certaines lignées cellulaires, les Western Blot faits lors des expériences d'immunoprécipitation ont donné un certain bruit de fond qui rend les résultats difficiles à évaluer. Les résultats sur les cellules U2OS étaient les plus clairs. Nous avons pu montrer de façon reproductible que la Menin co-immunoprécipite avec p53 dans les cellules U2OS après l'induction d'un stress génotoxique (addition de doxorubicine).

Nous savons aussi par des résultats obtenus au laboratoire que la Menin est capable d'immunoprécipiter avec p53 dans les cellules ayant une p53 tronquée en N-terminal (HCT116-). Une mutation en arginine des trois lysines carboxy-terminales n'a aucune influence sur cette interaction. Bien sûr qu'il y a d'autres modifications post-traductionnelles

de p53 qui peuvent être responsables par cette interaction. Mais il est possible aussi que ce soit des modifications post-traductionnelles de Menin et non de p53 qui soient en cause dans la capacité qu'ont ces deux protéines de s'associer.

Des résultats obtenus par Ariane Poisson (Thèse de Ariane Poisson, 2005), ont montré que les agents génotoxiques modifient l'interaction entre Menin et p53. Nous avons également observé qu'une transfection d'une cellule par un plasmide d'expression de Menin peut induire un stress considérable, et modifier le comportement de Menin et/ou de p53 dans la cellule. Pour éviter ce stress cellulaire, nous avons produit une protéine de fusion Menin, contenant un signal "TAT", qui permet de franchir la membrane cytoplasmique d'une cellule réceptrice et de la transformer sans qu'il soit besoin de la transfecter avec un vecteur ADN. Cette stratégie permet ainsi de limiter un stress génotoxique non contrôlé dû à la transfection d'ADNc. La TAT-Menin permet la transduction efficace des cellules *Men1^{-/-}* (LCT10) et sa localisation nous donne un intervalle assez long pour que nous puissions étudier son comportement dans la cellule. La TAT-Menin nous a permis aussi de découvrir que cette protéine est vraisemblablement monoubiquitiné, une modification impliquée surtout dans la régulation transcriptionnelle et dans le trafic entre le noyau et le cytoplasme.

Une analyse Western Blot a montré l'existence d'un polypeptide migrant apparemment à 100 KDa, ce qui a été observé aussi sur différentes lignées humaines. D'ailleurs, une expérience d'ARN interférence montre la spécificité de ce résultat. Donc, ça serait intéressant de caractériser ce polypeptide de 100 KDa, qui est peut être une nouvelle isoforme de Menin, résultant d'épissages en 5' du gène *MEN1* ou résultant de modifications post-traductionnelles, comme ubiquitinylation ou sumoylation. Pour confirmer ce résultat, ça serait utile d'analyser ces protéines en spectrométrie de masse.

Les protéines p53 et RB ont un rôle coopératif dans l'accélération du processus de tumorigenèse (Harvey *et al.*, 1995). Le lien entre Menin et p53 a été établi par nous. Concernant la protéine RB, des souris double knock-out pour Menin et RB développent des tumeurs de façon similaire aux souris Knock-out seulement pour Menin ou RB, ce qui montre que ces deux protéines sont dans la même voie de régulation. Pendant notre travail sur Menin et p53, nous avons observé que la concentration totale de la protéine RB diminuait avec la suppression de Menin par RNA interférence sur les cellules U2OS, notamment la forme

hyperphosphorylée. Il est vraisemblable que cet effet n'a pas lieu au niveau transcriptionnel. Ces résultats ont été confirmés sur des cellules de souris *Men1*^{-/-} (LCT10) et *Men1*^{+/+} (LM8) après la synchronisation des cellules en phase G0.

Pour étudier l'effet en absence de p53, nous voulions éviter une transfection exogénique par siRNA qui n'est pas efficace dans les cellules nonproliférantes. Nous avons décidé d'utiliser deux lignées cellulaires dérivées des cellules H1299 qui permettaient d'induire une suppression contrôlée de Menin. Dans ces conditions, seule la forme hyperphosphorylée ppRB diminuait. La diminution de cette forme peut alors s'expliquer par une dégradation de cette phosphoprotéine et non par une inhibition de la phosphorylation ou la stimulation de la déphosphorylation, car le niveau protéique de la forme supposée hypophosphorylée était indépendante de la quantité de Menin. Nos découvertes peuvent montrer une régulation alternative de l'activité de RB à la façon bien établie, par phosphorylation et déphosphorylation. Nos résultats peuvent expliquer que les équipes de Loffler et de Matoso ont montré que RB et Menin agissent dans la même voie moléculaire de régulation du cycle cellulaire et suppression tumorale chez les souris (Loffler *et al.*, 2007; Matoso *et al.*, 2008).

Dans le but d'approfondir l'hypothèse de la possible dégradation de la forme hyperphosphorylée de la protéine RB due à la suppression de Menin, il faudrait mener une étude quantitative de ce mécanisme, par exemple en étudiant l'évolution de l'expression de RB en fonction d'une gamme du taux de suppression de Menin. La perte de Menin entraînerait une diminution de la forme inactive de RB, ce qui, à long terme, diminuerait la quantité de la forme active. Une possible explication est dégradation comme connue par MDM2 (Uchida *et al.*, 2005). Cette forme active inhibe le cycle cellulaire en cas de stress, et dans ces conditions, elle ne serait plus capable de jouer son rôle, ce qui pourrait favoriser la division des cellules défectueuses susceptibles de devenir tumorales.

Afin de mieux préciser le rôle de Menin dans cette voie de régulation, il faudrait suivre à long terme la quantité de chaque forme de RB en fonction des différentes phases du cycle cellulaire, de sa perturbation (par induction d'un stress génotoxique, par exemple), en présence ou absence de Menin et observer les conséquences sur la prolifération cellulaire. Par contre, mesurer l'effet de la régulation de RB par Menin sur le cycle cellulaire s'avère délicate

puisque que la Menin interagit avec d'autres acteurs de la régulation du cycle cellulaire, comme par exemple, p53, p18 et p27.

Uchida et ses collaborateurs ont pu montrer que Mdm2 est capable de dégrader la protéine RB (Uchida *et al.*, 2005). D'un autre côté, c'est bien établi que Mdm2 est capable de réguler les niveaux de p53. Tenant en compte qu'il est vraisemblable que la Menin puisse interagir fonctionnellement avec les deux acteurs majeurs de la régulation du cycle cellulaire et apoptose, RB et p53, il serait intéressant de vérifier s'il existe un lien entre la Menin et Mdm2. Ces diverses études pourrait nous apporter des éléments de compréhension du processus de tumorigenèse dans la NEM1.

Depuis l'identification du gène *MEN1* en 1997, de nombreuses études ont été menées pour identifier tous les partenaires de Menin connus jusqu'à ce jour. Ces partenariats lui attribuent différentes fonctions, souvent par des interactions individuelles, mais il ne faut pas oublier que les protéines interagissent sous forme de complexes. A long term, nous ne pourrons pas échapper à l'étude des interactions de la Menin par l'étude de complexes, et ainsi comprendre la signification des partenariats multiples de la Menin. Les scientifiques impliqués dans l'étude de la dynamique de la chromatine et la stabilité du génome, ainsi que plus récemment, ceux qui s'intéressent à la leucémogenèse et l'hématopoïèse rejoignent nos préoccupations. En effet, au-delà d'une implication dans les tumeurs neuroendocrines en général, et la néoplasie endocrinienne multiple de type 1 en particulier, la Menin est désormais reconnue comme un acteur majeur de la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose.

Sans pouvoir aujourd'hui anticiper avec sérieux les retombées potentielles que ces résultats attendus auront dans le domaine de la clinique, nous savons qu'ils contribueront à la connaissance fondamentale d'acteurs clés de l'oncogenèse et du cycle cellulaire qui représentent autant de cibles potentielles pour des thérapeutiques ciblées.

Références Bibliographiques

- Agarwal, S. K., Guru, S. C., Heppner, C., Erdos, M. R., Collins, R. M., Park, S. Y., Saggari, S., Chandrasekharappa, S. C., Collins, F. S., Spiegel, A. M., Marx, S. J., and Burns, A. L. (1999). Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and represses JunD-activated transcription. *Cell* 96, 143-152.
- Agarwal, S. K., Novotny, E. A., Crabtree, J. S., Weitzman, J. B., Yaniv, M., Burns, A. L., Chandrasekharappa, S. C., Collins, F. S., Spiegel, A. M., and Marx, S. J. (2003). Transcription factor JunD, deprived of menin, switches from growth suppressor to growth promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10770-10775.
- Bauters, C., Leclerc, L., Wemeau, J. L., Proye, C., Pigny, P., and Porchet, N. (2003). [Multiple endocrine neoplasias. Recent advances in clinical and genetic diagnosis]. *Rev Med Interne* 24, 721-729.
- Bazzi, W., Renon, M., Vercherat, C., Hamze, Z., Lacheretz-Bernigaud, A., Wang, H., Blanc, M., Roche, C., Calender, A., Chayvialle, J. A., Scoazec, J. Y., and Cordier-Bussat, M. (2008). MEN1 missense mutations impair sensitization to apoptosis induced by wild-type menin in endocrine pancreatic tumor cells. *Gastroenterology* 135, 1698-1709.e2.
- Becker-Hapak, M., and Dowdy, S. F. (2003). Protein transduction: generation of full-length transducible proteins using the TAT system. *Curr Protoc Cell Biol Chapter 20*, Unit 20.2.
- Bertolino, P., Radovanovic, I., Casse, H., Aguzzi, A., Wang, Z. Q., and Zhang, C. X. (2003a). Genetic ablation of the tumor suppressor menin causes lethality at mid-gestation with defects in multiple organs. *Mech Dev* 120, 549-560.
- Bertolino, P., Tong, W. M., Galendo, D., Wang, Z. Q., and Zhang, C. X. (2003b). Heterozygous Men1 mutant mice develop a range of endocrine tumors mimicking multiple endocrine neoplasia type 1. *Mol Endocrinol* 17, 1880-1892.
- Bertolino, P., Tong, W. M., Herrera, P. L., Casse, H., Zhang, C. X., and Wang, Z. Q. (2003c). Pancreatic beta-cell-specific ablation of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene causes full penetrance of insulinoma development in mice. *Cancer Res* 63, 4836-4841.
- Biondi, C. A., Gartside, M. G., Waring, P., Loffler, K. A., Stark, M. S., Magnuson, M. A., Kay, G. F., and Hayward, N. K. (2004). Conditional inactivation of the MEN1 gene leads to pancreatic and pituitary tumorigenesis but does not affect normal development of these tissues. *Mol Cell Biol* 24, 3125-3131.
- Boutet, S. C., Disatnik, M. H., Chan, L. S., Iori, K., and Rando, T. A. (2007). Regulation of Pax3 by proteasomal degradation of monoubiquitinated protein in skeletal muscle progenitors. *Cell* 130, 349-362.
- Brandi, M. L., Gagel, R. F., Angeli, A., Bilezikian, J. P., Beck-Peccoz, P., Bordin, C., Conte-Devolx, B., Falchetti, A., Gheri, R. G., Libroia, A., Lips, C. J., Lombardi, G., Mannelli, M., Pacini, F., Ponder, B. A., Raue, F., Skogseid, B., Tamburrano, G., Thakker, R. V., Thompson, N. W., Tomassetti, P., Tonelli, F., Wells, S. A. J., and Marx, S. J. (2001). Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 5658-5671.
- Brooks, C. L., Li, M., and Gu, W. (2004). Monoubiquitination: the signal for p53 nuclear export? *Cell Cycle* 3, 436-438.
- Buro, L. J., Chipumuro, E., and Henriksen, M. A. (2010). Menin and RNF20 recruitment is associated with dynamic histone modifications that regulate signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1)-activated transcription of the interferon regulatory factor 1 gene (IRF1). *Epigenetics Chromatin* 3, 16.
- Busygina, V., Kottmann, M. C., Scott, K. L., Plon, S. E., and Bale, A. E. (2006). Multiple endocrine neoplasia type 1 interacts with forkhead transcription factor CHES1 in DNA damage response. *Cancer Res* 66, 8397-8403.

- Busygina, V., Suphapeetiporn, K., Marek, L. R., Stowers, R. S., Xu, T., and Bale, A. E. (2004). Hypermotability in a Drosophila model for multiple endocrine neoplasia type 1. *Hum Mol Genet* 13, 2399-2408.
- Calender, A., Giraud, S., Porchet, N., Gaudray, P., Cadiot, G., and Mignon, M. (1998). [Clinicogenetic study of MEN1: recent physiopathological data and clinical applications. Study Group of Multiple Endocrine Neoplasia (GENEM)]. *Ann Endocrinol (Paris)* 59, 444-451.
- Cao, Y., Liu, R., Jiang, X., Lu, J., Jiang, J., Zhang, C., Li, X., and Ning, G. (2009). Nuclear-cytoplasmic shuttling of menin regulates nuclear translocation of {beta}-catenin. *Mol Cell Biol* 29, 5477-5487.
- Caslini, C., Yang, Z., El-Osta, M., Milne, T. A., Slany, R. K., and Hess, J. L. (2007). Interaction of MLL amino terminal sequences with menin is required for transformation. *Cancer Res* 67, 7275-7283.
- Cell Signaling Technology, Inc. Juillet 2010, <http://www.cellsignal.com>.
- Chandrasekharappa, S. C., Guru, S. C., Manickam, P., Olufemi, S. E., Collins, F. S., Emmert-Buck, M. R., Debelenko, L. V., Zhuang, Z., Lubensky, I. A., Liotta, L. A., Crabtree, J. S., Wang, Y., Roe, B. A., Weisemann, J., Boguski, M. S., Agarwal, S. K., Kester, M. B., Kim, Y. S., Heppner, C., Dong, Q., Spiegel, A. M., Burns, A. L., and Marx, S. J. (1997). Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science* 276, 404-407.
- Chandrasekharappa, S. C., and Teh, B. T. (2003). Functional studies of the MEN1 gene. *J Intern Med* 253, 606-615.
- Chen, G., A, J., Wang, M., Farley, S., Lee, L. Y., Lee, L. C., and Sawicki, M. P. (2008). Menin promotes the Wnt signaling pathway in pancreatic endocrine cells. *Mol Cancer Res* 6, 1894-1907.
- Cong, Y. S., Wright, W. E., and Shay, J. W. (2002). Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 407-25, table of contents.
- Courseaux, A., Grosgeorge, J., Gaudray, P., Pannett, A. A., Forbes, S. A., Williamson, C., Bassett, D., Thakker, R. V., Teh, B. T., Farnebo, F., Shepherd, J., Skogseid, B., Larsson, C., Giraud, S., Zhang, C. X., Salandre, J., and Calender, A. (1996). Definition of the minimal MEN1 candidate area based on a 5-Mb integrated map of proximal 11q13. The European Consortium on Men1, (GENEM 1; Groupe d'Etude des Neoplasies Endocriniennes Multiples de type 1). *Genomics* 37, 354-365.
- Crabtree, J. S., Scacheri, P. C., Ward, J. M., Garrett-Beal, L., Emmert-Buck, M. R., Edgemon, K. A., Lorang, D., Libutti, S. K., Chandrasekharappa, S. C., Marx, S. J., Spiegel, A. M., and Collins, F. S. (2001). A mouse model of multiple endocrine neoplasia, type 1, develops multiple endocrine tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1118-1123.
- Crabtree, J. S., Scacheri, P. C., Ward, J. M., McNally, S. R., Swain, G. P., Montagna, C., Hager, J. H., Hanahan, D., Edlund, H., Magnuson, M. A., Garrett-Beal, L., Burns, A. L., Ried, T., Chandrasekharappa, S. C., Marx, S. J., Spiegel, A. M., and Collins, F. S. (2003). Of mice and MEN1: Insulinomas in a conditional mouse knockout. *Mol Cell Biol* 23, 6075-6085.
- Cropley, J. E., Martin, D. I., and Suter, C. M. (2008). Germline epimutation in humans. *Pharmacogenomics* 9, 1861-1868.
- Dreijerink, K. *Nuclear Receptors and Multiple Endocrine Neoplasia type 1 (MEN1)*, Thesis Utrecht University, The Netherlands, 25 Juin 2009, 112 pages.
- Dreijerink, K. M., Mulder, K. W., Winkler, G. S., Hoppener, J. W., Lips, C. J., and Timmers, H. T. (2006). Menin links estrogen receptor activation to histone H3K4 trimethylation. *Cancer Res* 66, 4929-4935.

- Dreijerink, K. M., Varier, R. A., van Beekum, O., Jeninga, E. H., Hoppener, J. W., Lips, C. J., Kummer, J. A., Kalkhoven, E., and Timmers, H. T. (2009). The multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) tumor suppressor regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol* 29, 5060-5069.
- "*Drosophila* Expression System for the stable expression and purification of heterologous proteins in Schneider 2 cells ; Version H ; February 28, 2003 ; 25-0191. In <http://www.invitrogen.com>.
- Elledge, S. J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274, 1664-1672.
- Enge, M., Bao, W., Hedstrom, E., Jackson, S. P., Moumen, A., and Selivanova, G. (2009). MDM2-dependent downregulation of p21 and hnRNP K provides a switch between apoptosis and growth arrest induced by pharmacologically activated p53. *Cancer Cell* 15, 171-183.
- Forsberg, L., Zablewska, B., Piehl, F., Weber, G., Lagercrantz, S., Gaudray, P., Hoog, C., and Larsson, C. (2001). Differential expression of multiple alternative spliceforms of the Men1 tumor suppressor gene in mouse. *Int J Mol Med* 8, 681-689.
- Fromaget, M., Vercherat, C., Zhang, C. X., Zablewska, B., Gaudray, P., Chayvialle, J. A., Calender, A., and Cordier-Bussat, M. (2003). Functional characterization of a promoter region in the human MEN1 tumor suppressor gene. *J Mol Biol* 333, 87-102.
- Gobl, A. E., Berg, M., Lopez-Egido, J. R., Oberg, K., Skogseid, B., and Westin, G. (1999). Menin represses JunD-activated transcription by a histone deacetylase-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1447, 51-56.
- Guru, S. C., Crabtree, J. S., Brown, K. D., Dunn, K. J., Manickam, P., Prasad, N. B., Wangsa, D., Burns, A. L., Spiegel, A. M., Marx, S. J., Pavan, W. J., Collins, F. S., and Chandrasekharappa, S. C. (1999). Isolation, genomic organization, and expression analysis of Men1, the murine homolog of the MEN1 gene. *Mamm Genome* 10, 592-596.
- Guru, S. C., Goldsmith, P. K., Burns, A. L., Marx, S. J., Spiegel, A. M., Collins, F. S., and Chandrasekharappa, S. C. (1998). Menin, the product of the MEN1 gene, is a nuclear protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1630-1634.
- Harvey, M., Vogel, H., Lee, E. Y., Bradley, A., and Donehower, L. A. (1995). Mice deficient in both p53 and Rb develop tumors primarily of endocrine origin. *Cancer Res* 55, 1146-1151.
- Hashimoto, M., Kyo, S., Hua, X., Tahara, H., Nakajima, M., Takakura, M., Sakaguchi, J., Maida, Y., Nakamura, M., Ikoma, T., Mizumoto, Y., and Inoue, M. (2008). Role of menin in the regulation of telomerase activity in normal and cancer cells. *Int J Oncol* 33, 333-340.
- Hecht, F., and Hecht, B. K. (1991). Unstable chromosomes in heritable tumor syndromes. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *Cancer Genet Cytogenet* 52, 131-134.
- Heppner, C., Bilimoria, K. Y., Agarwal, S. K., Kester, M., Whitty, L. J., Guru, S. C., Chandrasekharappa, S. C., Collins, F. S., Spiegel, A. M., Marx, S. J., and Burns, A. L. (2001). The tumor suppressor protein menin interacts with NF-kappaB proteins and inhibits NF-kappaB-mediated transactivation. *Oncogene* 20, 4917-4925.
- Hessman, O., Skogseid, B., Westin, G., and Akerstrom, G. (2001). Multiple allelic deletions and intratumoral genetic heterogeneity in men1 pancreatic tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 1355-1361.
- Hicke, L. (2001). Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 195-201.
- Hoff, A. O., Cote, G. J., and Gagel, R. F. (2000). Multiple endocrine neoplasias. *Annu Rev Physiol* 62, 377-411.

- Huang, S. C., Zhuang, Z., Weil, R. J., Pack, S., Wang, C., Krutzsch, H. C., Pham, T. A., and Lubensky, I. A. (1999). Nuclear/cytoplasmic localization of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, menin. *Lab Invest* 79, 301-310.
- Hughes, C. M., Rozenblatt-Rosen, O., Milne, T. A., Copeland, T. D., Levine, S. S., Lee, J. C., Hayes, D. N., Shanmugam, K. S., Bhattacharjee, A., Biondi, C. A., Kay, G. F., Hayward, N. K., Hess, J. L., and Meyerson, M. (2004). Menin associates with a trithorax family histone methyltransferase complex and with the *hoxc8* locus. *Mol Cell* 13, 587-597.
- Ikeo, Y., Sakurai, A., and Hashizume, K. (1999). Characterization of the MEN1 gene product, menin, by site-specific polyclonal antibodies. *Jpn J Cancer Res* 90, 1088-1095.
- Ikeo, Y., Sakurai, A., Suzuki, R., Zhang, M. X., Koizumi, S., Takeuchi, Y., Yumita, W., Nakayama, J., and Hashizume, K. (2000). Proliferation-associated expression of the MEN1 gene as revealed by in situ hybridization: possible role of the menin as a negative regulator of cell proliferation under DNA damage. *Lab Invest* 80, 797-804.
- Isobe, M., Emanuel, B. S., Givol, D., Oren, M., and Croce, C. M. (1986). Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 320, 84-85.
- Itakura, Y., Sakurai, A., Katai, M., Ikeo, Y., and Hashizume, K. (2000). Enhanced sensitivity to alkylating agent in lymphocytes from patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Biomed Pharmacother* 54 Suppl 1, 187s-190s.
- Ivo, D., Corset, L., Desbourdes, L., Gaudray, P., and Weber, G. (2010). Menin controls the concentration of Retinoblastoma protein. *Molecular Cancer*, soumis.
- Jin, S., Mao, H., Schnepf, R. W., Sykes, S. M., Silva, A. C., D'Andrea, A. D., and Hua, X. (2003). Menin associates with FANCD2, a protein involved in repair of DNA damage. *Cancer Res* 63, 4204-4210.
- Kaji, H., Canaff, L., Goltzman, D., and Hendy, G. N. (1999). Cell cycle regulation of menin expression. *Cancer Res* 59, 5097-5101.
- Kaji, H., Canaff, L., Lebrun, J. J., Goltzman, D., and Hendy, G. N. (2001). Inactivation of menin, a Smad3-interacting protein, blocks transforming growth factor type beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3837-3842.
- Karges, W., Maier, S., Wissmann, A., Dralle, H., Dosch, H. M., and Boehm, B. O. (1999). Primary structure, gene expression and chromosomal mapping of rodent homologs of the MEN1 tumor suppressor gene. *Biochim Biophys Acta* 1446, 286-294.
- Karnik, S. K., Hughes, C. M., Gu, X., Rozenblatt-Rosen, O., McLean, G. W., Xiong, Y., Meyerson, M., and Kim, S. K. (2005). Menin regulates pancreatic islet growth by promoting histone methylation and expression of genes encoding p27Kip1 and p18INK4c. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14659-14664.
- Khodaei-O'Brien, S., Zablewska, B., Fromaget, M., Bylund, L., Weber, G., and Gaudray, P. (2000). Heterogeneity at the 5'-end of MEN1 transcripts. *Biochem Biophys Res Commun* 276, 508-514.
- Khodaei, S., O'Brien, K. P., Dumanski, J., Wong, F. K., and Weber, G. (1999). Characterization of the MEN1 ortholog in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 404-408.
- Kim, H., Lee, J. E., Cho, E. J., Liu, J. O., and Youn, H. D. (2003). Menin, a tumor suppressor, represses JunD-mediated transcriptional activity by association with an mSin3A-histone deacetylase complex. *Cancer Res* 63, 6135-6139.
- Kim, Y. S., Burns, A. L., Goldsmith, P. K., Heppner, C., Park, S. Y., Chandrasekharappa, S. C., Collins, F. S., Spiegel, A. M., and Marx, S. J. (1999). Stable overexpression of MEN1 suppresses tumorigenicity of RAS. *Oncogene* 18, 5936-5942.
- Knudson, A. G. J. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68, 820-823.

- Kottemann, M. C., and Bale, A. E. (2009). Characterization of DNA damage-dependent cell cycle checkpoints in a menin-deficient model. *DNA Repair (Amst)* 8, 944-952.
- Krebs, L. J., and Arnold, A. (2002). Molecular basis of hyperparathyroidism and potential targets for drug development. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2, 167-179.
- La, P., Desmond, A., Hou, Z., Silva, A. C., Schnepf, R. W., and Hua, X. (2006). Tumor suppressor menin: the essential role of nuclear localization signal domains in coordinating gene expression. *Oncogene* 25, 3537-3546.
- La, P., Silva, A. C., Hou, Z., Wang, H., Schnepf, R. W., Yan, N., Shi, Y., and Hua, X. (2004). Direct binding of DNA by tumor suppressor menin. *J Biol Chem* 279, 49045-49054.
- Larsson, C., Skogseid, B., Oberg, K., Nakamura, Y., and Nordenskjold, M. (1988). Multiple endocrine neoplasia type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma. *Nature* 332, 85-87.
- Lemmens, I. H., Forsberg, L., Pannett, A. A., Meyen, E., Piehl, F., Turner, J. J., Van de Ven, W. J., Thakker, R. V., Larsson, C., and Kas, K. (2001). Menin interacts directly with the homeobox-containing protein Pem. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 426-431.
- Lemmens, I., Van de Ven, W. J., Kas, K., Zhang, C. X., Giraud, S., Wautot, V., Buisson, N., De Witte, K., Salandre, J., Lenoir, G., Pugeat, M., Calender, A., Parente, F., Quincey, D., Gaudray, P., De Wit, M. J., Lips, C. J., Hoppener, J. W., Khodaei, S., Grant, A. L., Weber, G., Kytola, S., Teh, B. T., Farnebo, F., Thakker, R. V., and et, a. (1997). Identification of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. The European Consortium on MEN1. *Hum Mol Genet* 6, 1177-1183.
- Lemos, M. C., and Thakker, R. V. (2008). Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. *Hum Mutat* 29, 22-32.
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-331.
- Libutti, S. K., Crabtree, J. S., Lorang, D., Burns, A. L., Mazzanti, C., Hewitt, S. M., O'Connor, S., Ward, J. M., Emmert-Buck, M. R., Remaley, A., Miller, M., Turner, E., Alexander, H. R., Arnold, A., Marx, S. J., Collins, F. S., and Spiegel, A. M. (2003). Parathyroid gland-specific deletion of the mouse Men1 gene results in parathyroid neoplasia and hypercalcemic hyperparathyroidism. *Cancer Res* 63, 8022-8028.
- Lin, S. Y., and Elledge, S. J. (2003). Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell* 113, 881-889.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Zipursky, L. and Darnell, J., *Molecular Cell Biology*. W.H. Freeman, 5th edition, 2004. In <http://bcs.whfreeman.com/lodish5e/>.
- Loffler, K. A., Biondi, C. A., Gartside, M. G., Serewko-Auret, M. M., Duncan, R., Tonks, I. D., Mould, A. W., Waring, P., Muller, H. K., Kay, G. F., and Hayward, N. K. (2007). Lack of augmentation of tumor spectrum or severity in dual heterozygous Men1 and Rb1 knockout mice. *Oncogene* 26, 4009-4017.
- Lopez-Egido, J., Cunningham, J., Berg, M., Oberg, K., Bongcam-Rudloff, E., and Gobl, A. (2002). Menin's interaction with glial fibrillary acidic protein and vimentin suggests a role for the intermediate filament network in regulating menin activity. *Exp Cell Res* 278, 175-183.
- Lu, J., Herrera, P. L., Carreira, C., Bonnavion, R., Seigne, C., Calender, A., Bertolino, P., and Zhang, C. X. (2010). Alpha cell-specific Men1 ablation triggers the transdifferentiation of glucagon-expressing cells and insulinoma development. *Gastroenterology* 138, 1954-1965.

- MacConaill, L. E., Hughes, C. M., Rozenblatt-Rosen, O., Nannepaga, S., and Meyerson, M. (2006). Phosphorylation of the menin tumor suppressor protein on serine 543 and serine 583. *Mol Cancer Res* 4, 793-801.
- Maillard, I., Chen, Y. X., Friedman, A., Yang, Y., Tubbs, A. T., Shestova, O., Pear, W. S., and Hua, X. (2009). Menin regulates the function of hematopoietic stem cells and lymphoid progenitors. *Blood* 113, 1661-1669.
- Manickam, P., Vogel, A. M., Agarwal, S. K., Oda, T., Spiegel, A. M., Marx, S. J., Collins, F. S., Weinstein, B. M., and Chandrasekharappa, S. C. (2000). Isolation, characterization, expression and functional analysis of the zebrafish ortholog of MEN1. *Mamm Genome* 11, 448-454.
- Maruyama, K., Tsukada, T., Honda, M., Nara-Ashizawa, N., Noguchi, K., Cheng, J., Ohkura, N., Sasaki, K., and Yamaguchi, K. (2000). Complementary DNA structure and genomic organization of *Drosophila* menin. *Mol Cell Endocrinol* 168, 135-140.
- Marx, S. J. (2005). Molecular genetics of multiple endocrine neoplasia types 1 and 2. *Nat Rev Cancer* 5, 367-375.
- Matoso, A., Zhou, Z., Hayama, R., Flesken-Nikitin, A., and Nikitin, A. Y. (2008). Cell lineage-specific interactions between Men1 and Rb in neuroendocrine neoplasia. *Carcinogenesis* 29, 620-628.
- Meetei, A. R., Yan, Z., and Wang, W. (2004). FANCL replaces BRCA1 as the likely ubiquitin ligase responsible for FANCD2 monoubiquitination. *Cell Cycle* 3, 179-181.
- Milne, T. A., Hughes, C. M., Lloyd, R., Yang, Z., Rozenblatt-Rosen, O., Dou, Y., Schnepf, R. W., Krankel, C., Livolsi, V. A., Gibbs, D., Hua, X., Roeder, R. G., Meyerson, M., and Hess, J. L. (2005). Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 749-754.
- Molatore, S., and Pellegata, N. S. (2010). The MENX syndrome and p27: relationships with multiple endocrine neoplasia. *Prog Brain Res* 182, 295-320.
- Mosesson, Y., Chetrit, D., Schley, L., Berghoff, J., Ziv, T., Carvalho, S., Milanezi, F., Admon, A., Schmitt, F., Ehrlich, M., and Yarden, Y. (2009). Monoubiquitylation regulates endosomal localization of Lst2, a negative regulator of EGF receptor signaling. *Dev Cell* 16, 687-698.
- Obungu, V. H., Lee Burns, A., Agarwal, S. K., Chandrasekharappa, S. C., Adelstein, R. S., and Marx, S. J. (2003). Menin, a tumor suppressor, associates with nonmuscle myosin II-A heavy chain. *Oncogene* 22, 6347-6358.
- Ohkura, N., Kishi, M., Tsukada, T., and Yamaguchi, K. (2001). Menin, a gene product responsible for multiple endocrine neoplasia type 1, interacts with the putative tumor metastasis suppressor nm23. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 1206-1210.
- Pellegata, N. S., Quintanilla-Martinez, L., Siggelkow, H., Samson, E., Bink, K., Hofler, H., Fend, F., Graw, J., and Atkinson, M. J. (2006). Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15558-15563.
- Pham, A. D., and Sauer, F. (2000). Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAFII250, a mediator of activation of gene expression in *Drosophila*. *Science* 289, 2357-2360.
- Poisson, A. *Etude des fonctions de la Menin, oncosuppresseur impliqué dans les Néoplasies Endocriniennes Multiples de type 1: analyse du réseau d'interactions protéiques et identification de nouveaux partenaires*, Thèse pour obtenir le titre de Docteur en Sciences de l'Université de Nice-Sophia Antipolis, 04 Mars 2005, 103 pages.
- Sakurai, A., Katai, M., Itakura, Y., Ikeo, Y., and Hashizume, K. (1999). Premature centromere division in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Cancer Genet Cytogenet* 109, 138-140.

- Sasse, J. and Gallagher, S.R. Chapitre 10.6.26. In : *Current Protocols in Molecular Biology*. U.S.A. : John Wiley & Sons, Inc., 2009, 85 : 10.6.1 – 10.6.27.
- Scacheri, P. C., Crabtree, J. S., Kennedy, A. L., Swain, G. P., Ward, J. M., Marx, S. J., Spiegel, A. M., and Collins, F. S. (2004a). Homozygous loss of menin is well tolerated in liver, a tissue not affected in MEN1. *Mamm Genome* 15, 872-877.
- Scacheri, P. C., Davis, S., Odom, D. T., Crawford, G. E., Perkins, S., Halawi, M. J., Agarwal, S. K., Marx, S. J., Spiegel, A. M., Meltzer, P. S., and Collins, F. S. (2006). Genome-wide analysis of menin binding provides insights into MEN1 tumorigenesis. *PLoS Genet* 2, e51.
- Scacheri, P. C., Kennedy, A. L., Chin, K., Miller, M. T., Hodgson, J. G., Gray, J. W., Marx, S. J., Spiegel, A. M., and Collins, F. S. (2004b). Pancreatic insulinomas in multiple endocrine neoplasia, type I knockout mice can develop in the absence of chromosome instability or microsatellite instability. *Cancer Res* 64, 7039-7044.
- Sherr, C. J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103-112.
- Sherr, C. J., and Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13, 1501-1512.
- Schneider, I. (1972). Cell Lines Derived from Late Embryonic Stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morph.* 27, 363-365.
- Schnepp, R. W., Hou, Z., Wang, H., Petersen, C., Silva, A., Masai, H., and Hua, X. (2004). Functional interaction between tumor suppressor menin and activator of S-phase kinase. *Cancer Res* 64, 6791-6796.
- Sieber, O., Heinemann, K., and Tomlinson, I. (2005). Genomic stability and tumorigenesis. *Semin Cancer Biol* 15, 61-66.
- Sowa, H., Kaji, H., Canaff, L., Hendy, G. N., Tsukamoto, T., Yamaguchi, T., Miyazono, K., Sugimoto, T., and Chihara, K. (2003). Inactivation of menin, the product of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene, inhibits the commitment of multipotential mesenchymal stem cells into the osteoblast lineage. *J Biol Chem* 278, 21058-21069.
- Sowa, H., Kaji, H., Hendy, G. N., Canaff, L., Komori, T., Sugimoto, T., and Chihara, K. (2004). Menin is required for bone morphogenetic protein 2- and transforming growth factor beta-regulated osteoblastic differentiation through interaction with Smads and Runx2. *J Biol Chem* 279, 40267-40275.
- Stewart, C., Parente, F., Piehl, F., Farnebo, F., Quincey, D., Silins, G., Bergman, L., Carle, G. F., Lemmens, I., Grimmond, S., Xian, C. Z., Khodei, S., Teh, B. T., Lagercrantz, J., Siggers, P., Calender, A., Van de Vem, V., Kas, K., Weber, G., Hayward, N., Gaudray, P., and Larsson, C. (1998). Characterization of the mouse Men1 gene and its expression during development. *Oncogene* 17, 2485-2493.
- Sukhodolets, K. E., Hickman, A. B., Agarwal, S. K., Sukhodolets, M. V., Obungu, V. H., Novotny, E. A., Crabtree, J. S., Chandrasekharappa, S. C., Collins, F. S., Spiegel, A. M., Burns, A. L., and Marx, S. J. (2003). The 32-kilodalton subunit of replication protein A interacts with menin, the product of the MEN1 tumor suppressor gene. *Mol Cell Biol* 23, 493-509.
- Suphapeetiporn, K., Grealley, J. M., Walpita, D., Ashley, T., and Bale, A. E. (2002). MEN1 tumor-suppressor protein localizes to telomeres during meiosis. *Genes Chromosomes Cancer* 35, 81-85.
- Tomassetti, P., Cometa, G., Del Vecchio, E., Baserga, M., Faccioli, P., Bosoni, D., Paolucci, G., and Barbara, L. (1995). Chromosomal instability in multiple endocrine neoplasia type 1. Cytogenetic evaluation with DEB test. *Cancer Genet Cytogenet* 79, 123-126.
- Trotman, L. C., Wang, X., Alimonti, A., Chen, Z., Teruya-Feldstein, J., Yang, H., Pavletich, N. P., Carver, B. S., Cordon-Cardo, C., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Chi, S.

- G., Kim, H. J., Misteli, T., Jiang, X., and Pandolfi, P. P. (2007). Ubiquitination regulates PTEN nuclear import and tumor suppression. *Cell* 128, 141-156.
- Uchida, C., Miwa, S., Kitagawa, K., Hattori, T., Isobe, T., Otani, S., Oda, T., Sugimura, H., Kamijo, T., Ookawa, K., Yasuda, H., and Kitagawa, M. (2005). Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation. *EMBO J* 24, 160-169.
- Valle, M. A., Kester, M. B., Burns, A. L., Marx, S. J., Spiegel, A. M., and Shiloach, J. (2001). Production and purification of human menin from *Drosophila melanogaster* S2 cells using stirred tank reactor. *Cytotechnology* 35, 127-135.
- van Kesteren, R. E., Syed, N. I., Munno, D. W., Bouwman, J., Feng, Z. P., Geraerts, W. P., and Smit, A. B. (2001). Synapse formation between central neurons requires postsynaptic expression of the MEN1 tumor suppressor gene. *J Neurosci* 21, RC161.
- Wautot, V., Khodaei, S., Frappart, L., Buisson, N., Baro, E., Lenoir, G. M., Calender, A., Zhang, C. X., and Weber, G. (2000). Expression analysis of endogenous menin, the product of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene, in cell lines and human tissues. *Int J Cancer* 85, 877-881.
- Wautot, V., Vercherat, C., Lespinasse, J., Chambe, B., Lenoir, G. M., Zhang, C. X., Porchet, N., Cordier, M., Beroud, C., and Calender, A. (2002). Germline mutation profile of MEN1 in multiple endocrine neoplasia type 1: search for correlation between phenotype and the functional domains of the MEN1 protein. *Hum Mutat* 20, 35-47.
- Weinberg R.A. *The Biology of Cancer*. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2007, 796 p.
- WERMER, P. (1954). Genetic aspects of adenomatosis of endocrine glands. *Am J Med* 16, 363-371.
- Yaguchi, H., Ohkura, N., Takahashi, M., Nagamura, Y., Kitabayashi, I., and Tsukada, T. (2004). Menin missense mutants associated with multiple endocrine neoplasia type 1 are rapidly degraded via the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell Biol* 24, 6569-6580.
- Yaguchi, H., Ohkura, N., Tsukada, T., and Yamaguchi, K. (2002). Menin, the multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, exhibits GTP-hydrolyzing activity in the presence of the tumor metastasis suppressor nm23. *J Biol Chem* 277, 38197-38204.
- Yan, J., Yang, Y., Zhang, H., King, C., Kan, H. M., Cai, Y., Yuan, C. X., Bloom, G. S., and Hua, X. (2009). Menin interacts with IQGAP1 to enhance intercellular adhesion of beta-cells. *Oncogene* 28, 973-982.
- Yokoyama, A., and Cleary, M. L. (2008). Menin critically links MLL proteins with LEDGF on cancer-associated target genes. *Cancer Cell* 14, 36-46.
- Yokoyama, A., Somervaille, T. C., Smith, K. S., Rozenblatt-Rosen, O., Meyerson, M., and Cleary, M. L. (2005). The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis. *Cell* 123, 207-218.
- Yokoyama, A., Wang, Z., Wysocka, J., Sanyal, M., Aufiero, D. J., Kitabayashi, I., Herr, W., and Cleary, M. L. (2004). Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol Cell Biol* 24, 5639-5649.
- Zablewska, B., Bylund, L., Mandic, S. A., Fromaget, M., Gaudray, P., and Weber, G. (2003). Transcription regulation of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene in human and mouse. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 3845-3851.
- Zhang, X., Chen, G., Xue, Q., and Yu, B. (2010). Early changes of beta-Catenins and Menins in spinal cord dorsal horn after peripheral nerve injury. *Cell Mol Neurobiol* 30, 885-890.



Dina Isabel ANTUNES IVO

Menin: un nouvel acteur dans le cycle cellulaire?



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Social Europeu

Résumé

La NEM1 est un syndrome cancéreux affectant de nombreuses glandes endocrines, qui résulte d'une prédisposition génétique liée à des mutations du gène *MEN1*. La Menin, protéine codée par *MEN1* possède de nombreux partenaires qui interviennent dans la dynamique de la chromatine, la régulation de la transcription et de la stabilité du génome. Le besoin de mieux connaître les fonctions biochimiques de la Menin m'a conduit à tenter de produire la protéine purifiée en grande quantité. Ce faisant, j'ai pu apporter des informations sur la structure de la Menin. Sur un plan fonctionnel, j'ai étudié l'interaction entre Menin et l'oncosuppresseur p53, et montré que certaines modifications post-traductionnelles de p53 déterminantes pour son activité et sa stabilité en réponse à un stress génotoxique, n'affectent pas l'interaction, rendant possible que ce soient des modifications de la Menin qui y jouent un rôle déterminant. J'ai ainsi montré que la Menin pouvait être mono-ubiquitinée. La Menin interfère également avec un autre régulateur du cycle cellulaire, la protéine RB dont elle semble réguler le niveau de phosphorylation et peut-être même la quantité totale dans la cellule.

Mots-clés : NEM1, *MEN1*, Menin, p53, RB.

Résumé en anglais

MEN1 is a cancer syndrome affecting many endocrine glands, which results from a genetic predisposition related to mutations of the *MEN1* gene. Menin, the protein encoded by *MEN1* has many partners that play a role in the dynamics of chromatin and in the regulation of the transcription and of genome stability. The need for knowing better the biochemical functions of Menin led me to try to produce the purified protein in great quantity. By doing this, I could bring information on the structure of Menin. On a functional level, I studied the interaction between Menin and the oncosuppressor p53, and showed that certain post-translational modifications of p53 crucial for its activity and its stability in response to a genotoxic stress, do not affect the interaction, making possible that modifications of Menin play a determining role there. I thus showed that Menin could be monoubiquitinated. Menin also interferes with another regulator of the cell cycle, the protein RB of which it seems to control the level of phosphorylation and perhaps even the total amount in the cell.

Keywords : MEN1, *MEN1*, Menin, p53, RB.