

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 12.10.98.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 14.04.00 Bulletin 00/15.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *AVENTIS PHARMA S.A. Société ano-
nyme — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : *CONSEILLER EMMANUEL, DEBUSS-
CHE LAURENT et GALLAGHER WILLIAM.*

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) :

⑤4 POLYPEPTIDES CAPABLES D'INTERAGIR AVEC LES MUTANTS ONCOGENIQUES DE LA PROTEINE P53.

⑤7 La présente invention concerne le domaine de la bio-
logie et de la régulation du cycle cellulaire. Plus particulière-
ment, la présente invention concerne de nouveaux
polypeptides capables d'interagir spécifiquement avec les
formes oncogéniques de la protéine p53.



POLYPEPTIDES CAPABLES D'INTERAGIR AVEC LES MUTANTS
ONCOGENIQUES DE LA PROTEINE P53

La présente invention concerne le domaine de la biologie et de la régulation du cycle cellulaire. Plus particulièrement, la présente invention concerne de nouveaux polypeptides capables d'interagir spécifiquement avec les formes oncogéniques de la protéine p53.

La protéine p53 sauvage intervient dans la régulation du cycle cellulaire et dans le maintien de l'intégrité du génome de la cellule. Cette protéine, dont la fonction principale est d'être un activateur de la transcription de certains gènes, est susceptible de bloquer la cellule en phase G1 du cycle cellulaire lors de l'apparition de mutations au cours de la réplication du génome, et d'enclencher un certain nombre de processus de réparation de l'ADN. Ce blocage en phase G1 est dû principalement à l'activation du gène *p21/WAF1*. De plus, en cas de mauvais fonctionnement de ces processus de réparation ou en cas d'apparition d'évènements mutationnels trop nombreux pour être corrigés, cette protéine est capable d'induire le phénomène de mort cellulaire programmée, appelé apoptose.

De cette façon, la protéine p53 agit comme un supresseur de tumeur, en éliminant les cellules anormalement différenciées ou dont le génome a été endommagé.

La protéine p53 comporte 393 acides aminés, qui définissent 5 domaines fonctionnels (voir Figure 1) :

- le domaine activateur de la transcription, constitué par les acides aminés 1 à 73, capable de lier certains facteurs de la machinerie générale de transcription comme la protéine TBP. Ce domaine est aussi le siège d'un certain nombre de modifications post-traductionnelles. Il est également le siège d'interactions nombreuses de la protéine p53 avec de nombreuses autres protéines et notamment avec la protéine cellulaire mdm2 ou la protéine EBNA5 du virus d'Epstein-Barr (EBV), capables de

bloquer la fonction de la protéine sauvage. De plus, ce domaine possède des séquences d'acides aminés dites PEST de susceptibilité à la dégradation protéolytique.

- le domaine de liaison à l'ADN, localisé entre les acides aminés 73 et 315. La conformation de ce domaine central de p53 régule la reconnaissance de séquences d'ADN spécifiques de la protéine p53. Ce domaine est le siège de deux types
5 d'altérations affectant la fonction de la protéine sauvage :

(i) l'interaction avec des protéines bloquant la fonction de la p53 comme l'antigène 'grand T' du virus SV40 ou les protéines virales E6 des virus HPV16 et HPV18 capables de provoquer sa dégradation par le système de
10 l'ubiquitine. Cette dernière interaction ne peut se faire qu'en présence de la protéine cellulaire E6ap (enzyme E3 de la cascade de l'ubiquitination).

(ii) les mutations ponctuelles qui affectent la fonction de la p53 et dont la quasi-totalité observée dans les cancers humains sont localisées dans cette région.

- le signal de localisation nucléaire, constitué des acides aminés 315 à 325,
15 indispensable au bon adressage de la protéine dans le compartiment où elle va exercer sa principale fonction.

- le domaine d'oligomérisation, constitué des acides aminés 325 à 355. Cette région 325 à 355 forme une structure de type : feuillet β (326-334)-coude (335-336)-hélice α (337-355). Les altérations de fonctions localisées dans cette région sont
20 essentiellement dues à l'interaction de la protéine sauvage avec les différentes formes mutantes qui peuvent conduire à des effets variables sur la fonction de la protéine sauvage.

- le domaine de régulation, constitué des acides aminés 365 à 393, qui est le siège d'un certain nombre de modifications post-traductionnelles (glycosylations,
25 phosphorylations, fixation d'ARN,...) qui modulent la fonction de la protéine p53 de façon positive ou négative. Ce domaine joue un rôle extrêmement important dans la

modulation de l'activité de la protéine sauvage.

Le fonctionnement de la protéine p53 peut être perturbé de différentes façons :

5 - blocage de sa fonction par un certain nombre de facteurs comme par exemple l'antigène 'grand T' du virus SV40, la protéine EBNA5 du virus d'Epstein-Barr, ou la protéine cellulaire mdm2.

10 - déstabilisation de la protéine par augmentation de sa susceptibilité à la protéolyse, notamment par interaction avec la protéine E6 des virus du papillome humain HPV16 et HPV18, qui favorise l'entrée de la p53 dans le cycle d'ubiquitination. Dans ce cas l'interaction entre ces deux protéines ne peut se faire que par la fixation préalable d'une protéine cellulaire, la protéine E6ap dont le site de fixation est mal connu.

- mutations ponctuelles au niveau du gène de la p53.

- délétion d'un ou des deux allèles de la p53

15 Les deux derniers types de modifications sont retrouvés dans environ 50% des différents types de cancer. A cet égard, les mutations du gène de la p53 repertoriées dans les cellules cancéreuses touchent une très grande partie du gène codant pour cette protéine, et ont pour résultats des modifications variables du fonctionnement de cette protéine. On peut cependant noter que ces mutations sont en grande majorité localisées dans la partie centrale de la protéine p53 dont on sait qu'elle est la région de
20 contact avec les séquences génomiques spécifiques de la protéine p53. Ceci explique pourquoi la plupart des mutants de la protéine p53 ont comme principale caractéristique de ne plus pouvoir se fixer aux séquences d'ADN que reconnaît la protéine sauvage et ainsi de ne plus pouvoir exercer leur rôle de facteur de transcription.

25 On regroupe actuellement l'ensemble de ces modifications dans deux catégories :

- les mutants dits faibles, dont le produit est une protéine non-fonctionnelle, qui, dans le cas de mutation sur un seul des deux allèles, n'affecte pas le fonctionnement de la protéine sauvage codée par l'autre allèle. Le principal représentant de cette catégorie est le mutant H273 spécifique du syndrome familial de
5 Li-Fraumeni d'hypersensibilité aux affections cancéreuses.

- les mutants dominant-oncogéniques, dont le produit est une protéine qui a perdu la capacité de se lier à l'ADN et qui participe activement à la transformation néoplasique. Les mutants de cette catégorie ont perdu leur capacité transactivatrice et sont plus stables que la protéine sauvage. Ils sont incapables d'inhiber la
10 transformation des fibroblastes embryonnaires de rat et ils fonctionnent comme oncogènes en coopérant avec la forme activée de RAS dans la transformation de fibroblastes embryonnaires de rat (Eliyahu et al, Nature 312 (1984) 646 / Parada et al, Nature 312 (1984) 649). Ce comportement peut être expliqué par deux mécanismes différents non exclusifs l'un de l'autre ;

(i) ces mutants génèrent une protéine non-fonctionnelle, qui, dans le cas de mutation sur un seul des deux allèles et par interaction avec la protéine sauvage, est capable de bloquer le fonctionnement de celle-ci par formation d'oligomères mixtes non-actifs qui ne peuvent plus se fixer aux séquences d'ADN spécifiques de la protéine sauvage. Un tel mécanisme est invoqué dans le cas où l'on
15 observe la transformation maligne des cellules après transfection des mutants en présence de p53 endogène.
20

(ii) ces mutants peuvent de plus présenter un phénotype "gain de fonction". Leur expression dans des cellules non tumorigènes n'exprimant pas de p53 endogène conduit à l'apparition de tumeurs chez la souris athymique (Dittmer et al,
25 Nature Genetics 4 (1993) 42). Ils sont capables d'activer la transcription des gènes comme MDR ou PCNA n'ayant pas de séquences consensus reconnues par p53, activation qui se fait probablement par recrutement des facteurs de transcription spécifiques des mutants et qui peut participer à l'apparition du phénotype tumoral

(Chin et al, Science 255 (1992) 459; Deb et al, J. Virol. 66 (1992) 6164). Enfin, il a été rapporté récemment que ces mutants peuvent perturber l'attachement de certaines régions de l'ADN (MAR/SAR) au réseau de la matrice nucléaire (Müller et al, Oncogene 12 (1996) 1941).

5 De nombreux partenaires cellulaires ont été décrits pour p53. Certains interagissent aussi bien avec les conformations sauvage et mutées de la protéine et d'autres sont spécifiques de l'une ou l'autre des conformations (Iwabuchi et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) 6098). Il est concevable que certaines de ces propriétés 'gain de fonction' puissent être médiées par des partenaires protéiques
10 spécifiques des mutants de p53, cependant de tels partenaires n'ont encore jamais été identifiés. L'identification de tels partenaires permettrait de nouvelles approches dans les thérapies anti-cancéreuses basées sur la modification ou le contrôle de ces interactions et sur l'obtention de composés capables d'interférer dans l'interaction de ces partenaires protéiques avec les différentes formes de p53. La présente invention
15 satisfait ce besoin et apporte en outre d'autres avantages.

Dans le but d'étudier ce phénotype "gain de fonction" susceptible d'impliquer des interactions protéine-protéine spécifiques de ce type de mutant, le système double-hybride a été utilisé pour rechercher des partenaires spécifiques potentiels du mutant H175, principal représentant de cette catégorie de mutants. Une banque de
20 cDNA d'embryon de souris, fusionnée à la séquence du domaine de transactivation de *GAL4* (TA), a été criblée dans la souche de levure YCM17 en utilisant comme protéine appât le domaine 73-393 du mutant H175 fusionné au domaine de liaison à l'ADN de Gal4 (DB). Ce criblage a permis d'isoler deux cDNA codant pour deux protéines différentes.

25 Les interactions entre ces deux protéines et le mutant H175 de la protéine p53 ont pu être confirmées en cellules mammifères et des effets fonctionnels ont pu être démontrés, aussi bien sur des propriétés de la forme mutée de la p53 que sur des propriétés de la forme sauvage.

La présente invention résulte donc de la mise en évidence par la demanderesse de nouveaux polypeptides capables d'interagir spécifiquement avec différentes formes de la protéine p53. Plus précisément la présente invention résulte de l'identification, l'isolement et la caractérisation d'une nouvelle protéine et du gène correspondant, la dite protéine étant caractérisée en ce qu'elle est capable d'interagir spécifiquement avec les formes oncogéniques de p53 et avec les mutants H175 et G281 en particulier. Cette protéine est appelée MBP1 pour p53 Mutant Binding Protein. La présente invention résulte également de la mise en évidence qu'une autre protéine, la fibuline2, est capable d'interagir spécifiquement avec les formes oncogéniques de p53 et avec les mutants H175 et G281 en particulier.

La présente invention résulte également de la découverte des propriétés particulières de ces nouveaux partenaires protéiques de p53 qui de manière inattendue s'avèrent également être capables de bloquer les effets anti-prolifératifs de la forme sauvage de p53.

Ces nouveaux partenaires protéiques de p53 présentent en outre une synergie d'action très importante avec les mutants oncogéniques de p53, cette synergie s'exerce aussi bien pour la coopération oncogénique avec la forme activée de la protéine Ras que sur l'effet prolifératif des formes mutées de p53.

De plus et indépendamment de toute interaction avec p53, ces polypeptides présentent un effet positif sur la croissance cellulaire. En outre, un de ces partenaires, la protéine MBP1, présente les caractéristiques d'un oncogène immortalisant en coopérant avec la forme activée de la protéine Ras pour la transformation cellulaire.

De part la spécificité et les effets synergiques que présentent ces nouveaux partenaires de p53 vis à vis de certaines formes mutées de p53, ces polypeptides constituent une cible thérapeutique de choix pour le traitement des cancers liés aux mutations de la protéine p53.

En outre, ces polypeptides qui présentent des propriétés oncogéniques

intrinsèques, constituent de nouvelles cibles potentielles pour le traitement du cancer en général.

Un premier objet de l'invention concerne donc des polypeptides capables
5 d'interagir spécifiquement avec les formes oncogéniques de p53. Ces polypeptides sont en outre capables de stimuler la croissance cellulaire et de bloquer les effets anti-prolifératifs de la forme sauvage de p53.

Selon un premier mode de réalisation, ces polypeptides comprennent tout ou
partie d'une séquence choisie parmi les séquences polypeptidiques SEQ ID N° 8 ou
10 SEQ ID N°22 ou un dérivé de celles-ci.

Selon un autre mode de réalisation, ces polypeptides comprennent tout ou
partie d'une séquence choisie parmi les séquences polypeptidiques SEQ ID N°26 ou
SEQ ID N°23 ou un dérivé de celles-ci.

Enfin selon encore un autre mode de réalisation, ces polypeptides
15 comprennent tout ou partie de la séquence polypeptidique SEQ ID N° 9 ou un dérivé de celle-ci.

De manière préférée les polypeptides de l'invention sont représentés par la
séquence polypeptidique SEQ ID N°23 ou ses dérivées

Au sens de la présente invention, le terme séquence polypeptidique dérivée
20 désigne toute séquence polypeptidique différant de la séquence considérée, obtenue par une ou plusieurs modifications de nature génétique et/ou chimique, et possédant la capacité d'interagir avec les formes mutées oncogéniques de p53. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on peut entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs résidus. De tels dérivés
25 peuvent être générés dans des buts différents, tels que notamment celui de modifier

leurs propriétés de liaison aux formes mutées oncogéniques de p53, ou d'augmenter leur efficacité thérapeutique ou de réduire leurs effets secondaires, ou celui de leur conférer de nouvelles propriétés pharmacocinétiques et/ou biologiques.

5 A cet égard, un autre objet de l'invention concerne les séquences polypeptidiques qui présentent des fonctions biologiques comparables à celles des polypeptides selon l'invention et notamment la capacité à interagir avec les formes mutées oncogéniques de p53 et qui présentent un degré d'identité d'au moins 80 % et de préférence au moins 90 % avec la séquence polypeptidique SEQ ID N° 22 ou la séquence polypeptidique SEQ ID N°23 ou la séquence polypeptidique SEQ ID N°9.

10 De préférence, les séquences polypeptidiques selon l'invention présentent au moins 95 % et de préférence encore au moins 97 % d'identité avec la séquence polypeptidique SEQ ID N° 22 ou la séquence polypeptidique SEQ ID N°23 ou la séquence polypeptidique SEQ ID N°9.

15 De manière plus particulièrement préférée, les séquences polypeptidiques selon l'invention présentent au moins 98 % d'identité et de préférence encore au moins 99 % d'identité avec la séquence polypeptidique SEQ ID N° 22 ou la séquence polypeptidique SEQ ID N°23 ou la séquence polypeptidique SEQ ID N°9.

20 Le terme séquence polypeptidique dérivée comprend également les fragments des séquences polypeptidiques indiquées ci-dessus. De tels fragments peuvent être générés de différentes façons. En particulier, ils peuvent être synthétisés par voie chimique, sur la base des séquences données dans la présente demande, en utilisant les synthétiseurs peptidiques connus de l'homme du métier. Ils peuvent également être synthétisés par voie génétique, par expression dans un hôte cellulaire d'une séquence nucléotidique codant pour le peptide recherché. Dans ce cas, la séquence
25 nucléotidique peut être préparée chimiquement en utilisant un synthétiseur d'oligonucléotides, sur la base de la séquence peptidique donnée dans la présente demande et du code génétique. La séquence nucléotidique peut également être

préparée à partir des séquences données dans la présente demande, par coupures enzymatiques, ligature, clonage, etc, selon les techniques connues de l'homme du métier, ou par criblage de banques d'ADN avec des sondes élaborées à partir de ces séquences.

5 Un autre objet de la présente invention concerne les séquences nucléotidiques codant pour les séquences polypeptidiques présentées dans les séquences SEQ ID N°22, ou SEQ ID N°23 ou SEQ ID N°9.

10 Selon un mode particulier de l'invention, les séquences nucléotidiques comprennent tout ou partie de la séquence SEQ ID N° 16 ou SEQ ID N° 21 ou de leurs dérivées.

Selon un autre mode de l'invention, les séquences nucléotidiques comprennent tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID N° 9 ou de ses dérivées.

15 Selon encore un autre mode, les séquences nucléotidiques comprennent la séquence SEQ ID N°15, ou la séquence SEQ ID N°26.

Selon un mode préféré, la séquence nucléotidique est représentée par la séquence SEQ ID N° 21 ou ses dérivées.

20 Au sens de la présente invention, le terme séquence nucléotidique dérivée désigne toute séquence différant de la séquence considérée en raison de la dégénérescence du code génétique, obtenue par une ou plusieurs modifications de nature génétique et/ou chimique, ainsi que toute séquence hybridant avec ces séquences ou des fragments de celles-ci et codant pour un polypeptide selon l'invention. Par modification de nature génétique et/ou chimique, on peut entendre toute mutation, substitution, délétion, addition et/ou modification d'un ou plusieurs
25 résidus.

Le terme séquence nucléotidique dérivée comprend également les séquences homologues à la séquence considérée, issues d'autres sources cellulaires et notamment de cellules d'origine humaine, ou d'autres organismes.

5 A cet égard la présente invention concerne toute séquence nucléotidique qui présente au moins 70 % d'identité et de préférence au moins 85 % d'identité avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°23 ou la séquence nucléotidique SED ID N°22 ou la séquence nucléotidique SEQ ID N°9.

10 De préférence, la séquence nucléotidique selon l'invention présente au moins 90 % et de préférence encore au moins 93 % d'identité avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°23 ou la séquence nucléotidique SED ID N°22 ou la séquence nucléotidique SEQ ID N°9.

15 De manière plus particulièrement préférée, les séquences selon l'invention présentent au moins 95 % et de préférence encore 97 %, voire 98 % ou même 99 % d'identité avec la séquence nucléotidique SEQ ID N°23 ou la séquence nucléotidique SED ID N°22 ou la séquence nucléotidique SEQ ID N°9.

De telles séquences homologues peuvent être obtenues par des expériences d'hybridation. Les hybridations peuvent être réalisées à partir de banques d'acides nucléiques, en utilisant comme sonde, la séquence native ou un fragment de celle-ci, dans des conditions variables d'hybridation.

20 Un autre objet de l'invention concerne des séquences nucléotidiques capables de s'hybrider dans des conditions de stringence élevée avec les séquences nucléotidiques définies ci-avant.

25 A cet égard, le terme condition de stringence élevée signifie que l'hybridation se produit si les séquences nucléotidiques présentent au moins 95 % et préférentiellement au moins 97 % d'identité.

Comme indiqué ci-avant, de telles séquences peuvent être notamment utilisées comme sondes de détection avec du RNA ou du cDNA ou du DNA génomique pour isoler des séquences nucléotidiques codant pour des polypeptides selon l'invention. De telles sondes ont généralement au moins 15 bases. De
5 préférence, ces sondes font au moins 30 bases et peuvent avoir plus de 50 bases. De manière préférée, ces sondes ont entre 30 et 50 bases.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences génomiques, d'ADNc, d'ARN, de séquences hybrides ou de séquences synthétiques ou semi-synthétiques. Ces
10 séquences peuvent être obtenues par exemple par criblage de banques d'ADN (banque d'ADNc, banque d'ADN génomique) au moyen de sondes élaborées sur la base de séquences présentées ci-avant. De telles banques peuvent être préparées à partir de cellules de différentes origine par des techniques classiques de biologie moléculaire connues de l'homme du métier. Les séquences nucléotidiques de
15 l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques. D'une manière générale les acides nucléiques de l'invention peuvent être préparés selon toute technique connue de l'homme du métier.

Au sens de la présente invention la dénomination formes oncogéniques ou
20 forme mutées oncogéniques de p53 désigne les mutants dominant-oncogéniques, dont le produit est une protéine qui a perdu la capacité de se lier à l'ADN et qui participe activement à la transformation néoplasique. Les mutants de cette catégorie ont perdu leur capacité transactivatrice et sont plus stables que la protéine sauvage. Les représentants de cette catégorie de mutants de p53 sont notamment les formes
25 mutantes H175, G281, W248, et A143.

Un autre objet de la présente invention concerne un procédé de préparation des polypeptides selon l'invention selon lequel on cultive une cellule contenant une

séquence nucléotidique selon l'invention, dans des conditions d'expression de ladite séquence et on récupère le polypeptide produit. Dans ce cas, la partie codant pour ledit polypeptide est généralement placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire. Le choix de ces signaux (promoteurs, 5 terminateurs, séquence leader de sécrétion, etc.) peut varier en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. Par ailleurs, les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent faire partie d'un vecteur qui peut être à répllication autonome ou intégratif. Plus particulièrement, des vecteurs à répllication autonome peuvent être préparés en utilisant des séquences à répllication autonome chez l'hôte choisi. S'agissant de 10 vecteurs intégratifs, ceux-ci peuvent être préparés, par exemple, en utilisant des séquences homologues à certaines régions du génome de l'hôte, permettant, par recombinaison homologue, l'intégration du vecteur.

La présente invention a également pour objet des cellules hôtes transformées avec un acide nucléique comportant une séquence nucléotidique selon l'invention. 15 Les hôtes cellulaires utilisables pour la production des peptides de l'invention par voie recombinante sont aussi bien des hôtes eucaryotes que procaryotes. Parmi les hôtes eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. 20 S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules d'insectes (SF9 ou SF21), les cellules COS, CHO, C127, de neuroblastomes humains etc. Parmi les champignons, on peut citer plus particulièrement *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma* ssp. Comme hôtes procaryotes, on préfère utiliser les bactéries suivantes *E.coli*, *Bacillus*, ou *Streptomyces*.

25 Selon un mode préféré, les cellules hôtes sont avantageusement représentées par des souches de levures recombinantes pour l'expression des acides nucléiques de l'invention ainsi que la production des protéines dérivées de ceux-ci.

Préférentiellement, les cellules hôtes comprennent au moins une séquence ou un fragment de séquence choisis parmi les séquences nucléotidiques SEQ ID N°16, N°21, N°9, N°15 et N° 26 pour la production des polypeptides selon l'invention.

- 5 Une autre application des séquences d'acides nucléiques selon l'invention est la réalisation d'oligonucléotides antisens ou d'antisens génétiques utilisables comme agents pharmaceutiques. Les séquences antisens sont des oligonucléotides de petite taille, complémentaires du brin codant d'un gène donné, et de ce fait capables d'hybrider spécifiquement avec l'ARNm transcrit, inhibant la traduction en protéine.
- 10 L'invention a ainsi pour objet les séquences antisens capables d'inhiber, au moins partiellement, l'expression de polypeptides capables d'interagir avec la p53 comme la protéine MBP1 ou la fibuline2. De telles séquences peuvent être constituées par tout ou partie des séquences nucléotidiques définies ci-avant et peuvent être obtenus par fragmentation, etc. ou par synthèse chimique.
- 15 Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être utilisées pour le transfert et la production *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo* de séquences antisens ou pour l'expression de protéines ou de polypeptides capables d'interagir avec la protéine p53.

- 20 A cet égard les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être incorporées dans des vecteurs viraux ou non viraux, permettant leur administration *in vitro*, *in vivo* ou *ex vivo*.

- Un autre objet de l'invention concerne en outre tout vecteur comprenant une séquence nucléotidique définie ci-avant. Le vecteur de l'invention peut être par exemple un plasmide, un cosmide ou tout ADN non encapsidé par un virus, un phage, un chromosome artificiel, un virus recombinant etc. Il s'agit de préférence 25 d'un plasmide ou d'un virus recombinant.

A titre de vecteurs viraux conformes à l'invention on peut tout particulièrement citer les vecteurs de type adénovirus, rétrovirus, virus adéno-associés, virus de l'herpès ou virus de la vaccine. La présente demande a également pour objet des virus recombinants défectifs comprenant une séquence nucléique
5 hétérologue codant pour un polypeptide selon l'invention.

L'invention permet également la réalisation de sondes nucléotidiques, synthétiques ou non, capables de s'hybrider avec les séquences nucléotidiques définies ci-avant ou des ARNm correspondants. De telles sondes peuvent être utilisées *in vitro* comme outil de diagnostic, pour la détection des polypeptides selon
10 l'invention et notamment de la protéine MBP1 humaine ou de la fibuline 2. Ces sondes peuvent également être utilisées pour la mise en évidence d'anomalies génétiques (mauvais épissage, polymorphisme, mutations ponctuelles, etc). Ces sondes peuvent aussi être utilisées pour la mise en évidence et l'isolement de séquences d'acides nucléiques homologues codant pour les polypeptides tels que
15 définis précédemment, à partir d'autres sources cellulaires et préférentiellement de cellules d'origines humaines. Les sondes de l'invention comportent généralement au moins 10 nucléotides, de préférence au moins 15 nucléotides, et de préférence encore au moins 20 nucléotides. Préférentiellement, ces sondes sont marquées préalablement à leur utilisation. Pour cela, différentes techniques connues de l'homme du métier
20 peuvent être employées (marquage radioactif, enzymatique, etc).

Un autre objet de l'invention réside dans des anticorps ou fragments d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux dirigés contre un polypeptide tel que défini ci-avant. De tels anticorps peuvent être générés par des méthodes connues de l'homme du métier. En particulier ces anticorps peuvent être préparés par
25 immunisation d'un animal contre un polypeptide dont la séquence est choisie parmi les séquences SEQ ID N°8 ou SEQ ID N°26 ou les séquences polypeptidiques SEQ ID N°23 ou SEQ ID N°9 ou tout fragment ou dérivé de celles-ci, puis prélèvement du

sang et isolement des anticorps. Ces anticorps peuvent également être générés par préparation d'hybridomes selon les techniques connues de l'homme de l'art.

L'invention a également pour objet des anticorps simple chaîne ScFv dérivés des anticorps monoclonaux définis ci-avant. De tel anticorps simple chaîne peuvent
5 être obtenus selon les techniques décrites dans les brevet US 4,946,778, US 5,132,405 et US 5,476,786.

Les anticorps ou fragments d'anticorps selon l'invention peuvent notamment être utilisés pour inhiber et/ ou révéler l'interaction entre la p53 et les polypeptides tels que définis ci-avant.

10 Un autre objet de la présente invention concerne un procédé d'identification de composés capables de se lier aux polypeptides selon l'invention. La mise en évidence et/ou l'isolement de ces composés, peut-être réalisée selon les étapes suivantes :

- on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes
15 molécules, éventuellement non-identifiées, avec un polypeptide de l'invention dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide et ladite molécule dans le cas où celle-ci posséderait une affinité pour ledit polypeptide, et,

- on détecte et/ou isole les molécules liées au dit polypeptide de l'invention.

Selon un mode particulier, un tel procédé permet d'identifier des molécules
20 capables de s'opposer ou de bloquer l'activité de stimulation de la croissance cellulaire des polypeptides selon l'invention et notamment de la protéine MBP1 humaine ou Fibuline 2 ou des fragments dérivés de ces protéines. Ces molécules sont également susceptibles de présenter des propriétés anti-cancéreuses et de s'opposer à la fonction d'oncogènes immortalisants que présentent MBP1 ou les polypeptides

dérivés de MBP1 qui coopèrent avec la forme activée de la protéine Ras pour la transformation cellulaire.

A cet égard, un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un ligand identifié et/ou obtenu selon le procédé décrit ci-avant comme médicament. De tels
5 ligands sont en effet susceptibles de traiter certaines affections impliquant un dysfonctionnement du cycle cellulaire et notamment les cancers.

Un autre objet de la présente invention concerne un procédé d'identification de composés capables de moduler ou d'inhiber totalement ou partiellement l'interaction entre les formes mutées oncogènes de p53 et les polypeptides selon
10 l'invention.

La mise en évidence et/ou l'isolement de modulateurs ou de ligands capables de moduler ou d'inhiber totalement ou partiellement l'interaction entre les formes mutées oncogènes de p53 et les polypeptides selon l'invention, peut-être réalisée selon les étapes suivantes :

15 - on réalise la liaison d'une forme mutée de p53 ou d'un fragment de celle-ci à un polypeptide selon l'invention ; il peut s'agir des formes mutées de p53 telles que H175, G281, W248, ou A143 ou d'un fragment de celles-ci, il s'agit préférentiellement de la forme H175 ou encore de la forme G281.

20 - on ajoute un composé à tester pour sa capacité à inhiber la liaison entre la forme mutée de p53 et les polypeptides selon l'invention ;

- on détermine si la forme mutée de p53 ou les polypeptides selon l'invention sont déplacés de la liaison ou empêchés de se lier ;

- on détecte et/ou isole les composés qui empêchent ou qui gênent la liaison entre la forme mutée de p53 et les polypeptides selon l'invention.

Dans un mode particulier, ce procédé de l'invention est adapté à la mise en évidence et/ou l'isolement d'agonistes et d'antagonistes de l'interaction entre les formes mutées de p53 et les polypeptides de l'invention. Toujours selon un mode particulier, l'invention fournit un procédé d'identification de molécules capables de bloquer l'interaction entre les formes mutées de p53 et la protéine MBP1 humaine ou fibuline 2 humaine. Un tel procédé permet d'identifier des molécules capables de s'opposer aux effets de l'action des polypeptides selon l'invention avec les formes mutées de p53. En particulier de tels composés sont susceptibles de prévenir la coopération oncogénique entre la protéine MBP1 et les formes mutantes oncogéniques de p53 telle notamment H175.

A cet égard, un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un ligand ou d'un modulateur identifié et/ou obtenu selon le procédé décrit ci-avant comme médicament. De tels ligands ou modulateurs sont en effet susceptibles de traiter certaines affections impliquant un dysfonctionnement du cycle cellulaire et notamment des cancers.

L'invention fournit également des composés non peptidiques ou non exclusivement peptidiques utilisables pharmaceutiquement. Il est en effet possible, à partir des motifs protéiques actifs décrits dans la présente demande, de réaliser des molécules inhibitrices de l'interaction de MBP1 ou de la fibuline2 avec les formes mutées oncogéniques de p53, ces molécules étant non exclusivement peptidiques et compatibles avec une utilisation pharmaceutique. A cet égard, l'invention concerne l'utilisation d'un polypeptide de l'invention tel que décrit ci-avant pour la préparation de molécules non-peptidiques, ou non exclusivement peptidiques, actives pharmacologiquement, par détermination des éléments structuraux de ce polypeptide qui sont importants pour son activité et reproduction de ces éléments par des structures non-peptidiques ou non exclusivement peptidiques. L'invention a aussi pour objet des compositions pharmaceutiques comprenant une ou plusieurs molécules ainsi préparées.

L'invention a encore pour objet toute composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un ligand obtenu selon l'un et/ou l'autre des procédés décrit ci-avant, et/ou au moins un anticorps ou fragment d'anticorps, et/ou un oligonucléotide antisens, et/ou un composé non exclusivement peptidiques
5 tels que décrits ci-avant.

Les compositions selon l'invention peuvent être utilisées pour moduler l'interaction des formes mutées oncogènes de p53 avec les polypeptides MBP1 ou Fibuline 2 et de ce fait peuvent être utilisées pour moduler la prolifération de certain type cellulaires. Plus particulièrement ces compositions pharmaceutiques sont
10 destinées au traitement des maladies impliquant un dysfonctionnement du cycle cellulaire et notamment au traitement des cancers. Il s'agit en particulier des cancers associés à la présence de mutants oncogéniques de p53.

D'autres avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent et qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

15 Légende des Figures

Figure 1 : Domaines fonctionnels de la protéine p53 sauvage. TA : Domaine activateur de la transcription; DNB : domaine de liaison à l'ADN; NLS : signal de localisation nucléaire; OL : domaine d'oligomérisation; REG : domaine de régulation.
20

Figure 2 : Interaction entre la protéine C-mbp1 et les protéines p53 et H175 en cellules mammifères.

Figure 3 : Interaction entre la protéine C-fibulin2 et les protéines p53 et H175 en
25 cellules mammifères.

Figure 4 : Comparaison des séquences protéiques codées par les ADNc mMBP1

(murine) et hMBP1 (humaine).

Figure 5 : Effets comparés des protéines C-mbp1 et mbp1 murine sur la croissance cellulaire de cellules tumorales.

5

Figure 6 : Expression de l'ARNm codant pour la protéine MBP1 chez la souris.

Figure 7 : Expression de l'ARNm codant pour la protéine MBP1 dans différents tissus humains.

10

Exemple 1 - Construction des différents fragments nucléotidiques nécessaires au criblage

1-a - Construction du cDNA codant pour la p53 sauvage humaine

15 Le gène de la p53 humaine a été cloné par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur de l'ADN d'une banque de placenta humain (Clontech) en utilisant les oligonucléotides 5'-1 et 3'-393.

Oligonucléotide 5'-1 (SEQ ID N° 1) :

AGATCTGTATGGAGGAGCCGCAG

Oligonucléotide 3'-393 (SEQ ID N° 2) :

20 AGATCTCATCAGTCTGAGTCAGGCCCTTC

Ce produit a ensuite été cloné directement après PCR dans le vecteur pCRII (Invitrogène).

25 **1-b - Construction des cDNA codant pour les différentes formes mutées de la p53 humaine**

1-b.(i) - Construction du cDNA codant pour le mutant H175 de la p53 humaine

Le cDNA portant une mutation ponctuelle sur l'acide aminé 175 de la protéine p53 humaine (Arginine -> Histidine) a été obtenu par mutagenèse dirigée sur l'ADN de p53 (décrit dans l'exemple 1-a) au moyen du kit Amersham, en utilisant l'oligonucléotide H175 de séquence :

Oligonucléotide H175 3' (SEQ ID N° 3) :

GGGGCAGTGCCTCAC

10 Ce fragment a été désigné H175.

1-b. (ii) - Construction du cDNA codant pour le mutant W248 de la p53 humaine

Le cDNA portant une mutation ponctuelle sur l'acide aminé 248 de la protéine p53 humaine (Arginine -> Tryptophane) a été obtenu par mutagenèse dirigée sur l'ADN de p53 (décrit dans l'exemple 1-a) au moyen du kit Amersham, en utilisant l'oligonucléotide W248 de séquence :

Oligonucléotide W248 3' (SEQ ID N° 4) :

GGGCCTCCAGTTCAT

20 Ce fragment a été désigné W248.

1-b (iii) - Construction du cDNA codant pour le mutant H273 de la p53 humaine

Le cDNA portant une mutation ponctuelle sur l'acide aminé 273 de la protéine p53 humaine (Aspartate -> Histidine) a été obtenu par mutagenèse dirigée sur l'ADN de p53 (décrit dans l'exemple 1-a) au moyen du kit Amersham, en utilisant l'oligonucléotide H273 de séquence :

Oligonucléotide H273 3' (SEQ ID N° 5) :

ACAAACATGCACCTC

Ce fragment a été désigné H273.

5 1-b (iv) - Construction du cDNA codant pour le mutant G281 de la p53 humaine

Le cDNA portant une mutation ponctuelle sur l'acide aminé 281 de la protéine p53 humaine (Asparagine -> Glycine) a été obtenu par mutagenèse dirigée sur l'ADN de p53 (décrit dans l'exemple 1-a) au moyen du kit Amersham, en utilisant
10 l'oligonucléotide G281 de séquence :

Oligonucléotide G281 3' (SEQ ID N° 6) :

GCGCCGGCCTCTCCC

Ce fragment a été désigné G281.

**1-c - Construction des cDNA codant pour les fragments 73-393 de la p53
15 humaine sauvage et du mutant H175**

1-c (i) - Construction du cDNA codant pour le fragment 73-393 de la p53 humaine sauvage

Cet exemple décrit la construction d'un cDNA codant pour les acides aminés 73 à 393
20 de la protéine p53 humaine sauvage (73-393wt).

Ce cDNA a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur l'ADN de p53 (décrit dans l'exemple 1-a) avec l'oligonucléotide 3'-393 (SEQ ID N° 2) et l'oligonucléotide 5'-73 suivant :

5'-73 (SEQ ID N° 7) :

25 AGATCTGTGTGGCCCCTGCACCA

1-c (ii) - Construction du cDNA codant pour le fragment 73-393 du mutant H175

5 Cet exemple décrit la construction d'un cDNA codant pour les acides aminés 73 à 393 du mutant H175 de la protéine p53 humaine (73-393H175).

Ce cDNA a été obtenu par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur l'ADN du mutant (décrit dans l'exemple 1-b) avec les oligonucléotides 3'-393 (SEQ ID N° 2) et 5'-73 (SEQ ID N° 7).

Exemple 2 - Construction des vecteurs d'expression dans la levure des fragments
10 **73-393wt et 73-393H175 fusionnés au domaine de liaison à l'ADN de la protéine Gal4 et des différentes formes de la p53 humaine entière (sauvage et mutée) fusionnées au domaine d'activation de la transcription de la protéine Gal4**

15 Cet exemple décrit la construction de vecteurs permettant l'expression dans la levure des fragments 73-393wt et 73-393H175 sous forme d'une fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de la protéine Gal4 (DB) de la levure *S. cerevisiae* pour leur utilisation dans le système double-hybride et pour le criblage de banques de cDNA fusionnés au domaine d'activation de la transcription (transactivateur) de la même protéine Gal4 (TA).

2-a - Construction des vecteurs d'expression de levure des fragments 73-393wt et
20 **73-393H175 fusionnés au domaine de liaison à l'ADN de la protéine Gal4**

Les fragments 73-393wt et 73-393H175 ont été clonés dans le vecteur pPC97 (Chevray et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 5789) en utilisant le site de reconnaissance par l'enzyme de restriction Bgl II.

Les produits de ces constructions portent les noms suivants:

73-393wt dans pPC97 --> (plasmide pMA1) --> DB-wt
 73-393H175 dans pPC97 --> (plasmide pEC16)--> DB-H175

2-b - Construction des vecteurs d'expression de levure des différentes formes de la p53 humaine entière (sauvage et mutée) fusionnées au domaine d'activation de la transcription de la protéine Gal4

Les différentes formes de la p53 humaine entière (sauvage et mutée) ont été clonées dans le vecteur pPC86 (Chevray et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 5789) en utilisant le site de reconnaissance par l'enzyme de restriction Bgl II.

Les produits de ces constructions portent les noms suivants:

10 p53 dans pPC86 --> (plasmide pEC10)--> TA-wt
 H175 dans pPC86 --> (plasmide pEC20)--> TA-H175
 H273 dans pPC86 --> (plasmide pEC87)--> TA-H273
 G281 dans pPC86 --> (plasmide pEC88)--> TA-G281

Exemple 3 - Clonage par le système double-hybride des partenaires de la protéine H175, et caractérisation de cette interaction en terme de spécificité dans la levure

Cet exemple décrit l'obtention des partenaires de la protéine H175 par le système double-hybride en utilisant la banque de cDNA d'embryon de souris pPC67 (Chevray et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 5789), et la caractérisation, à l'aide du même système double-hybride, de ces partenaires en terme de spécificité d'interaction avec les différentes formes de la protéine p53 humaine (sauvage et mutée).

3-a - Isolement des partenaires de la protéine H175

3-a (i) - Génotype de la souche YCM17

La souche YCM17 utilisée pour l'isolement des partenaires et pour la caractérisation de leur interaction avec les différentes formes de la protéine p53 humaine par le système double-hybride est une souche de levure du genre *Saccharomyces cerevisiae* qui possède le génotype suivant:

- 5 *MATa, Δgal4, Δgal80, lys2, his3, trp1, leu2, ade2, ura3, can1, met16::URA3 pGAL1-10 LacZ.*

Cette souche de levure permet de détecter une réponse positive en système double-hybride par l'apparition du phénotype Ura⁺ et/ou du double phénotype Ura⁺/LacZ⁺.

- 10 3-a (ii) - Génotype de la souche TG1

La souche TG1 utilisée pour la purification des ADN plasmidiques est une souche de bactérie du genre *E.coli* qui possède le génotype suivant:

supE, hsdD5, thi, D(lac-proAB), F'[tra D36 proA⁺B⁺ lacI^q lacZDM15]

- 3-a (iii) - Construction de la souche YMA1

- 15 La souche YCM17 a été transformée par la méthode de Gietz et al (Yeast 11 (1995) 355) avec 1μg du plasmide pMA1 permettant ainsi l'obtention de la souche YMA1 qui exprime la protéine DB-H175.

- 3-a (iv) - Isolement des partenaires de la protéine H175

- 20 La souche YMA1 a été transformée par la même méthode que celle utilisée dans l'exemple C1.3 en utilisant 100μg d'ADN de la banque pPC67, permettant l'obtention de $3,5 \cdot 10^7$ transformants parmi lesquels 404 présentent le phénotype Ura⁺ et 14 le double phénotype Ura⁺/LacZ⁺.

L'ADN plasmidique contenu dans les 14 clones présentant le double phénotype Ura⁺/LacZ⁺ a été isolé par la méthode de Ward (Nucl. Acids Res. 18 (1990) 5319)

avant d'être utilisé pour transformer la souche TG1. Les plasmides correspondants issus de la banque ont ensuite été purifiés et regroupés en deux sous-groupes de plasmides différents contenant chacun un cDNA codant pour deux protéines différentes:

5 - un cDNA codant pour la partie C-terminale (SEQ ID N° 8) d'un nouveau gène.

 - un cDNA codant pour la partie C-terminale de la fibuline 2 murine (acides aminés 863 à 1195 (SEQ ID N° 9)) (Pan et al, J. Cell. Biol. 123 (1993) 1269).

Les protéines codées par ces deux cDNA sont appelées respectivement C-mbp1 (mbp
10 = 'p53 Mutant Binding Protein') et C-fibuline2, les protéines de fusion avec le domaine d'activation de la transcription de Gal4, TA-C-mbp1 et TA-C-fibuline2 et les plasmides correspondants TA -C-MBP1 et TA-C-FIB2

3 - b - Caractérisation de l'interaction entre les protéines C-mbp1 et C-fibuline2 et la protéine H175 en terme de spécificité dans la levure

15 3 - b (i) - Caractérisation de la spécificité de l'interaction entre la protéine DB-H175 et les protéines TA-C-mbp1 et TA-C-fibuline2

Dans le but de tester la spécificité des interactions décrites dans l'exemple 3-a (iv), les plasmides pPC86, TA-C-MBP1 et TA-C-FIB2 ont été réintroduits dans la souche YCM17 par co-transformation avec différents plasmides : le plasmide pPC97 codant
20 pour la protéine DB, le plasmide pMA1 codant pour la protéine DB-H175, le plasmide pEC10 codant pour la protéine DB-wt et le plasmide pPC76 codant pour une protéine de fusion entre le domaine de liaison à l'ADN de la protéine Gal4 et un fragment de la protéine Fos humaine (acides aminés 132 à 211) (Chevray et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 (1992) 5789) (DB-Fos). Après la co-transformation, les
25 différents clones obtenus ont été testés pour les phénotypes associés aux gènes *URA3* et *LacZ*

Les résultats de cette expérience sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1: Spécificité de l'interaction entre la protéine DB-H175 et les protéines TA-C-mbp1 et TA-C-fibuline2

	TA	TA-C-mbp1	TA-C-fibuline2
DB	Ura - / LacZ-	Ura - / LacZ-	Ura - / LacZ-
DB-H175	Ura - / LacZ-	Ura + / LacZ+	Ura + / LacZ+
DB-wt	Ura - / LacZ-	Ura - / LacZ-	Ura - / LacZ-
DB-Fos	Ura - / LacZ-	Ura - / LacZ-	Ura - / LacZ-

5

Ces résultats montrent que l'interaction entre la protéine DB-H175 et les protéines TA-C-mbp1 et TA-C-fibuline2 est spécifique et qu'une telle interaction ne peut être obtenue ni avec la protéine DB seule, ni avec la protéine DB-wt ni avec la protéine contrôle DB-Fos.

10

3-b (ii) - Construction de protéines de fusion entre le domaine liaison à l'ADN de Gal4 et les protéines C-mbp1 et C-fibuline2

15 Les cDNA codant pour C-mbp1 et C-fibuline2 ont été extraits des plasmides TA-C-MBP1 et TA-C-FIB2, puis clonés dans le vecteur pPC97 en utilisant les sites de reconnaissance par les enzymes de restriction Sal I et Not I.

Les protéines de fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 ainsi obtenues sont appelées respectivement DB-C-mbp1 et DB-C-fibuline2 et les plasmides correspondants DB-C-MBP1 et DB-C-FIB2.

3-b (iii) Caractérisation de la spécificité de l'interaction entre les DB-C-mbp1 et DB-C-fibuline2 et les protéines TA-H175 et TA-G281

Dans le but de vérifier que l'interaction potentielle entre les protéines C-mbp1 et C-fibuline2 et la protéine H175 n'est pas un artefact dû à la fusion de l'un ou l'autre des partenaires avec l'un ou l'autre des domaines de Gal4, et de confirmer la spécificité de l'interaction avec la forme mutante de la protéine p53, une nouvelle expérience d'interaction dans la levure a été effectuée en utilisant des fusions différentes de celles de l'exemple 3-b (i).

Dans cette expérience, les protéines DB-C-mbp1 et DB-C-fibuline2 ont été testées contre les fusions du domaine d'activation de la transcription de Gal4 avec les formes entières de la protéine p53 (sauvage ou mutante) décrites dans l'exemple 2-b, en utilisant une souche de levure différente de la souche YCM17, la souche PCY2 (Chevray et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 5789).

Les résultats de cette expérience sont présentés dans le Tableau 2.

15

Tableau 2: Spécificité de l'interaction entre les protéines DB-C-mbp1 et DB-C-fibuline2 et les protéines TA-H175 et TA-G281

	TA	TA-wt	TA-H175	TA-H273	TA-G281
DB	LacZ -	LacZ -	LacZ -	LacZ -	LacZ -
DB-C-mbp1	LacZ -	LacZ -	LacZ +	LacZ -	LacZ +
DB-C-fibuline2	LacZ -	LacZ -	LacZ +	LacZ -	LacZ +

Ces résultats permettent d'une part de confirmer l'interaction observée lors du

criblage. D'autre part, ces résultats mettent en évidence, la spécificité de l'interaction entre les protéines C-mbp1 et C-fibuline2 et certaines formes mutées de la protéine p53. En ce qui concerne cette spécificité, il est intéressant de noter, que ces protéines n'interagissent pas avec le mutant H273. En effet, ce mutant présente une
5 conformation équivalente à celle de la protéine p53 sauvage car il est reconnu par l'anticorps PAb 1620 qui est spécifique de la forme sauvage et pas par l'anticorps PAb 240 qui est spécifique de la forme mutée (Medcalf et al, Oncogene 7 (1992) 71).

Ainsi, l'ensemble des données obtenues dans la levures montrent clairement que les deux protéines C-mbp1 et C-fibuline2 sont des partenaires potentiels
10 spécifiques des mutants oncogéniques de la protéine p53.

Exemple 4 - Interaction entre les protéines C-mbp1, C-fibuline2 et les différentes formes de la protéine p53 en cellules mammifères

15 Cet exemple décrit la construction de plasmides pour l'expression des différentes protéines en cellules mammifères et la caractérisation de l'interaction entre les protéines C-mbp1 et C-fibuline2 et les différentes formes de la protéine p53 en cellules mammifères.

20 4-a Construction des plasmides d'expression des différentes protéines en cellules mammifères

4-a (i) Construction du vecteur d'expression pBFA 107

25 Cet exemple décrit la construction d'un vecteur permettant l'expression dans des cellules mammifères de protéines portant une étiquette dérivée de la protéine c-myc (acides aminés 410-419) et reconnue par l'anticorps 9E10 (Oncogene Science). Cette construction a été effectuée en utilisant comme vecteur de base le vecteur d'expression mammifère pSV2, décrit dans DNA Cloning, A practical approach
30 Vol.2, D.M. Glover (Ed) IRL Press, Oxford, Washington DC, 1985.

Le cDNA comprenant la séquence codant pour l'étiquette c-myc ainsi qu'un multisite de clonage (MCS) a été construit à partir des 4 oligonucléotides suivants :

c-myc 5' (SEQ ID N°10):

5 GATCCATGGAGCAGAAGCTGATCTCCGAGGAGGACCTGA

c-myc 3' (SEQ ID N°11):

GATCTCAGGTCCTCCTCGGAGATCAGCTTCTGCTCCATG

MCS 5' (SEQ ID N°12):

GATCTCGGTCGACCTGCATGCAATTCCCGGGTGCGGCCGCGAGCT

10 MCS 3' (SEQ ID N°13):

CGCGGCCGCACCCGGGAATTGCATGCAGGTCGACCGA

Ces quatre oligonucléotides présentent des complémentarités deux à deux (c-myc 5' / c-myc 3', MCS 5' / MCS 3') et des complémentarités chevauchantes (c-myc 3' / MCS 5') permettant l'obtention de la séquence nucléotidique désirée par simple hybridation et ligation. Ces oligonucléotides ont été phosphorylés à l'aide de la T4 kinase, puis hybridés tous ensemble et insérés dans le vecteur d'expression pSV2 préalablement digéré par les enzymes de restriction Bgl II et Sac I. Le vecteur résultant est le vecteur pBFA 107.

20 4-a (ii) - Construction des plasmides d'expression des protéines C-mbp1 et C-fibuline2 étiquetées

Les cDNA codant pour les protéines C-mbp1 et C-fibuline2 ont été extraits des plasmides TA-C-MBP1 et TA-C-FIB2 et clonés dans le vecteur d'expression mammifère pBFA 107 en utilisant les sites de reconnaissance par les enzymes de restriction Sal I et Not I. On obtient ainsi les plasmides pBFA107-C-MBP1 et pBFA107-C-FIB2

4-a (iii) Construction des plasmides d'expression des différentes formes de la protéine p53

Les cDNA codant pour les différentes formes de la protéine p53 (wt, H175, H273 et G281) ont été insérés dans les vecteurs d'expression pSV2 et pcDNA3 (Invitrogen) en utilisant le site de reconnaissance par l'enzyme de restriction Bgl II.

4 b - Interaction entre les protéines C-mbp1 et C-fibuline2 et les différentes formes de la protéine p53 en cellules mammifères

Cet exemple décrit la mise en évidence dans des cellules mammifères de l'interaction entre les protéines C-mbp1 et C-fibuline2 et les différentes formes de la protéine p53. Ces expériences ont été effectuées par transfection transitoire et co-immunoprécipitation dans les cellules H1299 (cellules tumorales de type 'Non Small Cell Lung Cancer') déficientes pour les deux allèles de la protéine p53 (Mitsudomi et al, Oncogene 1 (1992) 171).

Les cellules (10^6) sontensemencées dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre contenant 8 ml de milieu DMEM (Gibco BRL) additionné de 10% de sérum de veau foetal inactivé à la chaleur, et cultivées sur la nuit dans un incubateur à CO₂ (5%) à 37°C. Les différentes constructions sont alors transfectées en utilisant la lipofectAMINE (Gibco BRL) comme agent de transfection de la façon suivante: 6 µg de plasmide total (3 µg de chaque plasmide codant pour chacun des deux partenaires) sont incubés avec 20 µl de lipofectAMINE (Gibco BRL) pendant 30 min avec 3 ml de milieu Opti-MEM (Gibco BRL) (mélange de transfection). Pendant ce temps, les cellules sont rincées deux fois au PBS puis incubées 4 h à 37°C avec le mélange de transfection, après quoi celui-ci est aspiré et remplacé par 8 ml de milieu DMEM additionné de 10% de sérum de veau foetal inactivé à la chaleur et les cellules remises à pousser à 37°C.

Vingt quatre heures après la transfection, les cellules sont lavées une fois en PBS puis gratées, lavées de nouveau deux fois en PBS et remises en suspension dans 200µl de tampon de lyse (HNTG: Hepes 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, glycérol 10%) additionné d'inhibiteurs de protéases (Aprotinine 2 µg/ml, 5 pepstatine 1 µg/ml, leupeptine 1 µg/ml, E64 2 µg/ml et Pefabloc 1 mM), incubées 30 min à 4°C et centrifugées 15 min à 15.000 rpm et 4°C. L'extrait cellulaire ainsi obtenu est soumis à une étape de 'pré-clearing' par incubation 1h à 4°C avec 16µl d'un sérum de lapin pré-immun, puis 30 min à 4°C avec 200µl d'immunoprecipitin (Gibco BRL) préparée selon les recommandations du fournisseur. Par la suite, 10 l'extrait cellulaire ainsi nettoyé est séparé en 3 lots égaux dont chacun est incubé la nuit à 4°C avec un anticorps différent; 3 µg d'anticorps 9E10 (anti myc), 1 µg d'anticorps DO1 (anti p53) (Oncogene Science) et 1µg d'anticorps PAb416 (anti SV40 T-Ag, utilisé comme anticorps contrôle) (Oncogene Science). Ce mélange [extrait cellulaire/anticorps] est ensuite additionné de 30µl d'immunoprecipitin et 15 incubé 30 min à 4°C avant d'être centrifugé 30 sec à 15.000 rpm. Le culot contenant l'immunoprecipitin est ensuite lavé deux fois par 1 ml de tampon HNTG additionné d'inhibiteurs de protéases, puis resuspendu dans 30 µl de tampon de dépôt sur gel d'acrylamide (Laemmli, Nature 227 (1970) 680) et incubé 5 min à 95°C. Après 20 centrifugation 15 sec à 15.000 rpm, les surnageants sont déposés sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (Novex) et les protéines séparées en utilisant le système de migration XCell II (Novex) suivant les recommandations du fournisseur, puis transférées sur membrane de PVDF (NEN Life Science Products) à l'aide du même système XCell II.

Les anticorps 9E10 et DO1 utilisés pour la révélation des protéines transférées 25 sont couplés à la biotine LCnHS (Pierce) suivant les recommandations du fournisseur.

Les membranes de transfert sont tout d'abord incubées 1 h à 4°C dans 10 ml de tampon TTBSN (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, NaN₃ 0,02%, Tween 20 0,1%) additionné de 3% d'albumine bovine sérique (BSA) (TTBSN-BSA), puis 2 h à température ambiante avec 10 ml d'une solution de TTBSN-BSA contenant

l'anticorps 9E10 biotinylé (1 µg/ml). Après 6 lavages par 10 ml de tampon TTBSN, les membranes sont ensuite incubées 1 h à température ambiante avec 10 ml d'une solution de TTBSN-BSA contenant de l'ExtrAvidin-Peroxydase (Sigma Immuno Chemicals) au 1/5000^e, lavées de nouveau 6 fois au TTBSN et traitées au réactif ECL
5 (Amersham) pour la révélation des protéines par chemiluminescence. Les mêmes membranes sont ensuite traitées par l'anticorps DO1 biotinylé après avoir été préalablement deshybridées (Ellis et al, Nature 343 (1990) 377) et en suivant le même protocole que pour l'anticorps 9E10.

10 4 - b (i) - Interaction entre la protéine C-mbp1 et les différentes formes de la protéine p53 en cellules mammifères

Dans cet exemple, les cellules H1299 ont été transfectées avec les combinaisons de plasmides suivantes avant immunoprécipitation et Western-blot :

15

pBFA107 / pBFA107-C-MBP1 (3 µg) + pSV2 / pSV2-p53 (sauvage ou mutant)
(3 µg)

De plus la combinaison suivante servant de contrôle a été effectuée :

20 pBFA107-Sam68 (3 µg) + pSV2-H175 (3 µg)

Ce contrôle sert à examiner si H175 peut ou non interagir soit avec l'étiquette myc soit avec une fusion entre l'étiquette myc et une protéine quelconque, la protéine Sam68 décrite par Lock et al (Cell 84(1996)23), n'étant pas censée interagir avec les
25 différentes formes de la protéine p53.

Les résultats de cette expérience qui sont présentés dans la Figure 2 montrent que :

- la protéine C-mbp1 peut interagir avec la protéine H175 dans des cellules mammifères

- cette interaction est bien spécifique de la protéine C-mbp1 car la protéine H175 n'interagit pas avec le contrôle myc-Sam68

4-b (ii) - Interaction entre la protéine C-fibuline2 et les différentes formes de
5 la protéine p53 en cellules mammifères

Dans cet exemple, les cellules H1299 ont été transfectées avec les combinaisons de plasmides suivantes avant immunoprécipitation et Western-blot :

10 pBFA107 / pBFA107-C-FIB2 (3 µg) + pSV2 / pSV2-p53 (sauvage ou mutant) (3 µg)

Les résultats de cette expérience qui sont présentés dans la Figure 3 montrent que la protéine C-fibuline2 peut interagir spécifiquement avec la protéine H175 dans des cellules mammifères.

15

La conclusion générale de ces expériences est que les protéines C-mbp1 et C-fibuline2 sont capables d'interagir spécifiquement en cellules mammifères avec la protéines H175. Ces résultats de même que ceux obtenus dans la levure (exemple 3) sont en accord avec :

20 1/ la classification des mutants de la protéine p53 :

- H175 et G281: dominants oncogéniques
- H273: mutant faible

2/ la classification des différentes formes de la protéine p53 en terme de conformation et de reconnaissance par des anticorps conformationnels :

- 25
- H175 et G281 : conformation mutante, PAb 1620 - / PAb 240 +
 - p53 et H273 : conformation sauvage, PAb 1620 + / Pab 240 -

L'ensemble des ces données montrent que les protéines C-mbp1 et C-fibuline2 interagissent avec les formes de la protéine p53 présentant une conformation mutée,
30 et qu'elles sont susceptibles d'avoir un effet sur des fonctions spécifiques des formes

mutées de la protéine p53.

De plus, de par la littérature, on sait qu'une fraction de la protéine p53 peut exhiber une conformation mutante dans les cellules mammifères, en particulier :

1/ la protéine p53, capable de se lier à l'ADN (Hupp et al, Nucl. Acids Res. 21
5 (1993) 3167), peut adopter une conformation mutante lorsqu'elle se lie à l'ADN
(Halazonetis et al, EMBO J. 12 (1993) 1021)

2/ la protéine p53 peut adopter deux conformations différentes au cours du
cycle cellulaire; la conformation dite 'suppresseur' (conformation sauvage, PAb 1620
+ / PAb 240 -) et la conformation dite 'promoteur' (conformation mutante, PAb 1620
10 - / PAb 240 +) (Milner & Watson, Oncogene 2 (1990) 1683).

On peut donc supposer que les protéines C-mbp1 et C-fibuline 2 sont également susceptibles d'avoir un effet sur des fonctions spécifiques de la forme sauvage de la protéine p53.

15

Exemple 5 - Effet de la protéine C-mbp1 sur la coopération oncogénique entre la protéine H175 et la protéine Ras-Val12

Cet exemple décrit les effets de la protéine C-mbp1 sur une propriété du
20 mutant oncogénique H175, sa capacité à coopérer avec la forme mutée du proto-
oncogène Ras (Ras-Val12) dans la transformation oncogénique de fibroblastes
embryonnaires de rat

Les fibroblastes embryonnaires de rat (REF) ont été préparés à partir de rats
OFA (IFA-CREDO) selon la méthode décrite par C. Finlay (Methods in Enzymology
25 255 (1995) 389). Après décongélation, les cellules ($1,5 \cdot 10^6$) sont ensemencées dans
des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre contenant 8 ml de milieu DMEM (Gibco
BRL) additionné de 10% de sérum de veau foetal et cultivées sur la nuit dans un
incubateur à CO₂ (5%) à 37°C, puis sont transfectées par les différents mélanges de
plasmides (21 µg d'ADN) en utilisant le réactif CellPfect (Pharmacia) suivant les
30 recommandations du fournisseur. 24 h après la fin de la transfection, les cellules

contenues dans chacune des boites sont grattées puis réensemencées sur trois boites de Pétri de 10 cm et cultivées pendant 15 jours avant d'être colorées au cristal violet suivant le protocole décrit par C. Finlay (Methods in Enzymology 255 (1995) 389). Les foyers de transformation sont alors visualisés et comptés.

5

Les plasmides utilisés au cours de cette série d'expériences sont les suivants:

- plasmide tampon: pSG5 (Stratagene)
- plasmide d'expression de la protéine Ras-Vall2: pEJ-Ras (Shih & Weinberg, Cell 29 (1982) 161)

10 - plasmide d'expression de la protéine c-myc entière: pSVc-myc1 (Land et al, Nature 304 (1983) 596)

- plasmide d'expression de la protéine H175: pSV2-H175 (exemple 4-a (iii))

- plasmide d'expression de la protéine C-mbp1: pBFA107-C-MBP1(exemple 4-a (ii))

15 Chaque point de transfection contient un mélange de trois plasmides à raison de 7 µg de chaque plasmide. Les résultats de deux expériences indépendantes sont reportés dans le Tableau 3.

Tableau 3. Effet de la protéine C-mbp1 sur la coopération oncogénique entre la protéine H175 et la protéine Ras-Val12

	Expérience 1	Expérience 2
contrôle	0	0
Ras-Val12	0	0
c-myc	0	NT
H175	0	NT
C-mbp1	0	NT
Ras-Val12 + c-myc	111	16 *
Ras-Val12 + c-myc + C-mbp1	113	12 *
Ras-Val12 + H175	0	16
Ras-Val12 + C-mbp1	0	3
Ras-Val12 + H175 + C-mbp1	13	30

NT: non testé *: expérience effectuée avec 3 µg de plasmide pSVc-myc1

5 Les résultats de ces expériences montrent que :

- C-mbp1 peut coopérer avec la forme activée de Ras pour la transformation des REF

- il existe une synergie entre les protéines H175 et C-mbp1 dans la coopération oncogénique avec Ras qui est spécifique de cette association car C-mbp1 ne présente

10 aucun effet sur la coopération oncogénique Ras / c-myc.

Exemple 6 - Effet des protéines C-mbp1 et C-fibuline2 et relation avec les effets des différentes formes de la protéine p53 sur la croissance cellulaire des cellules tumorales

Cet exemple décrit les effets des protéines C-mbp1 et C-fibuline2 sur la croissance cellulaire des cellules tumorales et leur relation avec les effets des différentes formes de la protéine p53 sur cette même croissance cellulaire.

5 Ces effets des protéines C-mbp1 et C-fibuline2 sur la croissance cellulaire ont été testés sur la lignée cellulaire H1299 dans une expérience de formation de colonies résistantes à la néomycine suite à la transfection par des plasmides exprimant ces protéines.

Ces expériences de transfection ont été effectuées selon le protocole décrit dans l'exemple 4-b en utilisant 10^5 cellules par point et $1,5 \mu\text{g}$ d'ADN total.

- 10 Les plasmides utilisés au cours de cette série d'expériences sont les suivants:
- plasmides d'expression des protéines p53 et H175: pSV2-p53 et pSV2-H175.
 - plasmide d'expression de la protéine C-mbp1: pBFA107-C-MBPI(exemple 4-a (ii))
 - plasmide d'expression de la protéine C-fibuline2: pBFA107-C-FIB2 (exemple 4-a (ii))
 - 15 - plasmide conférant la résistance à la néomycine: pSV2-Neo pour une quantité totale de $0,4 \mu\text{g}$

20 Protocole de formation de colonies résistantes à la néomycine : 48h après transfection, les cellules sont grattées et transférées dans 2 boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre et remises en culture avec 10 ml de milieu DMEM additionné de 10% de sérum de veau foetal inactivé à la chaleur et contenant $400 \mu\text{g/ml}$ de généticine (G418). Après une sélection de 15 jours en présence de G418, le nombre de colonies Neo^{R} est déterminé par comptage après coloration à la fuchsine.

25 Les résultats de ces expériences sont reportés dans les Tableaux 4 et 5.

Tableau 4: Effet de la protéine C-mbp1 sur la croissance cellulaire de cellules tumorales

Protéine exprimée	Nombre de colonies résistantes à la Néomycine			
	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3	moyenne
Vecteur	36 (1,00)	52 (1,00)	73 (1,00)	1,00
C-mbp1 100ng	45 (1,25)	49 (1,06)	69 (0,95)	1,09
C-mbp1 500ng	51 (1,42)	71 (1,37)	110(1,51)	1,43
C-mbp1 1000ng	70(1,94)	83 (1,60)	160 (2,19)	1,90
p53 sauvage 100ng	7 (0,19)	12 (0,23)	10 (0,14)	0,19
C-mbp1 100ng	6 (0,17)	14 (0,27)	8 (0,11)	0,18
C-mbp1 500ng	19 (0,53)	28 (0,54)	23 (0,32)	0,46
C-mbp1 1000ng	32 (0,89)	50 (0,96)	51 (0,70)	0,85
p53 sauvage 200ng	2 (0,06)	5 (0,10)	8 (0,11)	0,08
C-mbp1 100ng	2 (0,06)	4 (0,08)	6 (0,08)	0,08
C-mbp1 500ng	5 (0,14)	8 (0,15)	16 (0,22)	0,17
C-mbp1 1000ng	9 (0,25)	20 (0,38)	28 (0,38)	0,35
H175 100ng	41 (1,14)	47 (0,90)	61 (0,84)	0,96
C-mbp1 100ng	33 (0,92)	65 (1,25)	70 (0,96)	1,04
C-mbp1 500ng	67 (1,86)	101 (1,94)	123 (1,68)	1,83
C-mbp1 1000ng	162 (4,50)	128 (2,46)	316 (4,33)	3,76
H175 200ng	39 (1,08)	60 (1,15)	66 (1,10)	1,11
C-mbp1 100ng	43 (1,19)	54 (1,04)	75 (1,03)	1,10
C-mbp1 500ng	59 (1,64)	129 (2,48)	163 (2,23)	2,12
C-mbp1 1000ng	131 (3,64)	282 (5,42)	299 (4,10)	4,39

Tableau 5: Effet de la protéine C-fibuline2 sur la croissance cellulaire de cellules tumorales

Protéine exprimée	Nombre de colonies résistantes à la Néomycine			
	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3	moyenne
Vecteur	36 (1,00)	52 (1,00)	73 (1,00)	1,00
C-fibuline2 100ng	35 (0,97)	56 (1,08)	80 (1,10)	1,05
C-fibuline2 500ng	48 (1,33)	68 (1,31)	102 (1,40)	1,35
C-fibuline2 1000ng	60(1,67)	87 (1,67)	194 (2,66)	2,00
p53 sauvage 100ng	7 (0,19)	12 (0,23)	10 (0,14)	0,19
C-fibuline2 100ng	10 (0,28)	11 (0,21)	13 (0,18)	0,22
C-fibuline2 500ng	15 (0,42)	30 (0,58)	26 (0,36)	0,45
C-fibuline2 1000ng	35 (0,97)	44 (0,85)	45 (0,62)	0,81
p53 sauvage 200ng	2 (0,06)	5 (0,10)	8 (0,11)	0,09
C-fibuline2 100ng	3 (0,08)	6 (0,12)	6 (0,08)	0,09
C-fibuline2 500ng	4 (0,11)	10 (0,19)	16 (0,22)	0,16
C-fibuline2 1000ng	10 (0,28)	18 (0,35)	28 (0,38)	0,34
H175 100ng	41 (1,14)	47 (0,90)	61 (0,84)	0,96
C-fibuline2 100ng	47 (1,31)	54 (1,04)	84 (1,15)	1,17
C-fibuline2 500ng	84 (2,33)	95 (1,83)	156 (2,14)	2,10
C-fibuline2 1000ng	143 (3,97)	138 (2,65)	270 (3,70)	3,44
H175 200ng	39 (1,08)	60 (1,15)	66 (1,10)	1,11
C-fibuline2 100ng	51 (1,42)	63 (1,21)	80 (1,10)	1,24
C-fibuline2 500ng	74 (2,06)	146 (2,81)	142 (1,95)	2,27
C-fibuline2 1000ng	158 (4,39)	230 (4,42)	284 (3,89)	4,23

Les résultats de ces expériences montrent que :

- 5 - les protéines C-mbp1 et C-fibuline2 ont un effet positif sur la croissance cellulaire
- les protéines C-mbp1 et C-fibuline2 sont capables de bloquer l'effet anti-prolifératif de la protéine p53, et ce indépendamment de leur effet prolifératif

- l'effet prolifératif des protéines C-mbp1 et C-fibuline2 est fortement augmenté en présence de la protéine H175

Exemple 7 - Clonage des ADNc codant pour la forme entière des protéines mbp1 murine et humaine.

Cet exemple décrit le clonage des ADNc codant pour la protéine mbp1 murine entière et l'utilisation de ces données pour le clonage d'un homologue humain de MBP1.

7 a - Clonage de l'ADNc codant pour la forme entière de la protéine mbp1 murine

L'ADNc codant pour la partie C-terminale de la protéine mbp1 murine a été cloné par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur l'ADN de la banque SuperScript d'embryon murin (8,5 jours) (Gibco BRL) en utilisant l'oligonucléotide 3'-mMBP1 et l'oligonucléotide SP6 (Gibco BRL).

Oligonucléotide 3'-mMBP1 (SEQ ID N° 14) :
CGGTACTGGCAGAGGTAAGTGG

Cette amplification a permis d'obtenir un produit unique présentant une taille d'environ 800 paires de bases qui a ensuite été cloné directement après PCR dans le vecteur pCRII (Invitrogen) et séquencé. La séquence ainsi obtenue (SEQ ID N° 15) montre un recouvrement de 368 paires de bases avec C-MBP1 (SEQ ID N° 8) avec une identité stricte de séquence sur cette partie commune. De plus, en 5' de cette partie commune, on trouve une séquence additionnelle de 445 paires de bases présentant une phase de lecture ouverte et un codon d'initiation de la traduction.

Les deux fragments représentés par ces séquences ont ensuite été rassemblés par une ligation à trois partenaires en utilisant les sites de reconnaissance par les enzymes de restriction EcoR I, Pst I et Not I et le plasmide pBC-SK+

(STRATAGENE) permettant ainsi la reconstitution de l'ADNc MBP1 murin entier (mMBP1) (SEQ ID N° 16).

7-b Clonage de l'ADNc codant pour la forme entière de la protéine mbp1 **5 humaine**

La séquence du gène murin MBP1 a été utilisée pour une recherche d'homologie dans Genbank. Cette recherche a permis de montrer une forte homologie avec la séquence d'une EST humaine (g1548384). A partir de cette séquence, deux fragments d'ADNc ont été clonés par réaction d'amplification en chaîne (PCR) sur
10 l'ADN de la banque SuperScript de testicule humain (Gibco BRL) en utilisant les oligonucléotides 3'-hMBP1 et SP6 (Gibco BRL) d'une part, et les oligonucléotides 5'-hMBP1 et T7 (Gibco BRL) d'autre part.

Oligonucléotide 3'-hMBP1 (SEQ ID N° 17) :

CTCCGCTCCGAGGTGATGGTC

15 Oligonucléotide 5'-hMBP1 (SEQ ID N° 18) :

TGTAGCTACTCCAGCTACCTC

Ces amplifications ont permis d'obtenir deux produits présentant des tailles d'environ 1100 et 700 paires de bases qui ont ensuite été clonés directement après PCR dans le vecteur pCRII (Invitrogene) et séquencés. Les séquences ainsi obtenues
20 (SEQ ID N° 19 et SEQ ID N° 20) montrent un recouvrement de 325 paires avec une identité stricte de séquence sur cette partie commune.

Les deux fragments représentés par ces séquences ont ensuite été rassemblés par une ligation à trois partenaires en utilisant les sites de reconnaissance par les enzymes de restriction EcoR I, Nco I et Not I et le plasmide pBC-SK+
25 (STRATAGENE) permettant ainsi la reconstitution de l'ADNc MBP1 humain entier (hMBP1) (SEQ ID N° 21) présentant une phase de lecture ouverte et un codon d'initiation de la traduction.

La comparaison des séquences protéiques correspondant aux ADNc précédemment obtenus (Exemples 7-a et 7-b) (Figure 4) montre une identité stricte de 95% dans la phase ouverte de lecture supposée (après le site de démarrage de la traduction (ATG) supposé). Par contre, une absence d'identité et une très mauvaise
5 homologie sont observées entre les régions situées en amont de ce site de démarrage de la traduction (ATG) putatif. Ces données permettent donc de confirmer cette position comme démarrage de la traduction et par là même que ces deux ADNc codent bien pour les formes entières des protéines mbp1 humaine et murine (SEQ ID N° 23 et SEQ ID N° 22).

10

7 - c Construction des plasmides d'expression en cellules mammifères des formes murine et humaine de la protéine mbp1

Les ADNc codant pour les formes murine et humaine de la protéine mbp1 contenus dans le vecteur pBC SK+, ont été insérés dans les vecteurs d'expression
15 pSV2 et pcDNA3 (Invitrogen) en utilisant les sites de reconnaissance par les enzymes de restriction Hind III et Not I.

Exemple 8 - Effets comparés des protéines C-mbp1 et mbp1 murine sur la croissance cellulaire des cellules tumorales

20 Cet exemple décrit les effets comparés des protéines C-mbp1 et mbp1 murine sur la croissance cellulaire des cellules tumorales et leur relation avec les effets de la protéine H175 sur cette même croissance cellulaire.

Ces effets de la protéine mbp1 murine sur la croissance cellulaire ont été testés sur la lignée cellulaire H1299 dans une expérience de formation de colonies
25 résistantes à la néomycine suite à la transfection par des plasmides portant les ADNc codant pour ces protéines.

Ces expériences de transfection ont été effectuées selon le protocole décrit dans l'exemple D2 en utilisant 10^5 cellules par point et 1,5 μ g d'ADN total.

Les plasmides utilisés au cours de cette série d'expériences sont les suivants:

- plasmide d'expression de la protéine H175: pSV2-H175.
 - plasmide d'expression de la protéine C-mbp1: pBFA107-C-MBP1(exemple 4-a (ii))
 - plasmide d'expression de la protéine mbp1 murine: pSV2-mMBP1 (exemple 7-c)
- 5 - plasmide conférant la résistance à la néomycine: pSV2-Neo pour une quantité totale de 0,4 µg

Le protocole de formation de colonies résistantes à la néomycine utilisé est celui décrit dans l'exemple 6. Les résultats de cette expérience sont présentés dans le Tableau 6 et la Figure 5.

- 10 Tableau 6 : Effets comparés des protéines C-mbp1 et mbp1 murine sur la croissance cellulaire de cellules tumorales

Protéine exprimée	Nombre de colonies résistantes à la Néomycine	
	Expérience 1	Expérience 2
Vecteur	61 (1,00)	71 (1,00)
C-mbp1 100ng	67 (1,10)	
C-mbp1 500ng	96 (1,57)	
C-mbp1 1000ng	278 (4,56)	239 (3,37)
mbp1 100ng	94 (1,54)	
mbp1 500ng	128 (2,10)	
mbp1 1000ng	419 (6,87)	562 (7,92)
H175 200ng	65 (1,07)	69 (0,97)
C-mbp1 100ng	72 (1,18)	
C-mbp1 500ng	134 (2,20)	
C-mbp1 1000ng	397 (6,51)	341 (4,80)
mbp1 100ng	81 (1,33)	
mbp1 500ng	206 (3,38)	
mbp1 1000ng	729 (11,95)	1215 (17,11)

Les résultats de cette expérience montrent que la protéine mbp1 murine présente les mêmes caractéristiques que la protéine C-mbp1, à savoir un effet positif sur la croissance cellulaire qui est fortement augmenté en présence de la protéine
5 H175.

De plus cet effet de la protéine mbp1 est très fortement augmenté par rapport à la protéine tronquée C-mbp1.

Exemple 8 bis - Coopération oncogénique des protéines C-mbp1 et mbp1 murine et mbp1 humaine avec la protéine Ras-Val12
10

Cet exemple décrit les effets comparés des protéines C-mbp1, mbp1 murine et mbp1 humaine dans une expérience de coopération oncogénique avec la protéine Ras-Val12.

Cette coopération oncogénique a été testée sur des fibroblastes embryonnaires de rat suite à la transfection par des plasmides portant les ADNc codant pour ces
15 protéines et suivant le protocole décrit dans l'exemple 5.

Les résultats de cette expérience sont présentés dans le Tableau 7.

Tableau 7: Coopération oncogénique des protéines C-mbp1, mbp1 murine et mbp1 humaine avec la protéine Ras-Val12
20

	Expérience 1	Expérience 2
contrôle	0	0
Ras-Val12	0	0
c-myc	0	0
H175	0	0
C-mbp1	0	0
mbp1	0	0
Ras-Val12 + c-myc	31	42
Ras-Val12 + H175	10	15
Ras-Val12 + C-mbp1	4	4
Ras-Val12 + mbp1 murine	5	7
Ras-Val12 + mbp1 humaine	6	6

Les résultats de cette expérience montrent que les protéine mbp1 murine et mbp1 humaine présentent les mêmes caractéristiques que la protéine C-mbp1, à savoir la capacité de coopérer avec la protéine Ras-Val12 pour la transformation de fibroblastes embryonnaires de rat.

De façon intéressante, on note aussi que les fibroblastes ainsi transformés présentent un aspect morphologique tout à fait particulier qui diffère de celui obtenu avec l' oncogène c-myc.

10

Exemple 9 - Expression de la protéine mbp1 chez la souris et dans les tissus humains

Cet exemple décrit l'étude de l'expression de l'ARN messager de MBP1 chez la souris et dans différents tissus humains.

15

9-a Préparation des sondes

Les sondes mMBP1 et hMBP1 sont constituées par les ADNc correspondants.

La sonde GAPDH (contrôle) a été générée par réaction d'amplification en
5 chaîne (PCR) sur l'ADN de la banque SuperScript de testicule humain (Gibco BRL)
(GAPDH) en utilisant les oligonucléotides suivants :

Oligonucléotide sens-GAPDH (SEQ ID N° 24) :

CGGAGTCAACGGATTTGGTCGTAT

Oligonucléotide antisens-GAPDH(SEQ ID N° 25) :

10 AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC

Les sondes ont été radiomarquées au ^{32}P -dCTP en utilisant le kit Rediprime
(Amersham) et les recommandations du fournisseur, et les nucléotides non incorporés
ont été éliminés par chromatographie sur des colonnes MicroSpin G-25 (Pharmacia
15 Biotech). Les Northern blots utilisés lors de cette expérience ont été obtenus chez
Clontech. Les membranes ont été préhybridées avec la solution ExpressHyb
(Clontech) 45 minutes à 65°C, puis incubées 2 heures avec les sondes radiomarquées à
65°C, lavées trois fois avec du tampon 2xSSC deux fois avec du tampon 2xSSC
additionné de 0,1% de SDS et enfin lavées avec du tampon 0,2xSSC additionné de
20 0,1% de SDS jusqu'à disparition du bruit de fond. Les membranes ont ensuite été
soumises à autoradiographie et une quantification du signal a été effectuée à l'aide
d'un instantimager (Packard instruments).

9-b Expression de la protéine mbp1 chez la souris

25

Cet exemple décrit l'étude de l'expression de l'ARN messager de MBP1 chez
la souris.

Les sondes utilisées dans cette expérience sont les sondes mMBP1 et GAPDH . Les membranes utilisées dans cette expérience contiennent l'une des ARNm d'embryon de souris obtenus à différents stades du développement, et l'autre des ARNm représentatifs de différents tissus de souris adulte.

5

Les résultats de cette expérience (Figure 6) indiquent clairement que:

- 1 - un transcript unique de 1,8 kb est détecté aussi bien dans les ARNm d'embryon de souris que dans les tissus de souris adulte.
- 2 - ce messenger présente des variations de niveaux d'expression au cours du développement, avec une forte abondance dans les stades précoces (7 jours) puis une diminution importante (11 jours) pour atteindre un niveau apparemment constant.
- 3 - ce messenger est modérément exprimé dans l'ensemble des tissus adultes testé à l'exception d'une expression importante dans le poumon et les testicules.

15

Un tel niveau d'expression de transcript élevée dans une phase du développement embryonnaire ainsi que dans des tissus présentant un taux de croissance élevé, confirme l'implication du produit du gène MBP1 dans les processus de croissance cellulaire mise en évidence dans les exemples 5, 6 et 7.

20 9-c Expression de la protéine mbp1 dans les tissus humains

Cet exemple décrit l'étude de l'expression de l'ARN messenger de MBP1 dans différents tissus humains.

Les sondes utilisées dans cette expérience sont les sondes hMBP1 et GAPDH .

25

Les membranes utilisées contiennent des ARNm représentatifs de différents tissus humain.

Les résultats de cette expérience (Figure 7) indiquent clairement que:

- 1 - deux transcripts de 1,5 et 1,8 kb sont détectés dans les tissus humains.

2 - ces messagers sont modérément exprimés dans l'ensemble des tissus testés et leur profil d'expression est comparable à celui du messenger murin (forte expression dans le poumon et les testicules).

5 Ces résultats montrent que:

- il peut exister deux formes différentes de la protéine mbp1 humaine avec possibilité d'épissage alternatif du messenger.

- les ARNm codant pour la(les) protéine(s) mbp1 humaine(s) tout comme leur homologue murin présentent un niveau d'expression élevé dans des tissus à taux de croissance élevé, et que le(s) produit(s) du gène MBP1 humain pourrait(ent) donc
10 aussi être impliqué(s) dans les processus de croissance cellulaire.

Les résultats présentés dans les différents exemples montrent que les protéines C-mbp1, mbp1 et C-fibuline2 interagissent spécifiquement avec les formes mutantes
15 de la protéine p53 et que ces interactions conduisent à une synergie entre ces protéines et les mutants oncogéniques de la protéine p53 que ce soit pour la coopération oncogénique avec la forme activée de la protéine Ras ou pour l'effet prolifératif.

De plus, les protéines C-mbp1, mbp1 et C-fibuline2 présentent une activité
20 proliférative intrinsèque, et la protéine C-mbp1 agit comme un oncogène immortalisant en coopérant avec la forme activée de la protéine Ras pour la transformation cellulaire.

Les résultats présentés dans les différents exemples montrent que les protéines ou polypeptides C-mbp1, mbp1 et C-fibuline2 interagissent spécifiquement avec les
25 formes mutantes de la protéine p53 et que ces interactions conduisent à une synergie entre ces protéines et les mutants oncogéniques de la protéine p53 que ce soit pour la coopération oncogénique avec la forme activée de la protéine Ras ou pour l'effet prolifératif.

De plus, les protéines C-mbp1, mbp1 et C-fibuline2 présentent une activité proliférative intrinsèque, et les protéines C-mbp1 et mbp1 agissent comme des oncogènes immortalisants en coopérant avec la forme activée de la protéine Ras pour la transformation cellulaire.

- 5 Ces propriétés confèrent à mbp1 un rôle potentiel d'oncogène. Dans au moins un des test (exemple 8 bis) la protéine mbp1 présente des propriétés oncogéniques accrues par rapport au polypeptide c-MBP1.

Enfin, la forte homologie présentée par les protéines mbp1 humaine et murine (95% d'identité stricte), et la similarité d'expression tissulaire de leurs messagers respectifs, permettent de conclure que la protéine mbp1 humaine, qui pourrait être
10 présente sous forme de deux variants différents (2 messagers distincts), possède(ent) des propriétés analogues à celles de son homologue murine.

En conclusion, ces résultats décrivent la caractérisation d'une nouvelle protéine murine, mbp1, et de son(ses) homologue(s) humaine(s), qui présente des
15 propriétés oncogéniques et qui interagit spécifiquement avec les formes mutées de la protéine p53. Cette interaction qui se traduit par un accroissement des propriétés oncogéniques de mbp1, pourrait constituer un élément fondamental de la capacité oncogénique de ces mutants de la protéine p53.

De telles propriétés semblent aussi partagées par une autre protéine présentant
20 des homologies avec mbp1, la fibuline 2. Cette protéine faisant partie d'une famille plus large, on peut envisager que ces propriétés puissent être étendues à l'ensemble des membres de la famille des fibulines.

Ces interactions montrant une forte synergie entre les pouvoirs oncogéniques des protéines mbp1, fibuline2 et mutants p53, elles constituent un point d'action
25 potentiel dans le traitement des cancers liés aux mutations de la protéine p53. De plus, les protéines mbp1 et fibuline2 qui présentent des propriétés oncogéniques intrinsèques constituent des cibles potentielles pour le traitement du cancer en général.

LISTE DE SEQUENCES

- 5 SEQ ID N° 1:
AGATCTGTATGGAGGAGCCGCAG
- SEQ ID N° 2:
AGATCTCATCAGTCTGAGTCAGGCCCTTC
- 10 SEQ ID N° 3:
GGGGCAGTGCCTCAC
- SEQ ID N° 4:
15 GGGCCTCCAGTTCAT
- SEQ ID N° 5:
ACAAACATGCACCTC
- 20 SEQ ID N° 6:
GCGCCGGCCTCTCCC
- SEQ ID N° 7:
AGATCTGTGTGGCCCCTGCACCA
- 25
- SEQ ID N° 8: séquence nucléotidique et polypeptidique
fragment C-term de MBP1 murine
- 30 SEQ ID N° 8:
1/1 31/11
TGC ACC TGC CCT GAT GGT TAC CGA AAA ATT GGA CCC GAA TGT GTG GAC ATA GAT GAG TGT
C T C P D G Y R K I G P E C V D I D E C
- 61/21 91/31
35 CGT TAC CGC TAT TGC CAG CAT CGA TGT GTG AAC CTG CCG GGC TCC TTT CGA TGC CAG TGT
R Y R Y C Q H R C V N L P G S F R C Q C
- 121/41 151/51
GAG CCA GGC TTC CAG TTG GGA CCT AAC AAC CGC TCT TGT GTG GAT GTG AAT GAG TGT GAC
E P G F Q L G P N N R S C V D V N E C D
- 181/61 211/71
40 ATG GGA GCC CCA TGT GAG CAG CGC TGC TTC AAC TCC TAT GGG ACC TTC CTG TGT CGC TGT
M G A P C E Q R C F N S Y G T F L C R C

GAG GGC TCT GAA TGT GTG GAT GTG AAT GAG TGT GAG ACA GGT GTG CAT CGC TGT GGC GAG
 E G S E C V D V N E C E T G V H R C G E
 61/21 91/31
 GGC CAA CTG TGC TAT AAC CTC CCT GGA TCC TAC CGC TGT GAC TGC AAG CCC GGC TTC CAG
 5 G Q L C Y N L P G S Y R C D C K P G F Q
 121/41 151/51
 AGG GAT GCA TTC GGC AGG ACT TGC ATT GAT GTG AAC GAA TGC TGG GTC TCG CCG GGC CGC
 R D A F G R T C I D V N E C W V S P G R
 181/61 211/71
 10 CTG TGC CAG CAC ACA TGT GAG AAC ACA CCG GGC TCC TAC CGC TGC TCC TGC GCT GCT GGC
 L C Q H T C E N T P G S Y R C S C A A G
 241/81 271/91
 TTC CTT TTG GCC GCA GAT GGC AAA CAT TGT GAA GAT GTG AAC GAG TGC GAG ACT CGG CGC
 F L L A A D G K H C E D V N E C E T R R
 15 301/101 331/111
 TGC AGC CAG GAA TGT GCC AAC ATC TAT GGC TCC TAT CAG TGC TAC TGC CGT CAG GGC TAC
 C S Q E C A N I Y G S Y Q C Y C R Q G Y
 361/121 391/131
 CAG CTG GCA GAG GAT GGG CAT ACC TGC ACA GAC ATC GAT GAG TGT GCA CAG GGC GCG GGC
 20 Q L A E D G H T C T D I D E C A Q G A G
 421/141 451/151
 ATT CTC TGT ACC TTC CGC TGT GTC AAC GTG CCT GGG AGC TAC CAG TGT GCA TGC CCA GAG
 I L C T F R C V N V P G S Y Q C A C P E
 481/161 511/171
 25 CAA GGG TAT ACA ATG ATG GCC AAC GGG AGG TCC TGC AAG GAC CTG GAT GAG TGT GCA CTG
 Q G Y T M M A N G R S C K D L D E C A L
 541/181 571/191
 GGC ACC CAC AAC TGC TCT GAG GCT GAG ACC TGC CAC AAT ATC CAG GGG AGT TTC CGC TGC
 G T H N C S E A E T C H N I Q G S F R C
 30 601/201 631/211
 CTG CGC TTT GAT TGT CCA CCC AAC TAT GTC CGT GTC TCA CAA ACG AAG TGC GAG CGC ACC
 L R F D C P P N Y V R V S Q T K C E R T
 661/221 691/231
 ACA TGC CAG GAT ATC ACG GAA TGT CAA ACC TCA CCA GCT CGC ATC ACG CAC TAC CAG CTC
 35 T C Q D I T E C Q T S P A R I T H Y Q L
 721/241 751/251
 AAT TTC CAG ACA GGC CTA CTG GTA CCT GCA CAT ATC TTC CGC ATC GGC CCT GCT CCC GCC
 N F Q T G L L V P A H I F R I G P A P A
 781/261 811/271
 40 TTT GCT GGG GAC ACC ATC TCC CTG ACC ATC ACG AAG GGC AAT GAG GAG GGC TAC TTC GTC
 F A G D T I S L T I T K G N E E G Y F V
 841/281 871/291
 ACA CGC AGA CTC AAT GCC TAC ACT GGT GTG GTA TCC CTG CAG CGG TCT GTT CTG GAG CCG
 T R R L N A Y T G V V S L Q R S V L E P

901/301 931/311
 CGG GAC TTT GCC CTA GAT GTG GAG ATG AAG CTT TGG CGC CAG GGC TCT GTC ACT ACC TTC
 R D F A L D V E M K L W R Q G S V T T F

961/321 991/331
 5 CTG GCC AAG ATG TAC ATC TTC TTC ACC ACT TTT GCC CCA TGA GGTGACATGT CAGGCAATCCCTCC
 L A K M Y I F F T T F A P *

AGGTGATGCCTGGGCGGTGGGCAGCTGCGCCACTCCTAAGTGGCTTTTGTCTGTGACTCTGTAACCTAACTTAATCATGC
 TGAGCTGGTTGGTCTTGAGTCTCTACCCTAGAGGGAGGAGATGCACCCAGCAGGCACTGAGTACAGGCCAGGGTCACC
 CGAGGCTAGATGGTACCTGCAAACCTGGAACAGCCATAGGGGCTTCTGAACTCCACTCCTCAACTATGGCTACAGCTG
 10 ACATTCCATTCCCTCATCCACTGTGTTCCCTCAATTAATAAAAAAAAAAATCAGCTGTGCATGGTAGCACAGACCTTTAATCCT
 AGCACTGGGAGGCAGAGGTAGGTAGATCTCTGAGTTCAGGCCAGCCTGGTCTACACTGGGAGTTCTAACCAGCCAGAG
 CTACATAGAGAGACCCTATCTCAACAAGGAAAAACGAAAGAAATCTCTGTGAGTTCAGGCCAGCCTGGTCTACGCTGG
 GAGTTCTAACCAGCCAGACTACATAGAGAGATCCTATCTCAACAAGGAAAAATGAAAGAAATCATTTTAAAGGTTTTT
 TTTTTGTCTGTTGTTGTTAATGATAAGAGTAGCACATATACATTATTAATAATGATCAAAATAGCACAGAAAGGTTA

15
 SEQ ID N°10:
 GATCCATGGAGCAGAAGCTGATCTCCGAGGAGGACCTGA

SEQ ID N°11:
 20 GATCTCAGGTCCTCCTCGGAGATCAGCTTCTGCTCCATG

SEQ ID N°12:
 GATCTCGGTGACCTGCATGCAATCCCGGGTGC GGCCGCGAGCT

25
 SEQ ID N°13:
 CGCGCCGCACCCGGAAATTGCATGCAGGTGACCGA

SEQ ID N° 14:
 CGGTACTGGCAGAGGTAACCTGG

30
 SEQ ID N°15: séquence nucléotidique partielle MBP1 murine

SEQ ID N° 15:
 GCTGTGGCAGAAACCCCTGACTTCTGCCACCACCTCCAGCCTCAGGATGCTCCCTTTTGCTCCTGCCTCCCCGGGTCTTTGCT
 35 GCTCTGGGCGTTTCTGCTGTTGCTCTTGGGAGCAGCGTCCCCACAGGATCCCGAGGAGCCGGACAGCTACACGGAATGCACAGATG
 GCTATGAGTGGGATGCAGACAGCCAGCACTGCCGGGATGTCAACGAGTGCCTGACCATCCCGGAGGCTTGCAAGGGTGAGATGAAA
 TGCATCAACCACTACGGGGTTATTTGTGTCTGCCTCGCTCTGTGCGCTCATCAGTGATCTCCATGGTGAAGGACCTCCACCGCC
 AGCGGCCATGCTCAACAACCAACCCCTTGCCCGCAGGGCTACGAGCCTGATGAACAGGAGAGCTGTGTGGATGTGGACGAGTGTA
 CCCAGGCTTTGCATGACTGTGCGCCCTAGTCAGGACTGCCATAACCTTCTGCTCCTACCAGTGCACCTGCCCTGATGGTTACCGA
 40 AAAATGGACCCGAATGTGTGGACATAGATGAGTGTGCTTACCCTATTGCCAGCATCGATGTGTGAACCTGCCGGGCTCTTTTCTG
 ATGCCAGTGTGAGCCAGGCTTCCAGTTGGGACCTAACCAACCGCTCTTGTGTGGATGTGAATGAGTGTGACATGGGAGCCCATGTG
 AGCAGCGCTGCTTCAACTCCTATGGGACCTTCTGTGTGCTGTAACAGGGCTATGAGCTGCACCGGGATGGCTTCTCTGCAGC
 GATATCGATGAGTGGGCTACTCCAGTTACCTCTGCCAGTACC

SEQ ID N°16: séquence nucléotidique MBP1 murine

SEQ ID N° 16:

5 GCTGTGGCAGAAACCCCTGACTTCTGCCACCACCTCCCAGCCTCAGGATGCTCCCTTTTGCCTCCTGCCTCCCCGGGTCTTTGCT
 GCTCTGGGCGTTTCTGCTGTGCTCTTGGGAGCAGCGTCCCCACAGGATCCCAGGAGCCGGACAGCTACACGGAATGCACAGATG
 GCTATGAGTGGGATGCAGACAGCCAGCACTGCCGGGATGTCAACGAGTGCCTGACCATCCCAGGAGCTTGCAAGGGTGAATGAAA
 TGCATCAACCACTACGGGGTTATTTGTGCTGCTCGCTCTGCTGCCGTCACTAGTATCTCCATGGTGAAGACCTCCACCGCC
 10 AGCGGCCCATGCTCAACAACCAACCCCTGCCCGCAGGGCTACGAGCCTGATGAACAGGAGAGCTGTGTGGATGTGGACGAGTGTA
 CCCAGGCTTTGCATGACTGTGCCCTAGTCAGGACTGCCATAACCTTCTGGCTCCTACCAGTGCACCTGCCCTGATGGTTACCGA
 AAAATGGACCCGAATGTGTGGACATAGATGAGTGTGTTACCGCTATTGCCAGCATCGATGTGTGAACCTGCCGGGCTCTTTTCG
 ATGCCAGTGTGAGCCAGGCTTCCAGTTGGGACCTAACCAACCGCTCTTGTGTGGATGTGAATGAGTGTGACATGGGAGCCCATGTG
 AGCAGCGCTGCTTCAACTCCTATGGACCTTCTGTGTCGCTGTAACAGGGCTATGAGCTGCACCGGGATGGCTTCTCCTGCAGC
 GATATCGATGAGTGGCTACTCCAGTTACCTTGCAGTACCGCTGTGTCAACGAGCCAGGCCGATTCTCCTGTCACTGCCACA
 15 AGGCTACCAGCTGTGGCTACAAGGCTCTGCCAAGATATTGACGAGTGTGAAACAGGTGCACACCAATGTTCTGAGGCCCAAACCT
 GTGTCAACTTCCATGGGGTTTACCGCTGTGTGGACCAACCGTTGTGTGGAGCCCTATGTCCAAGTGTGAGACAACCGCTGCCTC
 TGCCCTGCCTCCAATCCCCTTTGTGAGAGCAGCCTTCATCCATTGTGCACCGCTACATGAGCATCACCTCAGAGCGAAGTGTGCC
 TGCTGACGTGTTTCAGATCCAGGCAACCTCTGTCTACCTGGTGCCTACAATGCCTTTCAGATCCGTTCTGGAACACACAGGGGG
 ACTTCTACATTAGGCAAATCAACAATGTCAGCGCCATGCTGGTCTCGCCAGGCCAGTGACGGGACCCCGGGAGTACGTGCTGGAC
 20 CTGGAGATGGTCACCATGAATCCCTTATGAGCTACCGGCCAGCTCTGTACTGAGACTCACGGTCTTTGTGGGAGCCTATACCTT
 CTGAAGACCTCAGGGAAGGGCCATGTGGGGCCCCCTCCCCCTCCCATAGCTTAAGCAGCCCCGGGGCCCTAGGGATGACCGTTCT
 TGCTTAAAGGAACATATGATGTGAAGGACAATAAAGGGAGAAAGAAGGAAAA

SEQ ID N° 17:

25 CTCCGCTCCGAGGTGATGGTC

SEQ ID N° 18:

TGTAGCTACTCCAGCTACCTC

SEQ ID N°19: séquence nucléotidique partielle MBP1 humaine

SEQ ID N° 19:

30 AAGCCAGCCGAGCCGCCAGAGCCGCGGGCCGCGGGGTGTCGCGGGCCCAACCCAGGATGCTCCCCTGCGCCTCCTGCCTACCCG
 GGTCTCTACTGCTCTGGGCGTGTACTGTTGCTCTTGGGATCAGCTTCTCCTCAGGATTCTGAAGAGCCCGACAGCTACACGGAA
 TGCACAGATGGCTATGAGTGGGACCCAGACAGCCAGCACTGCCGGGATGTCAACGAGTGTCTGACCATCCCTGAGGCCTGCAAGGG
 GGAATGAAGTGCATCAACCACTACGGGGGCTACTTGTGCTGCCCCGCTCCGCTGCCGTATCAACGACCTACACGGCGAGGGAC
 CCCCCCACCAGTGCCTCCCCTCAACACCCCAACCCCTGCCACCAGGCTATGAGCCCGACGATCAGGACAGCTGTGTGGATGTG
 35 GACGAGTGTGCCAGGCCCTGCACGACTGTGCCCCAGCCAGGACTGCCATAACTTGCTGGCTCCTATCAGTGCACCTGCCCTGA
 TGGTTACCGCAAGATCGGGCCGAGTGTGTGGACATAGACGAGTCCCGTACCCTACTGCCAGCACCGTGCCTGAACTGCCTG
 GCTCCTTCCGCTGCCAGTGCAGCCGGGCTTCCAGCTGGGGCTAACCAACCGCTCCTGTGTTGATGTGAACGAGTGTGACATGGGG
 GCCCCATGCGAGCAGCGTCTCAACTCCTATGGGACCTTCTGTGTCGCTGCCACCAGGGCTATGAGCTGCATCGGGATGGCTT
 CTCTGCAGTGATATGATGAGTGTAGCTACTCCAGCTACCTCTGTGCTGACGCTGCCGTCAACGAGCCAGGCCGCTTCTCCTGCC

ACTGCCACAGGGTTACCAGCTGCTGGCCACACGCCTCTGCCAAGACATTGATGAGTGTGAGTCTGGTGCACACCAGTGCTCCGAG
 GCCAAAACCTGTGTCAACTTCCATGGGGCTACCGCTGCGTGGACACCAACCGCTGCGTGGAGCCCTACATCCAGGTCTCTGAGAA
 CCGCTGTCTCTGCCCGCCTCAACCCTCTATGTCGAGAGCAGCCTTCCATCCATTGTGCACCGCTACATGACCATCACCTCGGAGC
 GGAG

5 SEQ ID N° 20: séquence nucléotidique partielle MBP1 humaine

SEQ ID N° 20:

TGTAGCTACTCCAGCTACCTCTGTCTCAGTACCGCTGCGTCAACGAGCCAGGCCGTTTCTCCTGCCACTGCCACAGGGTTACCAGCT
 GCTGGCCACACGCCTCTGCCAAGACATTGATGAGTGTGAGTCTGGTGCACACCAGTGCTCCGAGGCCAAAACCTGTGTCAACTTCC
 ATGGGGGCTACCGCTGCGTGGACACCAACCGCTGCGTGGAGCCCTACATCCAGGTCTCTGAGAACCGTGTCTCTGCCCGCCTCC
 10 AACCTCTATGTCGAGAGCAGCCTTCCATCCATTGTGCACCGCTACATGACCATCACCTCGGAGCGGAGCGTGCCCGCTGACGTGTT
 CCAGATCCAGGGCAGCTCCGTCTACCCCGTGCCTACAATGCCTTTTCAGATCCGTGCTGGAACTCGCAGGGGGACTTTTACATTA
 GGCAAATCAACAACGTCAAGCCATGCTGGTCTCGCCCGCCGCTGACGGGCCCGGGAGTACGTGCTGGACCTGGAGATGGTC
 ACCATGAATTCCTCATGAGCTACCGGCCAGTCTGTACTGAGGCTCACCGTCTTTGTAGGGCCCTACACCTTCTGAGGAGCAGG
 AGGGAGCCACCCTCCCTGCAGCTACCCTAGCTGAGGAGCCTGTTGTGAGGGGCAGAATGAGAAAGGCAATAAAGGGAGAAAG

15 SEQ ID N° 21: séquence nucléotidique MBP1 humaine

SEQ ID N° 21:

AAGCCAGCCGAGCCGCCAGAGCCGCGGGCCGCGGGGTGTCGCGGGCCCAACCCAGGATGCTCCCTGCGCCTCCTGCCTACCCG
 GGTCTCTACTGCTCTGGGCGTCTACTGTTGCTCTTGGGATCAGCTTCTCCTCAGGATTCTGAAGAGCCCGACAGTACACGGAA
 TGCACAGATGGCTATGAGTGGGACCCAGACAGCCAGCACTGCCGGATGTCAACGAGTGTCTGACCATCCCTGAGGCCTGCAAGGG
 20 GGAAATGAAGTGCATCAACCACTACGGGGGCTACTTGTGCCTGCCCGCTCCGCTGCCGTCATCAACGACCTACACGGCGAGGGAC
 CCCCACCAGTGCCTCCCGCTCAACACCCCAACCCCTGCCACCAGGCTATGAGCCCGACGATCAGGACAGCTGTGTGGATGTG
 GACGAGTGTGCCAGGCCCTGCACGACTGTGCCCCAGCCAGGACTGCCATAACTTGCCTGGCTCCTATCAGTGCACCTGCCTGA
 TGGTTACCGCAAGATCGGGCCCGAGTGTGTGGACATAGACGAGTGGCGCTACCGCTACTGCCAGCACCGCTGCGTGAACCTGCCTG
 GCTCCTTCCGCTGCCAGTGCAGCCGGGCTTCAGCTGGGGCTAACAACCGCTCCTGTGTTGATGTGAACGAGTGTGACATGGGG
 25 GCCCCATGCGAGCAGCGCTGCTTCAACTCCTATGGGACCTTCTGTGTGCTGCCACCAGGGCTATGAGCTGCATCGGGATGGCTT
 CTCCTGCAGTGATATTGATGAGTGTAGTACTCCAGCTACCTCTGTGAGTACCGCTGCGTCAACGAGCCAGGCCGTTTCTCCTGCC
 ACTGCCACAGGGTTACCAGCTGCTGGCCACACGCCTCTGCCAAGACATTGATGAGTGTGAGTCTGGTGCACACCAGTGCTCCGAG
 GCCAAAACCTGTGTCAACTTCCATGGGGCTACCGCTGCGTGGACACCAACCGCTGCGTGGAGCCCTACATCCAGGTCTCTGAGAA
 CCGCTGTCTCTGCCCGCCTCAACCCTCTATGTCGAGAGCAGCCTTCCATCCATTGTGCACCGCTACATGACCATCACCTCGGAGC
 30 GGAGCGTGCCCGCTGACGTGTTCCAGATCCAGGCGACCTCCGTCTACCCCGGTGCTACAATGCCTTTTCAGATCCGTGCTGGAAAC
 TCGCAGGGGGACTTTTACATTAGGCAAATCAACAACGTCAAGCCATGCTGGTCTCCTGCCCGCCGGTACGGGGCCCCGGGAGTA
 CGTGTGACCTGGAGATGGTCAACATGAATTCCTCATGAGCTACCGGCCAGCTCTGTAAGGCTCACCGTCTTTGTAGGGG
 CCTACACCTTCTGAGGAGCAGGAGGGAGCCACCCTCCTGAGCTACCCTAGCTGAGGAGCCTGTTGTGAGGGGCAGAATGAGAA
 35 GGCAATAAAGGGAGAAAG

SEQ ID N° 22 : séquence nucléotidique et polypeptidique MBP murine

SEQ ID N° 22:

1/1

GCTGTGGCAGAAACCCCTGACTTCTGCCACCACCTCCCAGCCTCAGG ATG CTC CCT TTT GCC TCC TGC CTC
M L P F A S C L

25/9 55/19

5 CCC GGG TCT TTG CTG CTC TGG GCG TTT CTG CTG TTG CTC TTG GGA GCA GCG TCC CCA CAG
P G S L L L W A F L L L L L G A A S P Q

85/29 115/39

GAT CCC GAG GAG CCG GAC AGC TAC ACG GAA TGC ACA GAT GGC TAT GAG TGG GAT GCA GAC
D P E E P D S Y T E C T D G Y E W D A D

10 145/49 175/59

AGC CAG CAC TGC CGG GAT GTC AAC GAG TGC CTG ACC ATC CCG GAG GCT TGC AAG GGT GAG
S Q H C R D V N E C L T I P E A C K G E

205/69 235/79

ATG AAA TGC ATC AAC CAC TAC GGG GGT TAT TTG TGT CTG CCT CGC TCT GCT GCC GTC ATC
15 M K C I N H Y G G Y L C L P R S A A V I

265/89 295/99

AGT GAT CTC CAT GGT GAA GGA CCT CCA CCG CCA GCG GCC CAT GCT CAA CAA CCA AAC CCT
S D L H G E G P P P P A A H A Q Q P N P

325/109 355/119

20 TGC CCG CAG GGC TAC GAG CCT GAT GAA CAG GAG AGC TGT GTG GAT GTG GAC GAG TGT ACC
C P Q G Y E P D E Q E S C V D V D E C T

385/129 415/139

CAG GCT TTG CAT GAC TGT CGC CCT AGT CAG GAC TGC CAT AAC CTT CCT GGC TCC TAC CAG
25 Q A L H D C R P S Q D C H N L P G S Y Q

445/149 475/159

TGC ACC TGC CCT GAT GGT TAC CGA AAA ATT GGA CCC GAA TGT GTG GAC ATA GAT GAG TGT
C T C P D G Y R K I G P E C V D I D E C

505/169 535/179

CGT TAC CGC TAT TGC CAG CAT CGA TGT GTG AAC CTG CCG GGC TCT TTT CGA TGC CAG TGT
30 R Y R Y C Q H R C V N L P G S F R C Q C

565/189 595/199

GAG CCA GGC TTC CAG TTG GGA CCT AAC AAC CGC TCT TGT GTG GAT GTG AAT GAG TGT GAC
E P G F Q L G P N N R S C V D V N E C D

625/209 655/219

35 ATG GGA GCC CCA TGT GAG CAG CGC TGC TTC AAC TCC TAT GGG ACC TTC CTG TGT CGC TGT
M G A P C E Q R C F N S Y G T F L C R C

685/229 715/239

AAC CAG GGC TAT GAG CTG CAC CGG GAT GGC TTC TCC TGC AGC GAT ATC GAT GAG TGC GGC
N Q G Y E L H R D G F S C S D I D E C G

40 745/249 775/259

TAC TCC AGT TAC CTC TGC CAG TAC CGC TGT GTC AAC GAG CCA GGC CGA TTC TCC TGT CAC
Y S S Y L C Q Y R C V N E P G R F S C H

805/269 835/279

TGC CCA CAA GGC TAC CAG CTG CTG GCT ACA AGG CTC TGC CAA GAT ATT GAC GAG TGT GAA

C P Q G Y Q L L A T R L C Q D I D E C E
 865/289 895/289
 ACA GGT GCA CAC CAA TGT TCT GAG GCC CAA ACC TGT GTC AAC TTC CAT GGG GGT TAC CGC
 T G A H Q C S E A Q T C V N F H G G Y R
 5 925/309 955/319
 TGT GTG GAC ACC AAC CGT TGT GTG GAG CCC TAT GTC CAA GTG TCA GAC AAC CGC TGC CTC
 C V D T N R C V E P Y V Q V S D N R C L
 985/329 1015/339
 TGC CCT GCC TCC AAT CCC CTT TGT CGA GAG CAG CCT TCA TCC ATT GTG CAC CGC TAC ATG
 10 C P A S N P L C R E Q P S S I V H R Y M
 1045/349 1075/359
 AGC ATC ACC TCA GAG CGA AGT GTG CCT GCT GAC GTG TTT CAG ATC CAG GCA ACC TCT GTC
 S I T S E R S V P A D V F Q I Q A T S V
 1105/369 1135/379
 15 TAC CCT GGT GCC TAC AAT GCC TTT CAG ATC CGT TCT GGA AAC ACA CAG GGG GAC TTC TAC
 Y P G A Y N A F Q I R S G N T Q G D F Y
 1165/389 1195/399
 ATT AGG CAA ATC AAC AAT GTC AGC GCC ATG CTG GTC CTC GCC AGG CCA GTG ACG GGA CCC
 I R Q I N N V S A M L V L A R P V T G P
 1225/409 1255/419
 CGG GAG TAC GTG CTG GAC CTG GAG ATG GTC ACC ATG AAT TCC CTT ATG AGC TAC CGG GCC
 R E Y V L D L E M V T M N S L M S Y R A
 1285/429 1315/439
 AGC TCT GTA CTG AGA CTC ACG GTC TTT GTG GGA GCC TAT ACC TTC TGA AGACCCTCAGGGAAG
 25 S S V L R L T V F V G A Y T F *
 GGCCATGTGGGGGCCCCCTTCCCCTCCCATAGCTTAAGCAGCCCTGGGGGCCTAGGGATGACCGTTCTGCTTAAAGGA
 ACTATGATGTGAAGGACAATAAAGGGAGAAAGAAGGAAAA

30 SEQ ID N° 23 : séquence nucléotidique et polypeptidique MBP 1
 humaine

SEQ ID N° 23:

1/1

35 AAGCCAGCCGAGCCGCCAGAGCCGCGGGCCGCGGGGTGTCGCGGGCCCAACCCAGG ATG CTC CCC TGC GCC
 M L P C A
 16/6 46/16
 TCC TGC CTA CCC GGG TCT CTA CTG CTC TGG GCG CTG CTA CTG TTG CTC TTG GGA TCA GCT
 S C L P G S L L L W A L L L L L L G S A
 40 76/26 106/36
 TCT CCT CAG GAT TCT GAA GAG CCC GAC AGC TAC ACG GAA TGC ACA GAT GGC TAT GAG TGG
 S P Q D S E E P D S Y T E C T D G Y E W
 136/46 166/56
 GAC CCA GAC AGC CAG CAC TGC CGG GAT GTC AAC GAG TGT CTG ACC ATC CCT GAG GCC TGC

D P D S Q H C R D V N E C L T I P E A C
 206/66 236/76
 AAG GGG GAA ATG AAG TGC ATC AAC CAC TAC GGG GGC TAC TTG TGC CTG CCC CGC TCC GCT
 K G E M K C I N H Y G G Y L C L P R S A
 5 266/86 296/96
 GCC GTC ATC AAC GAC CTA CAC GGC GAG GGA CCC CCG CCA CCA GTG CCT CCC GCT CAA CAC
 A V I N D L H G E G P P P P V P P A Q H
 326/106 356/116
 CCC AAC CCC TGC CCA CCA GGC TAT GAG CCC GAC GAT CAG GAC AGC TGT GTG GAT GTG GAC
 10 P N P C P P G Y E P D D Q D S C V D V D
 356/126 416/136
 GAG TGT GCC CAG GCC CTG CAC GAC TGT CGC CCC AGC CAG GAC TGC CAT AAC TTG CCT GGC
 E C A Q A L H D C R P S Q D C H N L P G
 416/146 476/156
 15 TCC TAT CAG TGC ACC TGC CCT GAT GGT TAC CGC AAG ATC GGG CCC GAG TGT GTG GAC ATA
 S Y Q C T C P D G Y R K I G P E C V D I
 506/166 536/176
 GAC GAG TGC CGC TAC CGC TAC TGC CAG CAC CGC TGC GTG AAC CTG CCT GGC TCC TTC CGC
 D E C R Y R Y C Q H R C V N L P G S F R
 20 566/186 596/196
 TGC CAG TGC GAG CCG GGC TTC CAG CTG GGG CCT AAC AAC CGC TCC TGT GTT GAT GTG AAC
 C Q C E P G F Q L G P N N R S C V D V N
 626/206 656/216
 GAG TGT GAC ATG GGG GCC CCA TGC GAG CAG CGC TGC TTC AAC TCC TAT GGG ACC TTC CTG
 25 E C D M G A P C E Q R C F N S Y G T F L
 686/226 716/236
 TGT CGC TGC CAC CAG GGC TAT GAG CTG CAT CGG GAT GGC TTC TCC TGC AGT GAT ATT GAT
 C R C H Q G Y E L H R D G F S C S D I D
 746/246 776/256
 30 GAG TGT AGC TAC TCC AGC TAC CTC TGT CAG TAC CGC TGC GTC AAC GAG CCA GGC CGT TTC
 E C S Y S S Y L C Q Y R C V N E P G R F
 806/266 836/276
 TCC TGC CAC TGC CCA CAG GGT TAC CAG CTG CTG GCC ACA CGC CTC TGC CAA GAC ATT GAT
 S C H C P Q G Y Q L L A T R L C Q D I D
 35 866/286 896/296
 GAG TGT GAG TCT GGT GCG CAC CAG TGC TCC GAG GCC CAA ACC TGT GTC AAC TTC CAT GGG
 E C E S G A H Q C S E A Q T C V N F H G
 926/306 956/316
 GGC TAC CGC TGC GTG GAC ACC AAC CGC TGC GTG GAG CCC TAC ATC CAG GTC TCT GAG AAC
 40 G Y R C V D T N R C V E P Y I Q V S E N
 986/326 1016/336
 CGC TGT CTC TGC CCG GCC TCC AAC CCT CTA TGT CGA GAG CAG CCT TCA TCC ATT GTG CAC
 R C L C P A S N P L C R E Q P S S I V H
 1046/346 1076/356

CGC TAC ATG ACC ATC ACC TCG GAG CGG AGC GTG CCC GCT GAC GTG TTC CAG ATC CAG GCG
 R Y M T I T S E R S V P A D V F Q I Q A
 1106/366 1136/376

ACC TCC GTC TAC CCC GGT GCC TAC AAT GCC TTT CAG ATC CGT GCT GGA AAC TCG CAG GGG
 5 T S V Y P G A Y N A F Q I R A G N S Q G
 1166/386 1196/396

GAC TTT TAC ATT AGG CAA ATC AAC AAC GTC AGC GCC ATG CTG GTC CTC GCC CGG CCG GTG
 D F Y I R Q I N N V S A M L V L A R P V
 1226/406 1256/416

10 ACG GGC CCC CGG GAG TAC GTG CTG GAC CTG GAG ATG GTC ACC ATG AAT TCC CTC ATG AGC
 T G P R E Y V L D L E M V T M N S L M S
 1286/426 1316/436

TAC CGG GCC AGC TCT GTA CTG AGG CTC ACC GTC TTT GTA GGG GCC TAC ACC TTC TGA GGA
 Y R A S S V L R L T V F V G A Y T F *

15 GCAGGAGGGAGCCACCCTCCCTGCAGCTACCCTAGCTGAGGAGCCTGTTGTGAGGGGCAGAATGAGAAAGGCAATAAAG
 GGAGAAAG

20 SEQ ID N° 24:
 CGGAGTCAACGGATTGGTCGTAT

SEQ ID N° 25:
 AGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGAC

25 SEQ ID N° 26

(fragment C-terminal de hMBP1 correspondant au fragment C-terminal murin isolé par
 double-hybride)

30

1/1 31/11
 TGC ACC TGC CCT GAT GGT TAC CGC AAG ATC GGG CCC GAG TGT GTG GAC ATA GAC GAG TGC
 C T C P D G Y R K I G P E C V D I D E C

35 61/21 91/31
 CGC TAC CGC TAC TGC CAG CAC CGC TGC GTG AAC CTG CCT GGC TCC TTC CGC TGC CAG TGC
 R Y R Y C Q H R C V N L P G S F R C Q C

121/41 151/51
 GAG CCG GGC TTC CAG CTG GGG CCT AAC AAC CGC TCC TGT GTT GAT GTG AAC GAG TGT GAC
 E P G F Q L G P N N R S C V D V N E C D

40 181/61 211/71
 ATG GGG GCC CCA TGC GAG CAG CGC TGC TTC AAC TCC TAT GGG ACC TTC CTG TGT CGC TGC
 M G A P C E Q R C F N S Y G T F L C R C

241/81 271/91
 CAC CAG GGC TAT GAG CTG CAT CGG GAT GGC TTC TCC TGC AGT GAT ATT GAT GAG TGT AGC
 H Q G Y E L H R D G F S C S D I D E C S

301/101 331/111
 TAC TCC AGC TAC CTC TGT CAG TAC CGC TGC GTC AAC GAG CCA GGC CGT TTC TCC TGC CAC
 Y S S Y L C Q Y R C V N E P G R F S C H

50 361/121 391/131
 TGC CCA CAG GGT TAC CAG CTG CTG GCC ACA CGC CTC TGC CAA GAC ATT GAT GAG TGT GAG
 C P Q G Y Q L L A T R L C Q D I D E C E

421/141 451/151
 TCT GGT GCG CAC CAG TGC TCC GAG GCC CAA ACC TGT GTC AAC TTC CAT GGG GGC TAC CGC

S G A H Q C S E A Q T C V N F H G G Y R
 481/161 511/171
 TGC GTG GAC ACC AAC CGC TGC GTG GAG CCC TAC ATC CAG GTC TCT GAG AAC CGC TGT CTC
 5 C V D T N R C V E P Y I Q V S E N R C L
 541/181 571/191
 TGC CCG GCC TCC AAC CCT CTA TGT CGA GAG CAG CCT TCA TCC ATT GTG CAC CGC TAC ATG
 C P A S N P L C R E Q P S S I V H R Y M
 601/201 631/211
 10 ACC ATC ACC TCG GAG CGG AGc GtG CCC GCT GAC GTG TTC CAG ATC CAG GCG ACC TCC GTC
 T I T S E R S V P A D V F Q I Q A T S V
 661/221 691/231
 TAC CCC GGT GCC TAC AAT GCC TTT CAG ATC CGT GCT GGA AAC TCG CAG GGG GAC TTT TAC
 Y P G A Y N A F Q I R A G N S Q G D F Y
 721/241 751/251
 15 ATT AGG CAA ATC AAC AAC GTC AGC GCC ATG cTG GTC CTC GCC CGG CCG GTG ACG GGC CCC
 I R Q I N N V S A M L V L A R P V T G P
 781/261 811/271
 CGG GAG TAC GTG CTG GAc CTG GAG ATG GTC ACC ATG AAT TCC CTC ATG AGC TAC CGG GCC
 R E Y V L D L E M V T M N S L M S Y R A
 841/281 871/291
 20 AGC TcT GTA cTG AGG CTC ACC GTe TTT GTA GGG GCC TAC ACC TTe TGA GGAGCAGGAGGGAGC
 S S V L R L T V F V G A Y T F *
 CACCCTCCCTGCAGCTACCCTAGCTGAGGAGCCTGTTGTGAGGGGCAGAATGAGAAAGGCAATAAAGGGGAGAAAGAAAG
 25 TCCTGGTGGCTGAGGTGGGCGGTCACACTGCAGGAAGCCTCAGGCTGGGGCAGGGTGGCACTTGGGGGGCAGGCCAA
 GTTCACCTAAATGGGGTCTCTATATGTTCAGGCCAGGGCCCCCATTGACAGGAGCTGGGAGCTCTGCACCACGAGC
 TTCAGTCACCCCGAGAGGAGAGGAGGTAACGAGGAGGGCGGACTCCAGGCCCGCCAGAGATTTGGACTTGGCTGGC
 TTGCAGGGGTCTAAGAAACTCCTCTGGACAGCGCCAGGAGGCCCTGGTTCCATTCTTAACCTCTGCCTCAAACCTGT
 ACATTTGGATAAGCCCTAGTAGTTCCTGGGCCTGTTTTTCTATAAAACGAGGCAACTGG

REVENDEICATIONS

1. Polypeptide capable d'interagir spécifiquement avec les formes oncogéniques de p53, de stimuler la croissance cellulaire et de bloquer les effets anti-prolifératifs de la forme sauvage de p53.
5

2. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'une séquence choisie parmi les séquences polypeptidiques SEQ ID N° 8 ou SEQ ID N°22 ou un dérivé de celles-ci.

3. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'une séquence choisie parmi les séquences polypeptidiques SEQ ID N°26 ou SEQ ID N°23 ou un dérivé de celles-ci.
10

4. Polypeptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie de la séquence polypeptidique SEQ ID N° 9 ou un dérivé de celle-ci.

5. Polypeptide selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il est représenté par la séquence polypeptidique SEQ ID N°23.
15

6. Séquence nucléotidique codant pour un polypeptide tel que défini selon l'une des revendications 1 à 5.

7. Séquence nucléotidique selon la revendication 6 caractérisée en ce qu'elle comprend tout ou partie de la séquence SEQ ID N° 16 ou de la SEQ ID N° 21 ou de leurs dérivées.
20

8. Séquence nucléotidique selon la revendication 6 caractérisée en ce qu'elle comprend tout ou partie de la séquence nucléotidique SEQ ID N° 9 ou de ses dérivées.

9. Séquence nucléotidique selon la revendication 6 ou 7 caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence SEQ ID N°15 ou la séquence SEQ ID N°26.

10. Séquence nucléotidique selon la revendication 6, 7 ou 9 caractérisée en ce qu'elle est représentée en SEQ ID N° 21.

5 11. Cellule hôte pour la production de polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce qu'elle a été transformée avec un acide nucléique comportant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 6 à 10.

10 12. Procédé de préparation d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que l'on cultive une cellule contenant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 6 à 10 dans des conditions d'expression de ladite séquence et on récupère le polypeptide produit.

13. Cassette d'expression comprenant une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide selon l'une des revendications 6 à 10.

15 14. Vecteur comprenant une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 6 à 10.

15. Vecteur selon la revendication 14 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur plasmidique, d'un cosmide ou de tout ADN non encapsidé par un virus.

20 16. Vecteur selon la revendication 14 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un virus recombinant, et de préférence d'un virus recombinant défectif pour la réplication.

17. Oligonucléotide antisens d'une séquence selon la revendication 7 à 10 capable d'inhiber au moins partiellement la production de polypeptides selon l'une des revendications 1 à 5.

18. Sonde nucléotidique capable de s'hybrider avec une séquence nucléotidique selon l'une des revendications 7 à 10 ou l'ARNm correspondant.

19. Anticorps ou fragment d'anticorps dirigé contre un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5.

5 20. Anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 19 caractérisé en ce qu'il est dirigé contre une séquence choisie parmi les séquences peptidiques présentées en SEQ ID N° 8 ou SEQ ID N°9 ou SEQ ID N°26.

21. Anticorps ou fragment d'anticorps selon la revendication 19 ou 20 caractérisé en ce qu'il possède la faculté de prévenir l'interaction entre les formes
10 oncogéniques de p53 et un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5.

22. Procédé de mise en évidence ou d'identification de composés capables de se lier avec un polypeptide tel que défini selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'on réalise les étapes suivantes :

15 a - on met en contact une molécule ou un mélange contenant différentes molécules, éventuellement non-identifiées, avec un polypeptide tel que défini selon l'une des revendications 1 à 5 dans des conditions permettant l'interaction entre ledit polypeptide et ladite molécule dans le cas où celle-ci posséderait une affinité pour ledit polypeptide, et,

 b - on détecte et/ou isole les molécules liées au dit polypeptide.

20 23. Procédé de mise en évidence ou d'identification de composés capables de moduler ou d'inhiber l'interaction entre entre les formes oncogéniques de p53 et un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'on réalise les étapes suivantes :

25 a - on réalise la liaison de la forme oncogénique de p53 ou d'un fragment de celle ci avec ledit polypeptide ;

- on ajoute un composé à tester pour sa capacité à inhiber la liaison entre la forme oncogénique de p53 et ledit polypeptide ,

- on détermine le déplacement ou l'inhibition de la liaison entre la forme oncogénique de p53 ;

5 - on détecte et/ou isole les composés qui empêchent ou qui gênent la liaison entre la forme oncogénique de p53 et ledit polypeptide ;

24. Ligand d'un polypeptide tel que défini selon les revendications 1 à 5, susceptible d'être obtenu selon le procédé de la revendication 22.

10 25. Ligand capable de moduler ou d'inhiber l'interaction entre les formes oncogéniques de p53 et un polypeptide tel que défini selon les revendications 1 à 5, susceptible d'être obtenu selon le procédé de la revendication 23.

26. Utilisation d'un ligand selon la revendication 24 ou 25 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies impliquant un dysfonctionnement du cycle cellulaire.

15 27. Utilisation d'un polypeptide capable d'interagir avec les formes mutées oncogéniques de p53 et comprenant tout ou partie d'une séquence peptidique choisie parmi les séquences SEQ ID N° 8, N° 9, N°26, ou N° 23 ou d'un dérivé de celle -ci, selon l'une des revendications 1 à 5 pour la réalisation d'un composé non peptidique ou non exclusivement peptidique capable d'interagir avec les formes mutées
20 oncogéniques de p53, par détermination des éléments structuraux de ce polypeptide qui sont importants pour son activité et reproduction de ces éléments par des structures non peptidiques ou non exclusivement peptidiques.

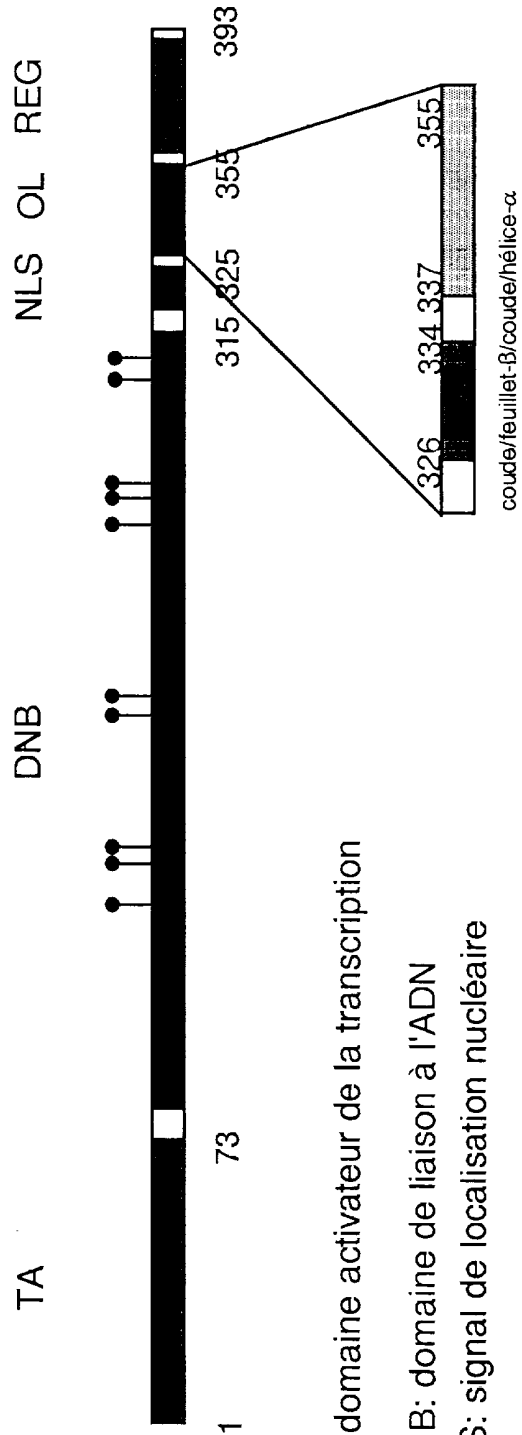
28. Composition pharmaceutique comprenant comme principe actif au moins un anticorps ou fragment d'anticorps selon l'une des revendications 19 à 21, et/ou un

oligonucléotide antisens selon la revendication 17 et/ou un ligand selon l'une des revendications 24 ou 25 et/ou un composé selon la revendication 27.

29. Composition selon la revendication 28 destinée au traitement des maladies impliquant un dysfonctionnement du cycle cellulaire.

5 30. Composition selon la revendication 29 destinée au traitement des cancers.

STRUCTURE DE LA p53



TA: domaine activateur de la transcription

DNB: domaine de liaison à l'ADN

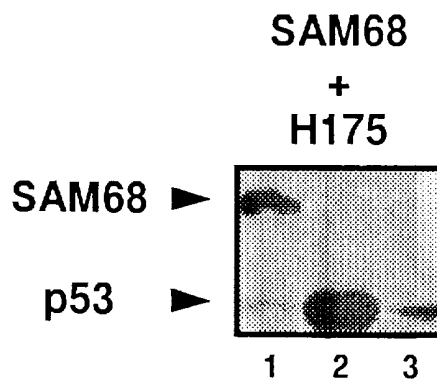
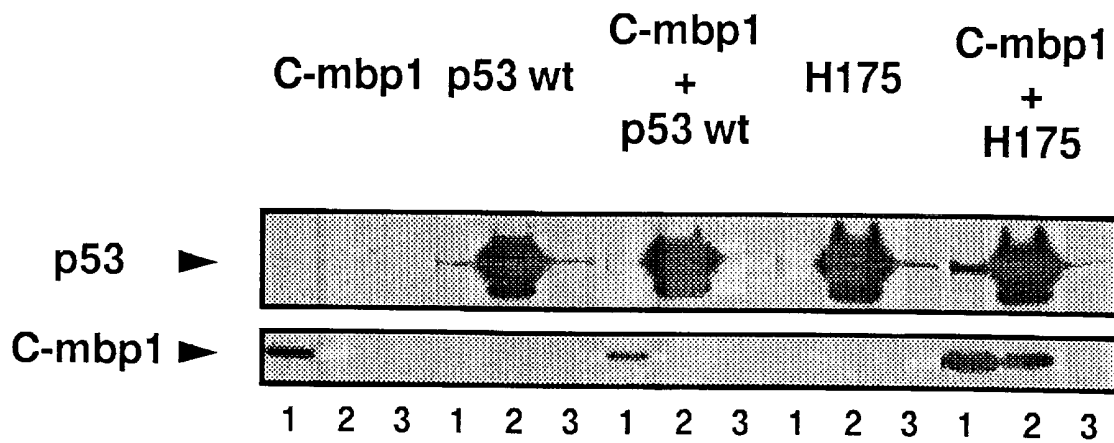
NLS: signal de localisation nucléaire

OL: domaine d'oligomérisation

REG: domaine de régulation

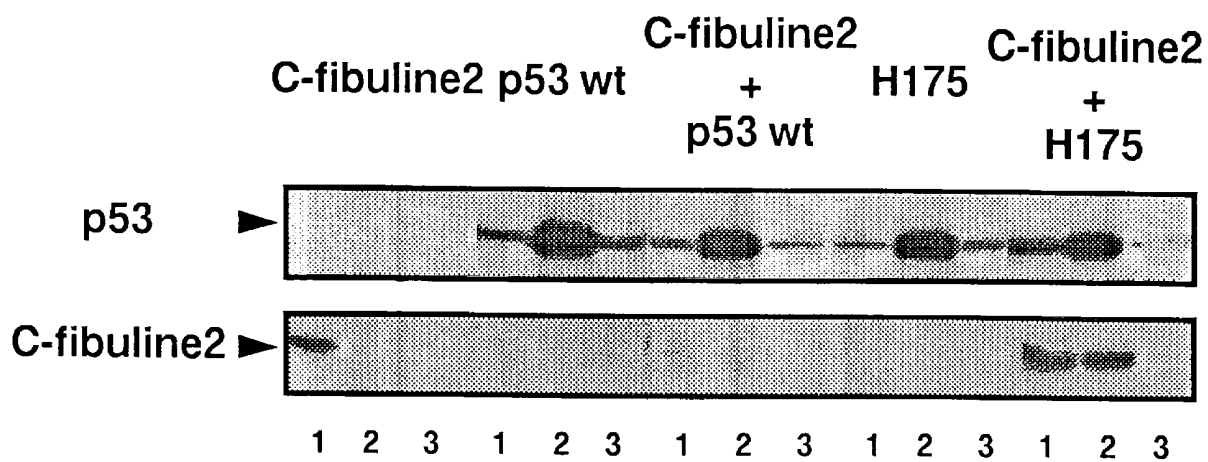
● cystéine

Figure 1



- 1: anticorps anti-myc (9E10)
 2: anticorps anti-p53 (DO1)
 3: anticorps non spécifique (PAb416)

Figure 2



1: anticorps anti-myc (9E10)
 2: anticorps anti-p53 (DO1)
 3: anticorps non spécifique (PAb416)

Figure 3

```

murine      ----AVAETPDFCPPP-PSLRMLFFASCLPGSLLLWAFLLLLLGAASPQDPEEPDSYTEC
humaine     SQPSRQSRGPRGCRGNP--RMLPCASCLPGSLLLWALLLLLLGSASPQDSEEPDSYTEC
              :. * * * * * *****:*****:*****.*****

murine      TDGYEWDADSQHCRDVNECLTIPEACKGEMKCNHYGGYLCLPRSAAVISDLHGEGPPPP
humaine     TDGYEWD PDSQHCRDVNECLTIPEACKGEMKCNHYGGYLCLPRSAAVINDLHGEGPPPP
              *****.*****.*****

murine      AAHAQQPNPCPQGYEPDEQESCVDVDECTQALHDCRPSQDCHNLPGSYQCTCPDGYRKIG
humaine     VPPAQHPNPCPPGYEPDDQDSCVDVDECAQALHDCRPSQDCHNLPGSYQCTCPDGYRKIG
              .. **:***** *****:*****:*****.*****

murine      PECVDIDECRYRYCQHRCVNLPGSFRCQCEPGFQLGPNNRSCVDVNECDMGAPCEQRCFN
humaine     PECVDIDECRYRYCQHRCVNLPGSFRCQCEPGFQLGPNNRSCVDVNECDMGAPCEQRCFN
              *****.*****.*****

murine      SYGTFLCRCNQGYELHRDGFSCSDIDECEGYSSYLCQYRCVNEPGRFSCHCPQGYQLLATR
humaine     SYGTFLCRCHQGYELHRDGFSCSDIDECSYSSYLCQYRCVNEPGRFSCHCPQGYQLLATR
              *****:*****.*****.*****

murine      LCQDIDECETGAHQCEAQTCVNFHGGYRCVDTNRCVEPYVQVSDNRCLCPASNPLCREQ
humaine     LCQDIDECESGAHQCEAQTCVNFHGGYRCVDTNRCVEPYIQVSENRLCPASNPLCREQ
              *****:*****:***:*****

murine      PSSIVHRYMSITERSVPADVFIQATSVYPGAYNAFQIRSGNTQGDIFYIRQINNVSAML
humaine     PSSIVHRYMTITERSVPADVFIQATSVYPGAYNAFQIRAGNSQGDIFYIRQINNVSAML
              *****:*****:***:*****

murine      VLARPVTGPREYVLDLEMVTMNSLMSYRASSVLRLTVFVGAYTF
humaine     VLARPVTGPREYVLDLEMVTMNSLMSYRASSVLRLTVFVGAYTF
              *****

```

Figure 4

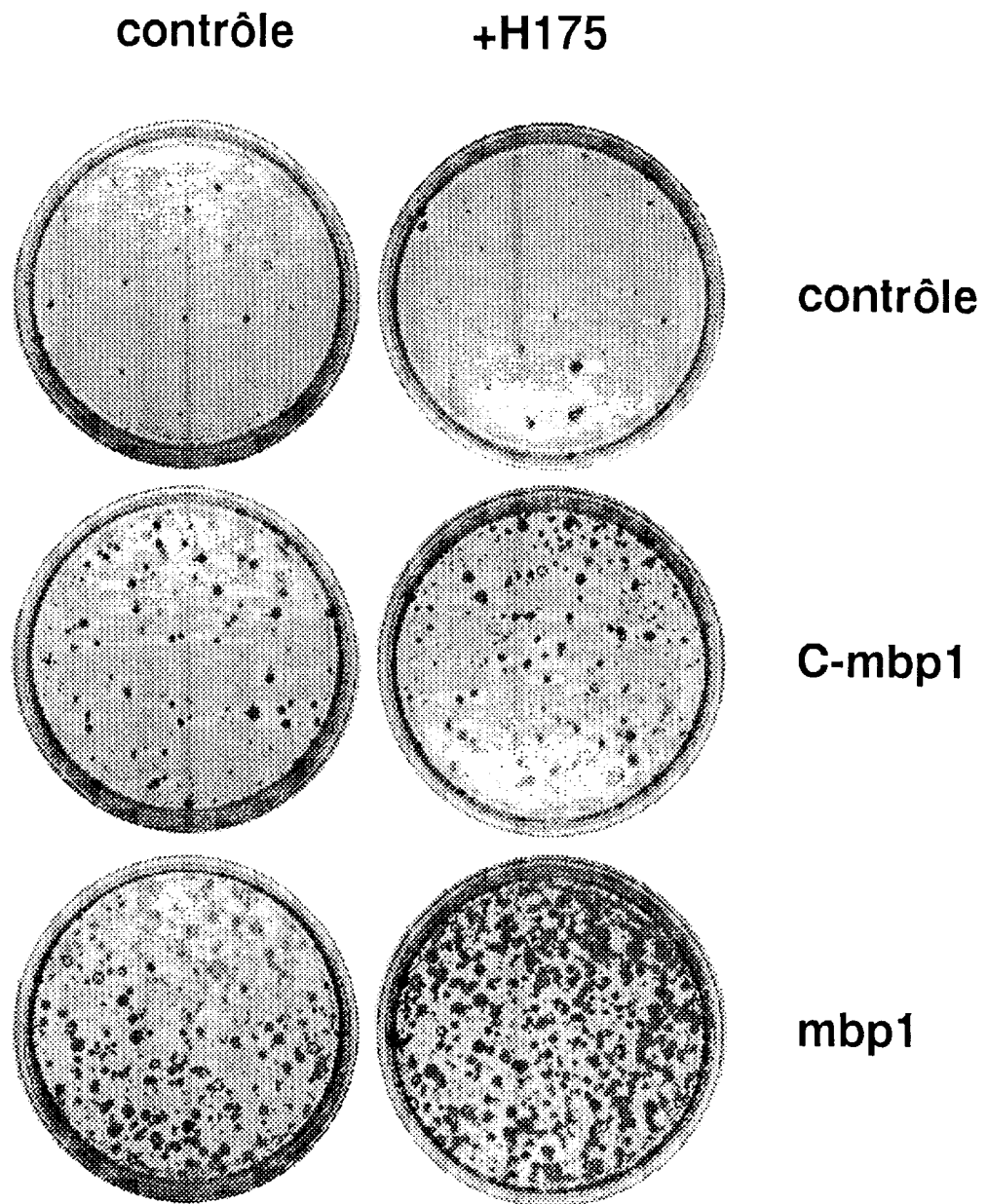


Figure 5

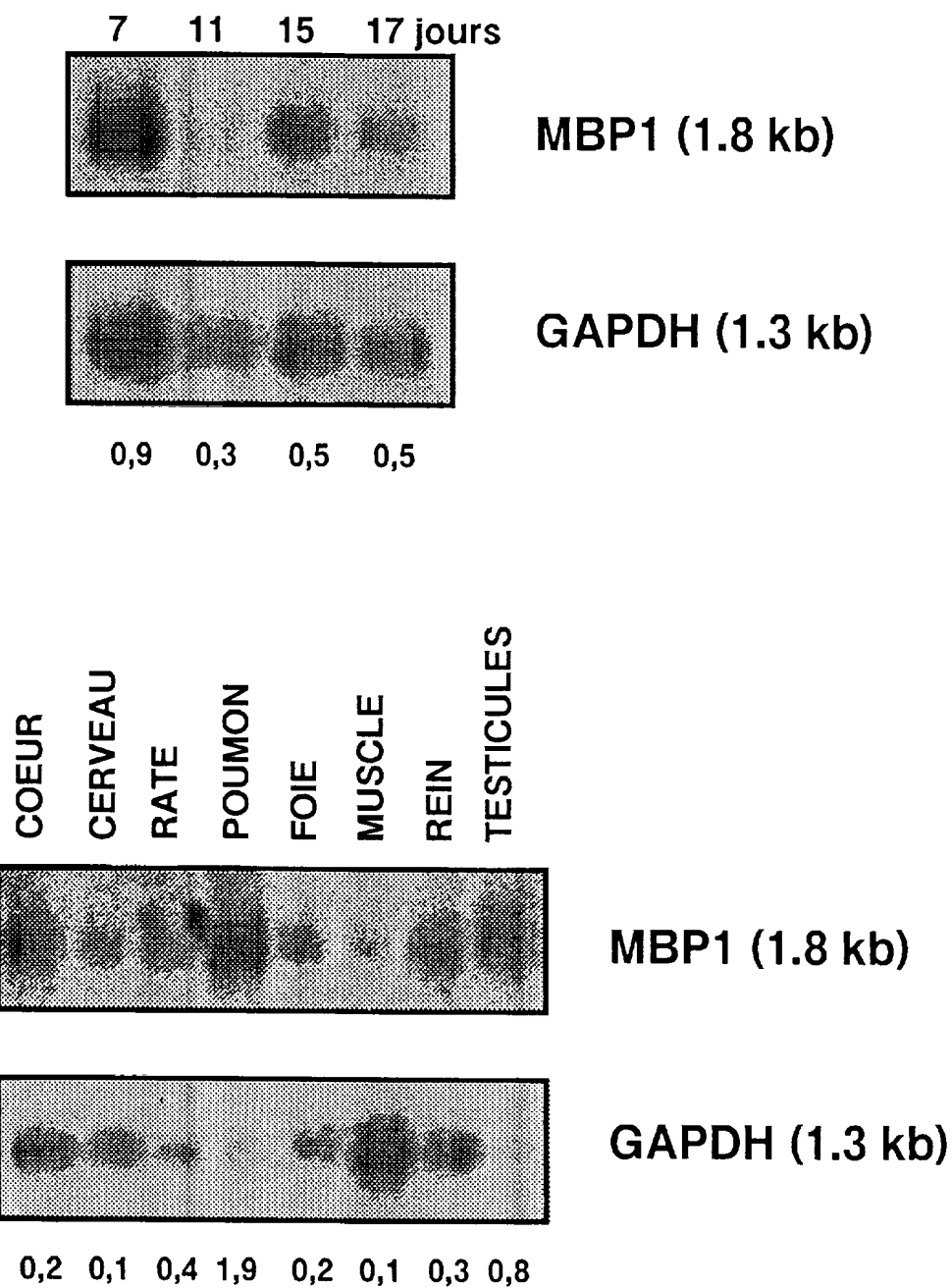


Figure 6

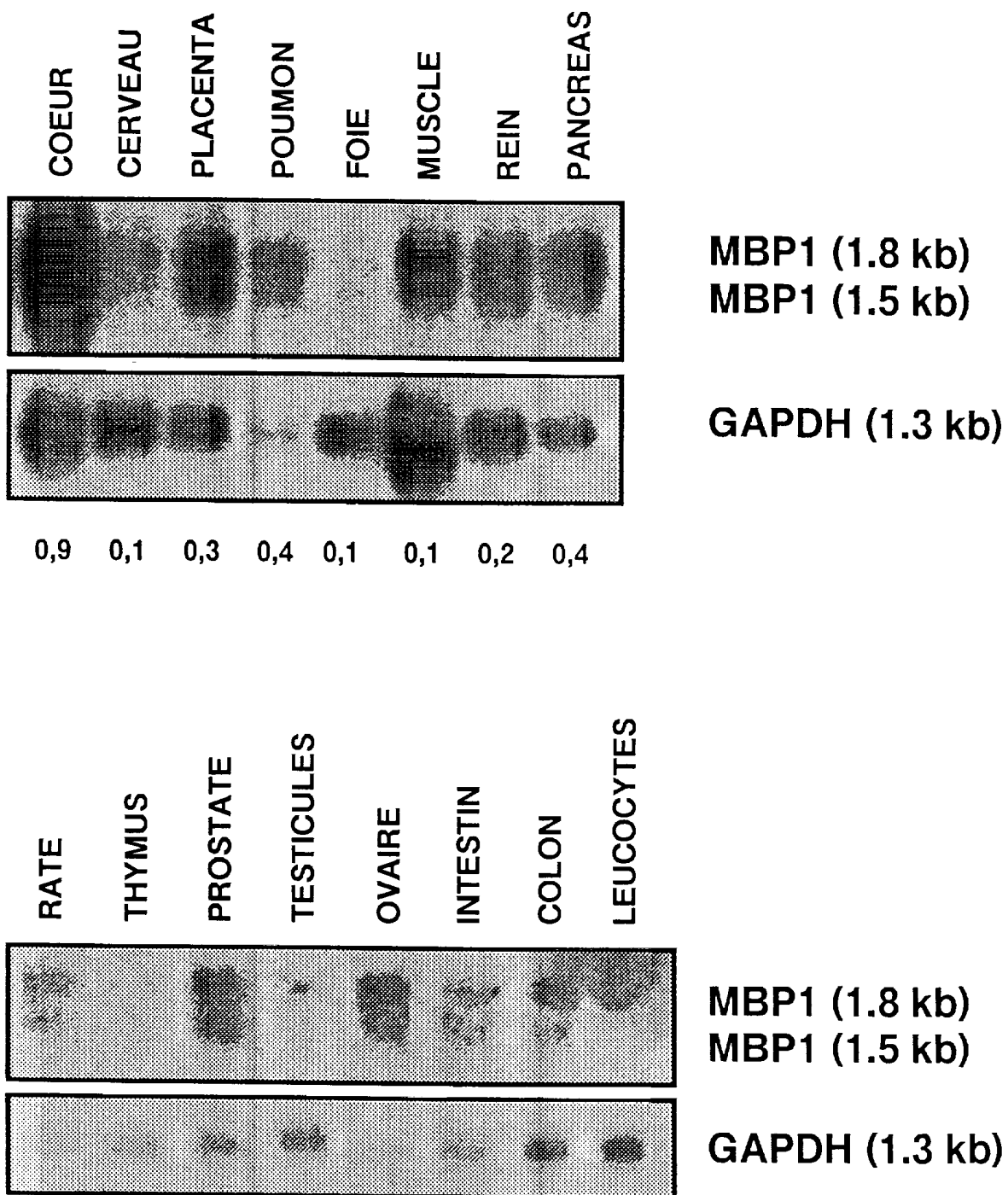


Figure 7

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 565138
FR 9812754

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	WO 97 38012 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ;OLSEN HENRIK S (US); RUBEN STEVEN M (US) 16 octobre 1997 (1997-10-16) * le document en entier *	1-3,5-7, 9-30
X	PAN T-C ET AL.: "Structure and expression of fibulin-2, a novel extracellular matrix protein with multiple EGF-like repeats and consensus motifs for calcium binding" JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 123, no. 5, décembre 1993 (1993-12), pages 1269-1277, XP002109118 * le document en entier *	1,4,6,8, 11-15, 18-20,22
X	CHEN J ET AL: "MAPPING OF THE P53 AND MDM-2 INTERACTION DOMAINS" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, vol. 13, no. 7, 1 juillet 1993 (1993-07-01), pages 4107-4114, XP000571629 ISSN: 0270-7306 * le document en entier *	1,6, 11-15, 19,22,24
T	GALLAGHER W M ET AL.: "MBP1: a novel mutant p53-specific protein partner with oncogenic properties" ONCOGENE, vol. 18, no. 24, 17 juin 1999 (1999-06-17), pages 3608-3616, XP002109119 * le document en entier *	
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.CL.6)
		C07K C12N G01N C12Q
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
14 juillet 1999		Oderwald, H
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		

1

EPO FORM 1503 03.82 (P04C13)