



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/12, 15/86, 5/10, C07K 14/47, 14/82, A61K 39/395, 48/00, C12Q 1/68, G01N 33/574, 33/68</p>	<p>A2</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 97/22695 (43) Date de publication internationale: 26 juin 1997 (26.06.97)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/02061 (22) Date de dépôt international: 20 décembre 1996 (20.12.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/15146 20 décembre 1995 (20.12.95) FR 96/04853 18 avril 1996 (18.04.96) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): FONDATION JEAN DAUSSET-CEPH [FR/FR]; 27, rue Juliette-Dodu, F-75010 Paris (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): TALERMAN, Adam [FR/FR]; 12, rue de la Chaise, F-75007 Paris (FR). AMSON, Robert [FR/FR]; 10, rue Gay-Lussac, F-75005 Paris (FR). COHEN, Daniel [FR/FR]; 3, rue de l'Orme-au-Mesnier, F-91600 Savigny-sur-Orge (FR). (74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i></p>	
<p>(54) Title: NUCLEOTIDE SEQUENCES, PROTEINS, DRUGS AND DIAGNOSTIC AGENTS FOR TREATING CANCER</p>		
<p>(54) Titre: SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES, PROTEINES, MEDICAMENTS ET AGENTS DIAGNOSTIQUES UTILES DANS LE TRAITEMENT DU CANCER</p>		
<p>(57) Abstract</p>		
<p>A nucleotide sequence corresponding to a gene comprising (a) one of sequences SEQ ID 1 to 11, or an equivalent gene which comprises (b) a sequence hybridisable with one of the sequences of (a), (c) a sequence at least 80 % homologous with (a) or (b), or (d) a sequence coding for a protein encoded by a gene according to (a), (b) or (c), or for an equivalent protein, and the use thereof, in particular for controlling cancer as well as for therapeutic follow-up. These genes are in the TSAP (tumor suppressor activated pathway) group, designated TSAP 1 to TSAP 8 and TSAP 3 human (or HUMSIAH) and in TSIP (tumor suppressor inhibited pathway) group, designated TSIP 1 and TSIP 2, both types of genes corresponding to sequences activated or inhibited, respectively, during cellular apoptosis, particularly that induced by p53.</p>		
<p>(57) Abrégé</p>		
<p>La présente invention concerne une séquence nucléotidique correspondant à un gène comportant: (a) une séquence selon l'une des IND. SEQ 1 à 11 ou un gène équivalent qui comporte: (b) une séquence s'hybridant avec l'une des séquences selon (a), (c) une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec (a) ou (b), ou (d) une séquence codant pour une protéine codée par un gène selon (a), (b) ou (c) ou pour une protéine équivalente, et leur application notamment dans la suppression du cancer ainsi que dans le suivi thérapeutique. Ces gènes regroupés en TSAP (tumor suppressor activated pathway) et dénommés TSAP 1 à TSAP 8 et TSAP 3 humain (ou HUMSIAH), et en TSIP (tumor suppressor inhibited pathway) et dénommés TSIP 1 et TSIP 2, ces deux types de gènes correspondant respectivement à des séquences induites ou inhibées lors de l'apoptose cellulaire, notamment celles induites par p53.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

*SÉQUENCES NUCLÉOTIDIQUES, PROTÉINES, MÉDICAMENTS ET AGENTS
DIAGNOSTICS UTILES DANS LE TRAITEMENT DU CANCER.*

La présente invention concerne la mise en évidence de gènes impliqués dans les voies moléculaires de la suppression tumorale et l'utilisation des gènes ainsi mis en évidence pour le traitement de certains dysfonctionnements géniques, notamment les cancers.

La présente invention a été rendue possible par l'isolement d'ADNc correspondant à des ARN messagers exprimés ou réprimés lors du processus d'apoptose induit par le gène suppresseur p53.

Une analyse globale des événements moléculaires intervenant au cours du cycle cellulaire lors du développement et de l'apoptose cellulaire est nécessaire pour mieux comprendre l'importance du gène p53 dans le processus de suppression tumorale ou, au contraire, de cancérisation.

La transformation d'une cellule normale en cellule tumorale est un processus qui se déroule en plusieurs étapes et qui nécessite une suite d'événements moléculaires. Au niveau physiologique, ces événements se traduiront par une indépendance de la cellule tumorale vis-à-vis des signaux extérieurs ainsi que par une dérégulation interne menant à une croissance incontrôlée.

Deux groupes de gènes sont responsables de cette transformation dite "maligne", d'une part, les oncogènes, d'autre part, les gènes suppresseurs ou anti-oncogènes. Les oncogènes, en raison de leur dérégulation dans le cancer (résultant le plus souvent d'une mutation ou d'une translocalisation) induiront un signal positif qui favorisera la croissance néoplasique. Au contraire, les gènes suppresseurs, du fait de leur délétion, de l'absence de leur expression par mutation du promoteur, par exemple, ou encore de mutations qui modifieront la structure et la fonction de la protéine, seront incapables dans le cancer de fournir le signal qui lui, normalement, devrait freiner cette croissance anormale. En conséquence, le dysfonctionnement des gènes suppresseurs contribue à la transformation néoplasique.

L'objet de la présente invention est l'isolement de gènes ayant normalement une action dans la suppression tumorale et dont il sera alors possible de surveiller et de traiter les éventuels dysfonctionnements.

En particulier, l'isolement de ces gènes permet d'avoir recours à une thérapie génique de remplacement ou bien à la synthèse d'agents pharmacologiques, protéiques ou non protéiques, qui, directement ou

indirectement, par leur action sur les promoteurs, induiront l'activation et l'expression de ces gènes, ou encore la synthèse d'agents pharmacologiques qui permettront de mimer l'effet physiologique de ces gènes suppresseurs.

L'objectif final est, soit d'inhiber la croissance tumorale, ou mieux, d'induire le processus apoptotique de ces cellules tumorales, c'est-à-dire de conduire les cellules tumorales à se "suicider".

La présente invention concerne la mise en évidence de gènes qui sont impliqués dans cette apoptose. En effet, chaque cellule possède en elle un programme de mort physiologique. Il s'agit également d'un processus physiologique qui est impliqué dans le développement afin de maintenir l'homéostasie du corps et de ne pas voir des proliférations cellulaires anormales s'établir, même si, au demeurant, elles n'ont pas de caractère malin.

L'un des gènes suppresseurs les plus importants impliqués dans l'apoptose est le gène p53. Dans sa fonction normale, ce gène contrôle la croissance cellulaire et le processus d'apoptose ; en particulier, c'est ce gène qui bloque la croissance cellulaire et qui doit induire le processus apoptotique afin d'éviter le développement d'un cancer. On a ainsi mis en évidence que des souris nullizygotes pour le p53 étaient beaucoup plus sensibles à la formation de tumeurs. On a également mis en évidence le fait que, dans les cancers, le gène p53 était très souvent altéré et conduisait à la production de protéines incapables de véhiculer le message d'apoptose.

C'est cette particularité qui a été mise en oeuvre dans le cadre de la présente invention.

En effet, la présente invention repose sur la constatation qu'il n'est pas possible, ou du moins qu'il paraît très difficile, de mettre en place une thérapie de substitution directe lors d'un dysfonctionnement du gène p53. En effet, le p53 muté comme il l'est dans le cancer va annuler l'effet physiologique du p53 normal.

Il a donc fallu renoncer, du moins dans un premier temps, à une thérapie de substitution agissant directement au niveau de p53.

La présente invention s'est donc attachée à étudier les gènes situés en aval de p53 afin de "bipasser" la difficulté évoquée précédemment.

Afin d'isoler les gènes activés ou inhibés par le p53 normal (wild-type p53) on a effectué un ratissage global de l'expression des gènes dans une cellule induite en apoptose et dans la même cellule maligne, plus particulièrement dans une cellule exprimant le p53 normal dans sa fonction

et dans une cellule exprimant le p53 muté dont la fonction est oncogénique. La comparaison des gènes exprimés (ARN messagers exprimés dans les deux types de cellule) a permis de mettre en évidence des gènes exprimés différemment, c'est-à-dire exprimés dans l'une des cellules alors qu'ils ne le sont pas dans l'autre (les gènes peuvent être activés ou inhibés).

On en déduit aisément que ces gènes sont impliqués dans le processus de cancérisation, dans un cas par leur absence, et, dans l'autre cas, par leur présence.

Pour cette étude différentielle, la méthode utilisée est la méthode décrite en 1992 par Liang et Pardee (Differential display of eucaryotic mRNA by mean of a polymerase chaine reaction).

Jusqu'à présent, l'isolement des gènes impliqués dans la suppression était effectué soit par clonage positionnel, soit par l'emploi des doubles hybrides. La première méthode permettait, par un calcul statistique, de calculer la plus haute probabilité où pouvait se localiser, au niveau chromosomique, un gène suppresseur candidat pour un type bien particulier de cancer, surtout ceux d'origines familiales. Le système de doubles hybrides permet d'isoler une à une les protéines qui interagissent avec un gène donné.

L'approche du problème selon la présente invention a permis d'isoler des séquences directement reliées à une fonction. Dès lors, au contraire du séquençage aléatoire des EST, les séquences sont des séquences dont la fonction est connue et qui sont impliquées dans le processus d'apoptose induit par le gène suppresseur p53.

De façon plus précise, cette méthode a été utilisée sur un modèle cellulaire décrit par Moshe Oren, il s'agit de cellules myéloïdes tumorales de souris qui ont été transfectées par un mutant stable du gène p53. En fait, l'expression de ce gène est thermosensible, c'est-à-dire que dans des conditions de culture cellulaire à 37°C la protéine produite est une protéine mutée, c'est-à-dire qu'elle ne peut jouer le rôle de suppresseur de tumeur et donc que la lignée cellulaire correspondante se développe sous forme de cellule maligne, alors qu'à la température de 32°C la protéine p53 exprimée, comme la protéine naturelle, est capable de jouer le rôle de suppresseur et empêche la lignée cellulaire correspondante de devenir maligne.

Cette étude systématique a permis de mettre en évidence les gènes impliqués dans la cascade de suppression induite par p53.

C'est pourquoi la présente invention concerne ces nouvelles séquences et les gènes les comportant ainsi que l'utilisation de ces séquences, tant au niveau du diagnostic qu'au niveau de la thérapie, de même que pour la réalisation de modèles destinés à tester des produits anti-cancéreux.

5 La présente invention concerne tout d'abord une séquence nucléotidique correspondant à un gène comportant :

- (a) une séquence selon l'une des IND.SEQ 1 à 10 ou un gène équivalent qui comporte :
- (b) une séquence s'hybridant avec l'une des séquences selon (a),
- 10 (c) une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec (a) ou (b), ou
- (d) une séquence codant pour une protéine codée par un gène selon (a), (b) ou (c) ou pour une protéine équivalente,

et leur application notamment dans la suppression du cancer ainsi que dans
15 le suivi thérapeutique.

De plus, la présente invention concerne un gène humain impliqué dans la cascade de suppression induite par p53 ainsi que l'utilisation des séquences de ce gène, tant au niveau du diagnostic qu'au niveau de la thérapie, de même que pour la réalisation de modèles destinés à tester des
20 produits anti-cancéreux ainsi que leur application à titre d'agent antiviral.

La présente invention concerne donc également une séquence nucléotidique correspondant à un gène comportant :

- (a) une séquence selon l'IND.SEQ 11 correspondant au gène TSAP 3 humain ou HUMSIAH (Human Homologue of the Drosophila seven in absentia gene), ou un gène équivalent qui comporte :
- 25 (b) une séquence s'hybridant avec l'une des séquences selon (a),
- (c) une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec (a) ou (b), ou
- (d) une séquence codant pour une protéine codée par un gène selon
30 (a), (b) ou (c) ou pour une protéine équivalente,

et leur application notamment dans la suppression du cancer ainsi que dans le suivi thérapeutique.

Concernant les séquences 1 à 11, la présente invention couvre aussi bien la séquence nucléotidique correspondant au gène entier que des
35 fragments de ce gène, notamment lorsqu'ils codent pour une protéine équivalente comme cela sera décrit ci-après.

Les séquences nucléotidiques peuvent être aussi bien de l'ADN que de l'ARN ou des séquences dans lesquelles certains des nucléotides sont non naturels, soit pour améliorer leurs propriétés pharmacologiques, soit pour permettre leur identification.

5 Les séquences mentionnées en (b) (pour les IND.SEQ 1 à 11) sont essentiellement les séquences complémentaires totales ou partielles (notamment pour les cas évoqués précédemment).

Les séquences (a) et (b) (pour les IND.SEQ 1 à 10) permettent non seulement l'accès au gène murin dont elles sont issues, mais également aux
10 gènes humains correspondant par homologie.

Ainsi, l'invention concerne également les séquences nucléotidiques des gènes présentant une forte homologie avec les gènes mentionnés précédemment, de préférence une homologie supérieure à 80 % sur les parties essentielles desdits gènes, soit en général au moins 50 % de la
15 séquence, de préférence l'homologie sera sur ces parties supérieure à 90 %.

Enfin, lorsque lesdits gènes codent pour une protéine, la présente invention concerne également les séquences codant pour la même protéine, compte tenu de la dégénérescence du code génétique, mais également pour les protéines équivalentes, c'est-à-dire produisant les mêmes effets,
20 notamment les protéines délétées et/ou ayant subi des mutations ponctuelles.

Les séquences selon la présente invention sont plus particulièrement les séquences qui sont induites ou inhibées lors de l'apoptose cellulaire, notamment celles induites par p53.

Lesdits gènes sont regroupés en TSAP ou "Tumor Suppressor Activated Pathway" et dénommés de TSAP 1 à TSAP 8 et TSAP 3 humain, correspondant aux IND.SEQ 1 à 8 et 11 (HUMSIAH) respectivement, et en TSIP ou "Tumor Suppressor Inhibited Pathway" et dénommés TSIP 1 et TSIP 2, correspondant aux IND.SEQ 9 et 10.
25

Les caractéristiques des séquences correspondent aux IND.SEQ 1 à 10 sont rassemblées dans le tableau ci-annexé.
30

Les séquences nucléotidiques correspondant aux gènes TSAP (y compris le TSAP 3 humain ou HUMSIAH), sont des séquences exprimées lors du processus d'apoptose alors que lorsqu'ils ne sont pas exprimés le processus d'oncogénèse se poursuit. Il est donc intéressant :

- 35
- de détecter toute anomalie dans le gène correspondant, laquelle peut conduire à une plus grande susceptibilité à l'oncogénèse, et
 - de pouvoir prévoir une thérapie de remplacement.

Il faut d'ailleurs rappeler que ces gènes peuvent intervenir dans d'autres processus que les processus oncogènes ; en effet, p53 est en quelque sorte le gardien de l'intégrité du génome, dans ces conditions les gènes TSAP ou TSIP sont sans doute également impliqués dans cette fonction de contrôle, c'est donc l'ensemble des altérations possibles du génome qui peuvent être redevables de la détection et de la thérapie précédente. Au contraire, les gènes TSIP sont exprimés lors de l'oncogénèse et non lors de l'apoptose, il est donc là aussi intéressant de détecter l'éventuelle anomalie des TSIP et également de prévoir une thérapie d'inhibition/blocage.

La thérapie de remplacement pourra être effectuée par thérapie génique, c'est-à-dire en introduisant le gène TSAP avec les éléments qui permettent son expression in vivo. Les principes de la thérapie génique sont connus. On peut utiliser des vecteurs particuliers, viraux ou non viraux, par exemple des adénovirus, rétrovirus, virus herpès ou poxvirus. La plupart du temps ces vecteurs sont utilisés sous forme défectifs qui serviront de véhicules d'expression de TSAP avec ou sans intégration. Les vecteurs peuvent être également synthétiques, c'est-à-dire mimer des séquences virales, ou bien être constitués par de l'ADN ou de l'ARN nu selon la technique développée notamment par la société VICAL.

Dans la plupart des cas, il faudra prévoir des éléments de ciblage assurant une expression spécifique des tissus ou organes, en effet, il n'est pas possible d'envisager d'activer un phénomène d'apoptose incontrôlé.

La présente invention concerne donc l'ensemble des vecteurs décrits précédemment.

La présente invention concerne également les cellules transformées par un vecteur d'expression tel que décrit précédemment ainsi que la protéine pouvant être obtenue par culture de cellules transformées.

Les systèmes d'expression pour produire des protéines peuvent être aussi bien des systèmes eucaryotes tels que les vecteurs précédents que des systèmes procaryotes dans des cellules de bactéries.

L'un des intérêts de la présente invention est qu'elle a mis en évidence l'implication de plusieurs gènes dans l'apoptose ; ainsi la surexpression de l'un des gènes par thérapie génique peut, pour certains d'entre eux, ne conduire à l'apoptose que les cellules dans lesquelles s'expriment déjà d'autres gènes déréglés, c'est-à-dire des cellules malignes.

La présente invention concerne également, à titre de médicament, un composé assurant l'expression cellulaire d'au moins une des séquences

nucléotidiques précédentes lorsqu'elle est induite lors de l'apoptose cellulaire, notamment des gènes TSAP 1 à TSAP 8 et TSAP 3 humain, ou au contraire assurant l'inhibition de l'expression cellulaire d'au moins une séquence cellulaire telle que décrite précédemment lorsqu'elle est inhibée
5 lors de l'apoptose cellulaire, notamment TSIP 1 et TSIP 2.

Il est, par exemple, possible de prévoir d'autres approches que la thérapie génique, notamment l'utilisation de séquences nucléotidiques en stratégie sens ou antisens, c'est-à-dire pouvant bloquer l'expression de TSIP ou au contraire, agissant en amont, favorisant l'expression de TSAP.

10 On peut également prévoir une stratégie de remplacement directe par apport de protéines correspondant à TSAP ou d'anticorps inhibiteurs correspondant à TSIP.

Enfin, il est possible de prévoir l'utilisation de molécules non protéiques dont l'activité sera d'activer TSAP ou de mimer l'action de son produit d'expression ou bien d'inhiber TSIP ou bien de bloquer l'action de son produit d'expression.
15

Ces produits peuvent être aisément testés sur les cellules modifiées qui sont décrites dans les exemples en introduisant les produits à tester dans la culture cellulaire et en détectant l'apparition du phénomène apoptotique.
20 Dans les stratégies à ADN, ARN ou protéique les produits sont bien entendu élaborés en fonction des séquences qui sont décrites.

La présente invention concerne en particulier l'utilisation des médicaments précédents en tant qu'agent anti-cancéreux.

Mais, le produit du gène TSAP 3 humain (HUMSIAII) est également
25 utile comme agent antiviral, comme cela apparaîtra à la lecture de l'exemple 2. La présente invention concerne donc également l'utilisation des médicaments précédents comme agent antiviral.

La présente invention concerne également à titre d'agent de diagnostic pour la détermination de la prédisposition au cancer, tout ou partie
30 des séquences selon l'invention à utiliser comme sonde nucléotidique ou comme amorce d'amplification, mais également à titre d'agent de diagnostic pour la détermination de la prédisposition au cancer un antigène correspondant à tout ou partie des protéines codées par la séquence selon l'invention ou les anticorps, notamment les anticorps monoclonaux,
35 correspondants, éventuellement après culture.

Les méthodes de diagnostic sont connues, il peut s'agir, par exemple, de techniques de microséquençage des parties variables après

isolement et amplification éventuelle ou des méthodes de détection type RFLP ou d'amplification simple notamment. Les techniques différentielles peuvent, en particulier, permettre de mettre en évidence l'écart entre le TSAP ou TSIP normal et anormal.

5 L'invention concerne également des modèles mettant en oeuvre les séquences précédentes.

Le gène TSAP 3 humain (HUMSIAH) peut être isolé, notamment, en utilisant la méthode PCR ou d'autres méthodes d'amplification en mettant à profit la structure du gène. Il est également possible de synthétiser ce gène
10 par morceau, si nécessaire.

Enfin, l'invention concerne un perfectionnement à la méthode de Liang et Pardee (1) caractérisé en ce que dans l'amplification par PCR on effectue une diminution en palier ("touch down") tel que décrit dans Don et al. (2).

15 D'autres caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples ci-après faite notamment en se référant aux figures suivantes :

- Figure 1 - Quantification de l'expression différentielle des ARNm utilisant l'imageur 1200 β . Hybridation aux ARNm dérivés des cellules LTR6 à 37°C et des cellules LTR6 après 4 heures à 32°C. Les nombres en ordonnées de 0 à
20 500 correspondent au comptage détecté par 0,15 mm et sont proportionnels au signal d'hybridation.

C1 : ARNm exprimé également en utilisant un clone sans expression différentielle ;

25 C2 : contrôle positif utilisant la Cycline G et montrant l'induction des ARNm correspondant à 32°C ;

MER-LTR : montre l'induction de cette séquence à 32°C ;

TSAP 1 à TSAP 8 : expression différentielle des 8 ARNm activés dans les 4 premières heures suivant l'induction de l'apoptose ;

30 TSIP 1 et TSIP 2 : expression différentielle des 2 ARNm inhibés dans les 4 premières heures suivant l'induction de l'apoptose.

- Figure 2 - Analyse Northern blot.

A : hybridation avec la sonde TSAP 3 ;

B : hybridation avec la sonde siah 1b de souris ;

35 lignes 1 et 2 : ARNm polyA⁺ de cellules leucémiques myéloïdes M1 (clone S6) cultivées à 37°C et 32°C respectivement ;

lignes 3 et 4 : ARNm polyA⁺ de cellules LTR6 cultivées à 37°C et 32°C respectivement ;

la flèche indique l'expression différentielle du transcrit 1,9 kb de TSAP 3 -
siah 1b de souris ;

panneaux inférieurs : GAPDH ;

C : distribution tissulaire utilisant TSAP 3 comme sonde ;

5 1 : coeur, 2 : cerveau, 3 : rate, 4 : poumon, 5 : foie, 6 : muscle du squelette, 7 :
rein, 8 : testicule ;

les flèches indiquent les transcrits de 1,9 et 2,4 kb ;

panneau inférieur : β -actine.

- Figure 3 - Analyse de l'hybridation in situ avec la sonde TSAP 3 ;

10 A : cellules M1 incubées pendant 4 heures à 32°C et hybridées avec une
sonde antisens TSAP 3 ;

B : cellules LTR6 incubées pendant 4 heures à 32°C et hybridées avec une
sonde sens TSAP 3 ;

15 C : cellules LTR6 incubées à 37°C et hybridées avec une sonde antisens
TSAP 3 ;

D à F : cellules LTR6 cultivées à 32°C pendant respectivement 1, 2 et
4 heures et hybridées à une sonde antisens TSAP 3 ;

la barre dans le panneau A : 10 μ m ;

les flèches indiquent l'accumulation des ARNm TSAP 3 dans le cytoplasme.

20 - Figure 4 - Comparaison entre la séquence d'ADNc de TSAP 1 et la séquence
nucléotidique correspondant à la phospholipase C bêta 4 de rat.

- Figure 5 - Comparaison entre la séquence d'ADNc de TSAP 2 et la séquence
nucléotidique correspondant à la protéine digitée au zinc (ZFM 1) localisée
dans le locus Multiple Endocrine Neoplasia (MEN 1).

25 - Figure 6 - Comparaison entre la séquence d'ADNc de TSAP 3 et la séquence
nucléotidique correspondant au gène Drosophila seven in absentia (sina).

- Figure 7 - Comparaison entre le produit des gènes sina de différentes
espèces, humain (HUMSIAH), murin (MMSIAH 1B) et de drosophile
(DROSINA).

30 - Figure 8 - Comparaison entre la séquence d'ADNc de TSIP 2 et la séquence
d'ADNc du transcript S182 murin du gène AD3 impliqué dans la maladie
d'Alzheimer.

MATERIELS ET METHODES

Cultures cellulaires

35 Cellules de leucémie myéloïde M1 (clone S6) et cellules M1
transfectées de façon stable avec un mutant sensible à la température val 135
p53 (LTR6) (3).

Ces cellules sont cultivées sur milieu RPMI 1640 avec 10 % FCS à 5 % de CO₂ à 37°C. Pour la modification de la température, les cultures sont placées dans un second incubateur à 32°C. Pour tous les essais effectués dans cette étude, les cellules sont testées après 12 et 24 heures pour la présence d'apoptose.

Etude des ADNc différentiels

Pour effectuer les tests dans des conditions expérimentales standards et pour obtenir une reproductivité totale des résultats, les modifications suivantes au protocole d'origine (1) ont été effectuées.

On utilise toujours des ARNm polyA⁺ purifiés deux fois sur colonne d'oligodT utilisant Fast Track (Invitrogen, San Diego CA). Après transcription réverse (M-MLV Reverse Transcriptase, Gibco BRL) sur 0,05 µg de polyA⁺ utilisant 20 µM de chacun des dNTP (Boehringer-Mannheim), aucun dNTP additionné n'est ajouté au mélange de PCR final. Un "hot start" à 94°C pendant 5 minutes est effectué avant la PCR (GeneAmp PCR system 9600 Perkin Elmer Cetus). Les échantillons sont refroidis rapidement sur de l'eau glacée. Un "touch down" (2) de 10 cycles de 50°C à 40°C est effectué (94°C 30 secondes - 50°C 1 minute - 72°C 30 secondes), suivi par 35 cycles (94°C 30 secondes - 40°C 1 minute - 72°C 30 secondes) et une extension finale de 5 minutes à 72°C. Les produits de la PCR sont séparés sur gels de polyacrylamide à 6 % non dénaturant (4). Les gels sont exposés sans séchage. Chaque présentation différentielle est effectuée en comparant MIS6 et LTR6 à 37°C et après 4 heures d'incubation des deux lignées cellulaires à 32°C.

La procédure de présentation différentielle est répétée dans 3 expériences différentes pour confirmer une parfaite reproductibilité.

Les bandes exprimées différentiellement sont découpées à partir du gel, éluées et réamplifiées (1). Les produits de PCR sont sous-clonés en utilisant le système TA-cloning (Invitrogen, San Diego CA) en suivant les indications fournies.

Pour chaque réaction de ligation, 10 clones recombinants sont séquencés en utilisant le système automatique ABI.

Extraction des ARN, analyses et sondes Northern blots

L'ARN total est extrait avec du Trizol (Life Technologies). Les ARN polyA⁺ sont préparés en utilisant le kit OligotexdT (Qiagen, CA). 30 µg de l'ARN total ou 2 µg d'ARN polyA⁺ sont séparés sur agarose 1 %/1 x MOPS / 2 % gel de formaldéhyde, transférés sur membrane de nylon (Hybond N+, Appligène, France) comme cela a été décrit précédemment (5). Les Northern blots sont

hybridés avec des sondes marqués au P^{32} sur les inserts TSAP et TSIP et lavés comme décrit précédemment (5). Pour vérifier l'induction de la fonction du p53 sauvage, les Northern blots sont hybridés avec une sonde cycline G (6). A titre de contrôle pour la quantité d'ARNm chargée, les blots sont hybridés avec une sonde GAPDH. Différents Northern blots (Clontech CA) sont utilisés dans des conditions identiques et hybridés pour le contrôle avec une sonde β -actine. Les produits de RT-PCR pour LTR6 sont amplifiés en utilisant les amorces siah 1b suivantes : 5'CAGTAAACCACTGAAAACC3' et 5'CAAACCAAACCAAAAACCAC3'. Le produit de PCR sous-cloné est utilisé comme sonde contrôle de siah 1b. Les Northern blots sont exposés pendant 10 jours à - 80°C.

Slot blots

La reproductibilité des résultats obtenus par les analyses Northern blot. Les blots sont préparés (Bio-Rad, Hercules CA) en plaçant les produits de PCR (200 ng de Zeta-Probe Blotting Membranes, Bio-Rad, suivant les instructions du fabricant) de clones TSAP et hybridés avec une sonde ADNc marquée au P^{32} (Superscript II Gibco-BRL, Life Technologies) correspondant à l'ARN des cellules LTR6 incubées à 37°C et ensuite 4 heures à 32°C. Le produit de PCR du clone contenant la cycline G est également déposé sur les membranes et utilisé comme contrôle positif. Les Slot blots sont exposés une nuit à - 80°C.

Analyse quantitative des images

Celle-ci est effectuée en utilisant un imageur 1200 β (Biospace Instruments, Paris, France) sur les deux Northern blots (pour TSIP 1 et TSIP 2) et sur les Slot blots pour tous les contrôles ADNsc et TSAP 1 à 8. Pour l'analyse quantitative représentée dans les graphiques de la figure 1 on soustrait un nombre constant de chaque pic. Cette constante est calculée en mesurant la valeur moyenne du bruit de fond dans les slots qui ne contiennent pas d'ADNc. Les résultats du β imageur ont été obtenus en comptant les slot blots une nuit et en les confirmant par autoradiographie avec des temps variables d'exposition. Ces autoradiogrammes montrent les mêmes variations qualitatives relatives entre les activités à 32°C et à 37°C que les mesures effectuées avec le β imageur.

Hybridation in situ (7, 8)

Les cellules sont lavées 3 fois dans un tampon phosphate salin (PBS) "cytospinned" et fixées par du paraformaldéhyde à 4 % dans PBS pendant 10 minutes puis conservées dans l'éthanol à 70 %. Des transcrits

d'ARN marqués à la digoxigénine-11-urédine-5'-triphosphate (DIG) et à la biotine-11-UTP de TSAP 3 sont utilisés dans les analyses suivant la procédure décrite précédemment (Boehringer-Mannheim). Pour la détection des souches marquées à la digoxigénine hybridée les tranches sont incubées
5 dans SAD-10 (10 nm d'anticorps anti-DIG de mouton marqués à l'or à 1/1000 de dilution, Biocell UK). L'analyse est effectuée en utilisant de la microscopie à laser confocal.

EXEMPLE 1

L'étude différentielle des ADNc par la méthode de Liang et Pardee
10 permet de disposer d'un outil très puissant et efficace pour détecter les variations dans l'expression des gènes. Néanmoins, il a fallu modifier le protocole original comme cela a été indiqué précédemment afin d'écartier certains problèmes de reproductibilité observés lorsque l'on applique la méthode telle qu'elle est décrite à l'origine.

15 On a pu mettre en évidence une reproductibilité totale lorsque dans la méthode PCR on introduit un "hot start" suivi par un "touch down".

Les bandes exprimées différentiellement après isolement et réamplification sont néanmoins souvent contaminées par des bandes provenant des ARN qui migrent dans les régions voisines de l'ADNc, si l'on
20 utilise directement ces sondes sur des Northern blots ceci conduit à des erreurs. On a donc sous-cloné les produits de seconde PCR et fait effectuer les analyses des Northern blots utilisés à défaut de recombinant à sonde simple. Le séquençage systématique d'au moins 10 sous-clones recombinants pour chaque bande sélectionnée a montré qu'il était très efficace pour
25 sélectionner les clones d'intérêt.

Le gène p53 est, dans l'état actuel de nos connaissances, le suppresseur tumoral qui est muté dans le plus grand nombre de cancers d'origines très diverses, et l'utilisation du mutant sensible à la température val-135 p53 s'est déjà montrée précédemment fournir des informations très
30 importantes concernant le fonctionnement du p53 sauvage en induisant, soit l'arrêt de la croissance cellulaire en phase G-1, soit l'initiation du programme de mort cellulaire.

Jusqu'à maintenant, les voies moléculaires en amont et en aval de p53 et qui conduisent à la suppression tumorale étaient encore peu claires.

35 Jusqu'à maintenant un certain nombre de gènes en aval de p53 ont été identifiés, il s'agit notamment de gadd 45, mdm 2, mck, "Mouse endogenous retrovirus" LTR, p21-waf et Cycline G.

La présente invention a permis de mettre en évidence l'existence de 11 gènes qui sont exprimés différemment dans les cellules exprimant le p53 sous sa forme suppresseur actif ou bien dans des cellules tumorales exprimant le gène p53 non actif.

5 La figure 1 montre la quantification des signaux d'hybridation correspondant à l'expression différentielle de 8 de ces gènes qui sont activés à 32°C, c'est-à-dire dans lesquels la fonction de p53 sauvage est activée et conduit donc à l'apoptose des cellules, ces gènes qui sont activés seront dénommés ci-après TSAP (pour Tumor Suppressor Activated Pathway), par
10 contre on constate que dans deux expériences 2 gènes exprimés à 37°C sont en partie inhibés à 32°C, ce qui impliquerait qu'ils sont inhibés durant la mort cellulaire programmée, ces gènes ont été dénommés TSIP (pour Tumor Suppressor Inhibited Pathway).

L'analyse des homologies des différentes séquences activées de
15 TSAP 1 à TSAP 3 a montré qu'il s'agissait là de gènes déjà connus. Par contre, les autres ADNc TSAP 4 à TSAP 8 ne montrent aucune homologie significative avec des gènes connus.

Pour l'ADNc TSIP 1 qui est inhibé dans son expression pendant l'apoptose, il ne montre aucune homologie avec des gènes connus.

20 Pour l'ADNc TSIP 2 qui est également inhibé dans son expression pendant l'apoptose, il montre une grande homologie avec le transcript S182 du gène AD3 impliqué dans les voies métaboliques de la maladie d'Alzheimer (Sherrington et al.) (figure 8).

25 Par conséquent, il est possible d'agir sur les voies métaboliques de la maladie d'Alzheimer en agissant sur les voies métaboliques p53 dépendantes.

La présente invention a donc également pour objet, à titre de médicament, un composé assurant l'expression cellulaire de TSIP 2 destiné au traitement de la maladie d'Alzheimer ainsi qu'à titre d'agent de diagnostic
30 pour la détermination de la prédisposition à la maladie d'Alzheimer, tout ou partie de la séquence de TSIP 2 à utiliser comme sonde nucléotidique ou comme amorce d'amplification ainsi qu'un antigène correspondant à tout ou partie des protéines codées par TSIP 2 ou les anticorps, notamment les anticorps monoclonaux correspondants, éventuellement après culture.

35 L'hypothèse que l'on peut faire sur ces gènes inhibés dans leur expression par le p53 sauvage est qu'ils peuvent coder pour des séquences oncogéniques qui seraient régulées en aval du processus de suppression

tumorale ou encore qu'il s'agit de protéines de structure ou du cytosquelette pour lesquelles la régulation en aval de l'expression est concomitante de la mort cellulaire par apoptose.

TSAP 1 est homologue à la phospholipase C bêta 4 de rat. La
5 séquence de TSAP 1 présente 100 % d'identité avec la PLC entre les
nucléotides 3967 et 3985 ; 82 % entre les nucléotides 3986 et 4116 et 85 % entre
les nucléotides 4070 et 4220 (figure 4). La PLC est connue pour être impliquée
dans la voie de signalisation des récepteurs de la tyrosine-kinase, et
pour catalyser l'hydrolyse du phosphatidylinositol-4,5-biphosphate en
10 diacylglycérol et inositol-1,4,5-triphosphate. Toutefois, la présente étude
suggère que la PLC est une cible en aval dans l'apoptose à médiation p53.

TSAP 2 montre des séquences conservées (92 % d'identité entre les
nucléotides 259 et 299 ; 100 % d'identité entre les nucléotides 418 et 458 et 92 %
d'identité entre les nucléotides 645 et 685) avec la protéine digitée au zinc
15 (ZFM 1) qui est localisée dans le locus Multiple Endocrine Neoplasia (MEN 1)
(figure 5). MEN 1 est un désordre dominant autosomal associé avec le
développement de tumeurs affectant le lobe antérieur des glandes pituitaires
et parathyroïdes et les cellules des ilots pancréatiques. Il est particulièrement
intéressant d'avoir mis en évidence qu'à la fois ZFM et une isoenzyme de PLC
20 sont colocalisés dans la même région chromosomique 11q13 contenant le
gène de susceptibilité à MEN 1. Chez la souris, les régions homologues sont
localisées sur le chromosome 19B. Le fait de trouver que TSAP 1 et TSAP 2 sont
activés en réponse à p53 peut suggérer que ces gènes appartiennent à une
voie de suppression des tumeurs plus globale et que p53 peut coopérer avec
25 MEN 1.

TSAP 3 est identique à Siah 1b. Ce gène est l'homologue chez les
vertébrés du gène *Drosophila* seven in absentia (*sina*). Le clone décrit
présente 94 % d'identité avec l'homologue murin (nucléotides 1496 à 1634)
(figure 6). Par analyse Northern blot en utilisant une sonde TSAP 3, on a pu
30 détecter une expression différentielle d'un messager de 1,9 kb de ce gène
(figure 2A). Ceci est confirmé en utilisant une seconde sonde correspondant à
la même région de la séquence *siah* 1b décrite (figure 2B). La figure 2C
montre la distribution tissulaire de ce gène en utilisant une sonde TSAP 3 qui
détecte à la fois l'ARNm de 1,9 et de 2,4 kb correspondant aux résultats
35 mentionnés précédemment lorsqu'une sonde *siah* est utilisée. L'hybridation
in situ montre que l'ARNm de TSAP 3 est induit rapidement 1 heure après
l'induction de l'apoptose (figure 3D). Son expression augmente après 2 et

4 heures (figures 3E et 3F). Dans les cellules qui sont entrées en mitose aucun signal n'est détecté.

Carthew et Rubin ont montré que *seven in absentia* est nécessaire pour le développement de l'oeil de la drosophile. D'autre part, des mutants de ce gène dans la drosophile montrent un rôle beaucoup plus général dans le développement. L'homologue murin est subdivisé en deux groupes *siah 1* et *siah 2* et ces protéines montrent un degré de conservation tout à fait inhabituel par rapport à *drosophila seven in absentia*.

Nos résultats ont montré que TSAP 3 / *siah 1b* est activé dans le programme de mort cellulaire dans les cellules M1 induites par le gène suppresseur de tumeur p53. Comme ce gène code pour une protéine digitée au zinc nucléaire, il pourrait être un facteur de transcription régulateur qui est en aval du signal de p53. Les résultats montrent également un lien direct entre les gènes concernant le développement chez la drosophile et une voie majeure de suppression tumorale.

EXEMPLE 2

En utilisant le fragment d'ADNc murin (TSAP 3), décrit ci-dessus, obtenu par analyse différentielle d'ARNm, on a constitué une sonde pour isoler un fragment de 1,1 kb d'une librairie d'ADNc humain qui ensuite a été expansé jusqu'à la région codante entière par une RACE-PCR.

La figure 7 montre l'ADNc et la séquence d'acides aminés du gène humain *sina* (TSAP 3).

Cette séquence code une protéine de 282 amino-acides avec un motif digité au zinc C3HC4. Cette protéine présente également des analogies avec des protéines capables de se fixer sur l'ARN. La séquence en amino-acides est très conservée entre la Drosophile, la souris et le gène humain (figure 7).

La distribution tissulaire indique que le *sina* humain est exprimé de façon ubiquitaire et code pour un ARNm de 2,3 kb et, dans le placenta, il existe un transcrit additionnel de 2,5 kb.

En analysant des YAC du CEPH et des librairies BAC par PCR, en utilisant des amorces *sina* humains spécifiques, on a pu isoler 8 YAC (350-1000 kb) et 2 BAC (100 et 125 kb).

La fluorescence par hybridation in situ (FISH) utilisant les clones YAC et BAC montre que le *seven in absentia* est localisé sur le chromosome 16q12-13, c'est-à-dire dans une région contenant les gènes suppresseurs de tumeurs candidat dans différents cancers, notamment : cancer du sein (9),

tumeur de Wilm's (10-12), syndrome de Laurence-Moon-Bard et-Biedl (13), syndrome de Beckwith-Wiederman (14).

Comme cela a été indiqué dans la demande de brevet français N° 95 15 146, on a trouvé que des transfectances stables de cellules M1 murines avec le mutant p53 sensible à la température montraient l'activation de seven in absentia après induction de l'apoptose à 32°C. Etant donné que le TSAP 3 murin a été isolé dans un modèle d'apoptose induit par le gène p53, il était logique d'approfondir l'analyse du gène TSAP3 (HUMSIAH) dans un modèle d'apoptose physiologique humain.

10 Ce modèle est décrit dans l'intestin où les cellules migrent du fond de la crypte vers la région apicale des vilosités où elles meurent par apoptose avant d'être larguées dans le lumen. Ces cellules en apoptose sont spécifiquement marquées par la technique TUNEL.

D'autre part, ces mêmes cellules sont positives par hybridation in situ pour le gène TSAP 3 (HUMSIAH) dans l'apoptose physiologique chez l'humain.

Enfin, afin d'investiguer l'implication du gène TSAP 3 humain dans la suppression des tumeurs, on a utilisé un modèle basé sur l'ensemble des gènes plutôt que sur un seul gène. Ce modèle repose sur les propriétés biologiques du parvovirus H-1.

Des recherches très complètes dans ce domaine ont montré sur les 20 dernières années que le parvovirus tue préférentiellement les cellules tumorales alors qu'il épargne leur contrepartie normale.

De façon à élaborer un modèle, on a fait l'hypothèse suivante : s'il était possible de sélectionner, à partir d'une tumeur qui soit sensible à l'effet cytopathique du parvovirus H-1, les cellules qui étaient résistantes, cette résistance pourrait être due à un changement de leur phénotype malin. Ceci a pu être démontré pour les cellules KS sélectionnées à partir des cellules érythro-leucémiques K562 humaines. Tandis que les cellules parentales K562 sont sensibles à l'effet cytopathique du parvovirus H-1, les cellules KS, elles, sont résistantes. Ces cellules résistantes réexpriment le type sauvage de p53 et ont un phénotype supprimé à la fois in vitro et in vivo.

Pour confirmer ces observations sur d'autres cellules, on a sélectionné, à partir d'un monoclonal d'une leucémie monocyttaire U937 humaine, les cellules filles US3 et US4. Ces clones sont résistants à l'effet cytopathique des parvovirus H-1 et montrent une réversion du phénotype malin in vivo. L'analyse de marqueurs de surface pour 20 cellules, indique

qu'il n'y a pas de déplacement dans le stade de différenciation entre U937 et les clones US indiquant que la suppression du phénotype malin n'est pas due à une différenciation terminale.

Ni les cellules K562 ni les cellules U937 n'expriment p53. Par
5 contraste aux cellules KS qui réexpriment p53, les cellules US3 et US4 ne réexpriment p53. Toutefois, on a pu mettre en évidence le fait que les cellules US3 et US4 montraient l'activation de WAF-1 par rapport aux cellules parentales malignes U937. Une telle activation de WAF-1 dans une voie indépendante de p53 alternative a été récemment décrite et les résultats
10 actuels montrent que les clones US3 et US4 utilisent, semble-t-il, cette voie alternative WAF-1.

Le gène *sina* est activé par le type sauvage p53 inductible dans les cellules M1 de même que dans les cellules KS qui réexpriment le type sauvage p53.

15 Tandis que les cellules parentales U937 expriment très légèrement l'ARNm de *sina*, il est activé dans les clones filles US3 et US4 qui ont une réversion de leur phénotype malin et qui réexpriment p21^{waf-1}.

De façon intéressante, *sina* est activé dans les cellules qui deviennent apoptotiques, comme cela est montré par un double marquage
20 utilisant une sonde *sina* pour hybridation in situ combinée avec un essai TUNEL

Ceci permet de démontrer que le gène *sina* humain qui est très conservé dans la phylogénie joue un rôle dans l'apoptose et la suppression tumorale.

25 De façon encore plus importante, *sina* se situe au croisement des voies de p53 et de WAF-1.

En outre, en utilisant le modèle de U937 et US3 et US4, on a pu montrer un lien fonctionnel pour les molécules suppresseurs en utilisant un modèle biologique global qui permet la comparaison à des niveaux
30 moléculaires entre les cellules malignes parentales et les cellules filles directement dérivées. Ces expériences indiquent qu'il n'est pas nécessaire de transférer les gènes suppresseurs de tumeur humains spécifiques de façon à leur conférer le phénotype suppresseur, mais que la réversion tumorale est sous le contrôle d'un système de régulation qui est toujours présent dans le
35 matériel génétique des cellules tumorales bien qu'il soit nécessaire de le réactiver.

TABLEAU

CARACTERISTIQUES DES CLONES

Clone à expression différentielle	Amorces 3' et 5' *	Taille de l'ARNm en kb	Homologie
TSAP 1	T11GC-16	2,0 et 4,5	PLC #
TSAP 2	T11GC-5	5,9	MEN1 §
TSAP 3 (IDS N° 3)	T11CG-4	1,9	siah 1b ¶
TSAP 4	T11GC-6	5,0	Non
TSAP 5	T11CG-5	1,2	Non
TSAP 6	T11AG-1	2,8	Non
TSAP 7	T11GC-16	> 8,0	Non
TSAP 8	T11GC-6	> 10,0	Non
TSIP 1	T11CG-8	3,0	Non
TSIP 2	T11AA-5	3,1	AD3 #

* Les chiffres et les séquences des amorces en 5' correspondent à ceux rapportés par Bauer et al. (4)

Rat phospholipase C-béta 4 ARNm (RATPHOSCB)

§ ARNm humains (HUMMEN1C; HUMZFM1C; HUMZFM1A; HUMMEN1A)

¶ siah-1B ARNm (MMSIAH1B)

AD3, transcript S182 ARNm murin (homologue S182 ARNm humain) (Sherrington et al.).


```

                140      150      160      170      180      190
TSAP 1  GACAGCATCACAAGCCAGTGGGCTTGGTGATAACAACACTCTGCTTTGTGGTGCATTAGGAC
          .....
5  ratPLC GACAGCATCACAAGCCAGTGGGCTTGGTGATAACAACACTCTGCTTTGTGGTGCATTAGGAC
          4130      4140      4150      4160      4170      4180

                200      210      220      230
10 TSAP1 1 ATTTTGAGCTGCTGCTGCTGCAAA-AAAAATAAGAGCCG
          :: :: ..... : : : : : : : : :
          ratPLC ATGTTGAGCTGCTGCTG--GAAAAGGAAAATTAGTGCATTAGTACTTTAATGGCAAGCG
          4190      4200      4210      4220      4230      4240
    
```

15 INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 2

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR:
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: TSAP 2
- (B) EMPLACEMENT:

25 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 2 :

TSAP2

```

10      20      30      40      50      60
TSAP2  GCTTGGAAACCAATCTACAACAGCGAGGGGAAGCGGCTTAACACTCGAGAGTTCCGTACCC
30      .....
humzfm1c.seq CCCCTGAGCCCATCTACAATAGCGAGGGGAAGCGGCTTAACACCCGAGAGTTCCGCACCC
          250      260      270      280      290      300
    
```

```

              70          80          90          100          110          120
TSAP2          GCAAAAAAAAAAATCTCTGTGTTTTCCCTAAGCTTTTCCCTGTGCTAGGGAAAGATCACT
              : : : : : :
5  humzfmlc.seq GCAAAAAGCTGGAAGAGGAGCGGCACAACCTCATCACAGAGATGGTTGCACTCAATCCGG
              310          320          330          340          350          360
              130          140
10 TSAP2          AAGTCCGTGGTTATAGATTGCTT
              : : : : : :
              humzfmlc.seq ATTTCAAGCCACCTGCAGATTACAAACCTCCAGCAACACGTGTGAGTGAT
              370          380          390          400          410

```

- 15 INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 3
 - (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR:
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - 20 (D) CONFIGURATION : linéaire
 - (ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc
 - (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: TSAP 3
 - (B) EMPLACEMENT:
 - 25 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 3 :

```

TSAP3
10
30 TSAP3 3          TTTTTTTTTTTG
              : : : :
              mnsiah1b.seq TTGTAAAATATTTCTGAACTTTGTATTTGTTGTAGATTGATTGTATTGTTGACAATTTTT
              1450          1460          1470          1480          1490          1500

```


INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 4

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR:
- (B) TYPE: nucléotide
- 5 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: TSAP 4
- 10 (B) EMBLACEMENT:

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 4 :

TSAP4

```

AACTCCGTCG TGGGTGTGGG GACCTAATTC CTTATATTTT TACAACAAGC ACTGTACAAA      60
15 CTGTGCCTTT CCCTAATGCA GTTATACTAT TTCCATTAAG ATGGGTAACC TTAGTTAAGG      120
CTTTATATTC ACTGCCATGG GTAGGAATGC TCACGGTGAA TGGGCCAACT TGTCAATGGAA      180
GAAGCCCTCA TTTTCAGTTG GC      202

```

20 INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 5

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR:
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- 25 (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: TSAP 5
- (B) EMBLACEMENT:
- 30 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 5 :

TSAP5

	TAACAAGGAT ATTCAGGTTC GGGATTGCTT TCCTAAGCGA TGATCTCAAC CTCCACGTGG	60
5	AACTGATTTT CCAAGGGACA GAAATGGTCT TTGATCTTTC TGAACCACTT GTCTTCAAAC	120
	TCTTTGGAGG ACGCAACCAC CATGGCAGTC AGGGCTCCGG GGCCACACA CTTCACCTCC	180
	GAATGAAGCT CCTCTTTTAT CTTTCTGGG ACAATGTCTT CCCCATAGC CTCCTCCATC	240
	AACAGCAAAG TACCTTCCCT AAAGTTGAAG TCCTTCACTT TCCCTGCAAT TTCCTGCTGA	300
10	GTCTCAAGT TCTTCTCAA CGCGAATGAT GTTTGCTGAG ACTGGGCGAG CTGAAGCAGG	360
	AGCCTGGCGC GGAGCAAAA GGCGCATGCT TTCCTCCGAG CCTCCATCTG TGCCCTCTCC	420
	CTCCGCCTTG CCAGGGAAGG CATATTCTC CTGAGCACTA CCACTCGCTT CCACGGAGAG	480
	CAGTGCAATC TCAGGCAAGG TCGTGGGCAA AGACAAAAGA GAGCCTGTTC CCGAGTGATC	540
15	AGAGGAGGGA CCGACGGCCT TGTCCTTGA GGCAGAACTC TTCTGTCCCT GCGGTGACAC	600
	CCTGCTGGCA GGCCGGGCCC TGGACTCAGG TATGCCTCTG CCAGCTTACA CCAGCTCCAC	660
	GGTTGAGCG GGTGCAAAGC AATCAGCTTG TGCAGGCAGA AGATCGTGTG CTCCCGGCTC	720
	TGCAGGCTGG AAAAGACGGC CAGGTGGAGG TGGAGCACCA CGGTCAGATG GTCTGTGTTG	780
20	GTGGCTTTGC TTTCCAAGTC TGCCGCCATC TCCAGCGCCT CCTCATGCCT CCCAAGTGAG	840
	CCAGACACCG AGCCTGGCCT TCTTGGACAT CCCTTTTCAT GGCAAAATTA GTAGATGGTA	900
	ATGTTCCGAG ATATGGAGTA TTCCTGCAGG GCTTTCTCGT ATTCCTGTGG TCTGTAGGCC	960
	AGGTCCCTTC TGAATTTCTT GAGAGTGAGA ACTTCAATAT CGTCACTACA TTCTGTCTCT	1020
25	TCATAAAACC ATGCGGCTCG CAGAGCTTGG CGCGGTAGGG GGAGGGCGGC TCGGGCCGGC	1080
	GCTCCGGCCT CTGCTCGAAC ACCGAGTCCT CAAATTCGCC GCCCAGCACC CAGCATCCGG	1140
	TCTCCATCGC GCGGAAGTGC AACTGGACCT CGAAACGAGG CGACACCTAG ASCGACGCCC	1200
30	ATCACCCAGC CTCCAAGCG CGCGACAGCA GCCGCGCCAA GGCTGCCGAG GCAAGGTAGA	1260
	GACCTGCCCG GGCGGCCGCT CGAGCCCTAT AGTGAGTCST ATTAGGATGG	1310

INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 6

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR:

(B) TYPE: nucléotide

5 (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: TSAP 6

10 (B) EMBLACEMENT:

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 6 :

TSAP6

15	GTGAGTACAT ATCACATGTA TGSSGTGTC	TTCTGAGTAT GTCASTTTAC ACCTGCATCC	60
	CAGGAATTAG GATCTCAGCC ACCCACCAT	ATATCATCAC CTCGCTGTGC AGCATCCAGA	120
	AAAGAGACCC GAACCCAGCT CAGGGCCCC	ACAAGCCATC TCCACTTCCA GGGCCTCACA	180
	CGTGGCTTGT TTTCTCCCC TGTGTGGT	CGCCGGACAG CATGAACTTG ACAGCCCCAT	240
20	CTTTCTCCCA GCCCCTGCGG ATCTGGTGA	GTCTGCGGTT TGAGGCAGGG CAGGAGGAAG	300
	AGGCCCTTGG CCAGGATGAT TCACACAGGG	GCAGGGAGCA GCCTGAGTST GGAATSTGGG	360
	GCGGGCAGGT AGAACTTGKT AGTGSTTTT	CCTNCAAAAG GCACGGGTCC AGCCCTAGGT	420
	GAGTGTGTGC ATTGTGCTGA GTATCAGGGC	CACGAAGCCC AGTGTGGACT GCACGAAGCT	480
25	GAACTCCTTC CAGTTGAGGG AATTAGCAAT	GGACGGGAGC GAGGTGACAG CCAGCAGCGA	540
	CAACATGCCC AGGGCCAGCA CACCCAGGGA	CAGGTATATC TCCATCCTCC AGACTTCTTC	600
	CTCAGCCCAG AGGCGGCTCT TGTGCGCCAG	GACCTGCTTC ACAGCCAGAT TGACCAGGTC	660
	GTAGGCGGTG GGAGCGGCGC AGCGGCAGGC	AGAAGCTGTA GAGAGCCTCC AGCATCGCGA	720
30	AGAAGAAGCT GAGCAGCCCC ATCTGCTTGC	GATGCTGCAG CCAGTGGTCC AGCCAGTCTG	780
	GGAAGCGCTG GFACTTGGTC CCCCTCCGCA	GCTGAAGCGC AGCTGCCAGC ACACCCGGCA	840
	GGTACACTAG GGACAGCAGC ACATAAGCCA	CACAGGGTAG TGTGGTGTG ACCACAGACA	900
	AGGGCATCTT GTAAAAGTTG TTCTCATCTT	TCCGAATGTN TGGCTGTANA ACCTCCCGGA	960
35	TGAAATTGTA GGTGTANAAN CACACAAAGA	CCCCAGTGCC CAGGAAGGTG GGGCCCTTCC	1020

AGAATGGAAG GAAGCNCAGG GGTTTNGCTT CTACCTCCCT CNCTGAAGGC CANGGATCCA 1080
 TNTCCAGGGG TTNA AACCAT NGGGCGTGCA TCTCTGAAAA TGGTCNCTTG GNTTCTGGTH 1140
 GATCANTGCA AATAACNCCT GCCTGTTCN TCCCTTGGGG CCACCCTNTN GGGGCCATGC 1200
 5 CAA 1203

INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 7

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR:
 - 10 (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION : linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc
- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - 15 (A) NOM/CLE: TSAP 7
 - (B) EMPLACEMENT:
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 7 :

TSAP7

20 GCCCATCCAG TCATTCTTTA TTTCAGTGTG TGAAAGCCTC CTACGGATTT TCCCCAAAT 60
 TAATTTTAA TCCATTTTCA AACCAGCCTT TACTGTGSCC TTTTCTGCTA TTTTIGATAT 120
 ATGTTASGAC GTGTGCATAG 140

25 INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 8

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR:
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - 30 (D) CONFIGURATION : linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc
- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: TSAP 8
 - (B) EMPLACEMENT:
- 35 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 8 :

TSAP8

CACGTNAAAG TACCACATCC NCCCCATTG GTAGATATTG ANAGAGTATA TANATAGGNC 60
 GAAGCACAAT CTCTTCCCTT CCTNTGTACA CCTCANACCC AGTGACTTCC NACCNAAGCN 120
 5 CNTGANTGTN TTTGTNGATA TGAGTGTCTG NGTGTGTGNA TNTGCGTCTC ACATGTATGG 180
 GACGACCNAC CCCACCCCCA GCGGCCTTCA NGCACAATNG AGGACGCCTA TNGTGGATAC 240
 GNGCATCGGT_AAANAGC 257

INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 9

10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR:
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

15 (ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: TSIP 1
- (B) EMBLACEMENT:

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 9 :

20 **TSIP1**

GGAGGGGGTC TAGCTTTCTC TTTAGTTATC ACTCTGAGGT GCTCAGGTCA CAGAGAAGGC 60
 ACTTAATTGG GAAGGTCATC TGATTCCGGC CATCTTCTCT CCCTTTACCA A 111

25 INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 10

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR:
- (B) TYPE: nucléotide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

30

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: TSIP 2
- (B) EMBLACEMENT:

35 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 10 :

TSIP2

	CACCGGTGAGACCTCTAGGGCGGGGCTAGGACGACCTGCTCCGTGGGCCGCGAGTATTC	60
	GTCCGAAACAAAACAGCGGCAGCTGAGGCGGAAACCTAGGCTGCGAGCCGGCCGCCCGG	120
5	CGCGGAGAGAGAAGGAACCAACACAAGACAGCAGCCCTTCGAGGTCTTTAGGCAGCTTGG	180
	AGGAGAACACATGAGAGAAAGAATCCCAAGAGGTTTTGTTTTCTTTGAGAAGGTATTTCT	240
	GTCCAGCTGCTCCAATGACAGAGATACCTGCACCTTTGTCTACTTCCAGAATGCCCAGA	300
	TGTCTGAGGACAGCCACTCCAGCAGCGCCATCCGGAGCCAGAATGACAGCCAAGAACGGC	360
10	AGCAGCAGCATGACAGGCAGAGACTTGACAACCCTGAGCCAATATCTAATGGCCGGCCCC	420
	AGAGTAACTCAAGACAGGTGGTGGAAACAAGATGAGGAGGAAGACGAAGAGCTGACATTGA	480
	AATATGGAGCCAAGCATGTCATCATGCTCTTTGTCCCCGTGACCCTCTGCATGGTCGTCG	540
	TCGTGGCCACCATCAAATCAGTCAGCTTCTATACCCGGAAGGACGGTCAGCTAATCTACA	600
	CCCCATTCACAGAAGACACTGAGACTGTAGGCCAAAGAGCCCTGCACTCGATCCTGAATG	660
15	CGGCCATCATGATCAGTGTCAATTGTCATTATGACCATCCTCCTGGTGGTCCTGTATAAAT	720
	ACAGGTGCTACAAGGTCATCCAGCCCTGGCTTATTATTTTCATCTCTGTTGTTGCTGTTCT	780
	TTTTTTCGTTTCAATTTACTTAGGGGAAGTATTTAAGACCTACAATGTCGCCGTGGACTACG	840
	TTACAGTAGCACTCCTAATCTGGAATTTTGGTGTGGTCGGGATGATTGCCATCCACTGGA	900
20	AAGGCCCCCTTCGACTGCAGCAGGCGTATCTCATTATGATCAGTGCCCTCATGGCCCTGG	960
	TATTTATCAAGTACCTCCCCGAATGGACCGCATGGCTCATCTTGGCTGTGATTTCAGTAT	1020
	ATGATTTGGTGGCTGTTTTATGTCCCAAAGGCCCACTTCGTATGCTGGTTGAAACAGCTC	1080
	AGGAAAGAAATGAGACTCTCTTTCCAGCTCTTATCTATTCCTCAACAATGGTGTGGTTGG	1140
25	TGAATATGGCTGAAGGAGACCCAGAAGCCCCAAAGGAGGGTACCCAAGAACCCCAAGTATA	1200
	ACACACAAAGAGCGGAGAGAGAGACACAGGACACTGGTTCTGGGAACGATGATGGTGGCT	1260
	TCAGTGAGGAGTGGGAGGCCCAAAGAGACAGTCACTGGGGCCTCATCGCTCCACTCCCC	1320
	AGTCAAGAGCTGCTGTCCAGGAACTTTCTGGGAGCATTCTAACGAGTGAAGACCCGGAGG	1380
	AAAGAGGAGTAAACTTGGACTGGGAGATTTTCATTTTCTACAGTGTCTGGTTGTAAGG	1440
30	CCTCAGCAACCCGAGTGGAGACTGGAACACAACCATAGCCTGCTTTGTAGCCATACTGA	1500
	TCGGCCTGTGCCTTACATTAATCCTGCTCGCCATTTTCAAGAAAGCGTTGCCAGCCCTCC	1560
	CCATCTCCATCACCTTCGGGCTCGTGTCTACTTCGCCACGGATTACCTTGTGCAGCCCT	1620
	TCATGGACCAACTTGCAATCCATCAGTTTTATATCTAGCCTTTCTGCAGTTAGAACATGG	1680
	ATGTTTCTTCTTTGATTATCAAAAACAAAAACAGAGAGCAAGCCCGAGGAGGAGACTG	1740
35	GTGACTTTCCTGTGTCCTCAGCTAACAAAGGCAGGACTCCAGCTGGACTTCTGCAGCTTC	1800
	CTTCCGAGTCTCCCTAGCCACCCGCACTACTGGACTGTGGAAGGAAGCGTCTACAGAGGA	1860

INFORMATIONS POUR LA SEQ ID N° : 11

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR:
- (B) TYPE: nucléotide
- 5 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION : linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE : ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

- (A) NOM/CLE: TSAP 3 humain
- 10 (B) EMLACEMENT:

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID N° 11 :

TSAP3 humain

```

m s r q t a t a l p t g t s k c p p s q
atgagccgtcagactgctacagcattacctaccggtacctcgaagtgtccaccatcccag
      10      20      30      40      50      60
15 r v p a l t g t t a s n n d l a s l f e
agggtgcoctgcoctgactggcacaactgcatcccaacaatgacttggcgagtctttttgag
      70      80      90      100     110     120

c p v c f d y v l p p i l q c q s g h l
tgtccagttctgctttgactatgtggtaccgcccattcttccaatgtcagagtgcccatctt
      130     140     150     160     170     180
20 v c s n c r p k l t c c p t c r g p l g
gtttgtagcaactgtgcgcccagaagctcacatgttgtccaacttggccggggccctttggga
      190     200     210     220     230     240

s i r n l a m e k v a n s v l f p c k y
tccattcgcaacttggctatggagaaagtggctaattcagtaactttccctgtaaatat
      250     260     270     280     290     300

a s s g c e i t l p h t e k a d h e e i
gggtctttctggatgtgaaataactctgtccacacacagaaaaagcagaccatgaagagctc
25      310     320     330     340     350     360

c e f r p y s c p c p g a s c k w q g s
tgtgagtttaggccttattctctgtccgtgcccctgggtgcttctctgtaaattggcaaggctct
      370     380     390     400     410     420

l d a v m p h i m h q h k s i t t l q g
ctggatgctgtaatgcccctctgatgcatcagcataagtcattacaacctacagga
      430     440     450     460     470     480
30 e d i v f l a t d i n l p g a v d w v m
gaggatatagttttcttctgctacagacattaatcttctctgggtgctggtgactgggtgatg
      490     500     510     520     530     540

m q s c f g f h f m l v l e k q e k y d
atgcagtcctgttttggctttcacttcatgttagtcttagagaaacaggaaaaataacgat
      550     560     570     580     590     600

g h q q f f a i v q l i g t r k q a e n
35 ggtcaccagcagttcttctgcaatcgtacagctgataggaacacgcaagcaagctgaaaat
      610     620     630     640     650     660
    
```

f a y r l e l n g h r r r l t w e a t p
 ttgcttaccgacttgagctaaatgggtcatagggcagcattgacttgggaagcgactcct
 670 680 690 700 710 720

r s i h e g i a t a i m n s d c l v f d
 cgatctattcatgaaggaattgcaacagccattatgaatagcgactgtctagtctttgac
 730 740 750 760 770 780

5 p a l h s f l q t n g n l g i n v t i s
 ccagcattgcacagctttttgcagacaaatggcaatttaggcacatcaatgtaactattcc
 790 800 810 820 830 840

m c *
 atgtgttgaaatggcaatcaaacattttctggccagtgtttaaacttcagttcacaga
 850 860 870 880 890 900

10 aaataaggcaccatctgtctgccaacctaaaactctttcggtaggtagaagctcgacat
 910 920 930 940 950 960

gaaggccaataaaaagaaagactgctaaatacaggaacagttccatgtagtaacactaa
 970 980 990 1000 1010 1020

tatatttaaaaataagtcacagtaaacactgaaaaatataatgtatatataccccaaga
 1030 1040 1050 1060 1070 1080

15 tgggcactctttgtattaagaaaggaagcattgtaaaaataattctgagctttgtgtttgt
 1090 1100 1110 1120 1130 1140

tgtagattgattgtattgttgaaaaagttgtttttgcgtgggagtggtgcttggtgg
 1150 1160 1170 1180 1190 1200

gtgtgtggtgttttgggtttttttcttttaactgacaagccatcttgagtggtatgggc
 1210 1220 1230 1240 1250 1260

20 caatgctttttccctttgtgagtcacatagtgctgctgtaagccgtttttgtgtgtat
 1270 1280 1290 1300 1310 1320

ttgcaatttttattaattttcagttttccattaaataaatttgactttttctgtaattcag
 1330 1340 1350 1360 1370 1380

gtttttccctttttgtaccattttaaagttagtatcttttgatattggcatatttgttta
 1390 1400 1410 1420 1430 1440

25 tggtaaaaaatttataacgggttcaatattttcttttccccattaatcaagttcattgg
 1450 1460 1470 1480 1490 1500

aaatattttaaaaccagcctattttgggtgaaccatgagttcccagaaagtaagggtgac
 1510 1520 1530 1540 1550 1560

accggaaaaataatccaaaagcctattttaaagccacctataaggtgccccctttcttg
 1570 1580 1590 1600 1610 1620

30 ttttctacagatgagtcacacctttgagccttaacctttgaaagggttagagaataaatt
 1630 1640 1650 1660 1670 1680

gatttttataaatactgcaaatccaggcttttgttttctttttccagatattcctggaca
 1690 1700 1710 1720 1730 1740

aatcacatattttaaaatttgtttctgtattttattggttttgcagaagaaggcatcgtca
 1750 1760 1770 1780 1790 1800

35 tgcacagtatttgaatttaaagcaaatcatttgttttaaaaaggcagttttgcaaaaaat
 1810 1820 1830 1840 1850 1860

gtttttggcttttttataatttca
 1870 1880

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Liang P. & Pardee A.B. (1992) *Science*, 257, 967-971.
- (2) Don R.H., Cox P.T., Wainwright B.J., Baker K. & Mattick J.S. (1991) *Nucl. Acids Res.*, 19, 4008.
- (3) Yonish-Rouach E., Resnitzky D., Lotem J., Sachs L., Kimchi A. & Oren M. (1991) *Nature* 352, 345-347.
- (4) Bauer D., Muller H., Reich J., Riedel H., Ahrenkiel V., Warthoe P. & Strauss M. (1993) *Nucl. Acids Res.* 21, 4272-4280.
- (5) Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: a laboratory manual*.
- (6) Okamoto K. & Beach D. (1994) *EMBO J.*, 13, 4816-4822.
- (7) Angerer L. & Angerer R.C. (1991) *Methods in cell biology : functional organization of the nucleus*, 35, 37-71.
- (8) Linares-Cruz G., Rigaut J.P., Vassy J., De Oliveira T.C., De Cremoux P., Olofsson B. & Calvo F. (1994) *J. Microsc.*, 173, 27-38.
- (9) Bieche I. and Lidereau R., *Genes Chromosomes and Cancer* 14, 227-251 (1995).
- (10) Wang-Wuu S., Soukup S., Bove K., Gotwals B. and Lampkin B., *Cancer Research* 50, 2786-2793 (1990).
- (11) Maw M.A. et al., *Cancer Research* 52, 3094-3098 (1992).
- (12) Austruy E. et al., *Genes, Chromosomes and Cancer*, 14, 285-294 (1995).
- (13) Kuytek-Black A.E. et al., *Nat. Genet* 5(4) 392-396 (1993).
- (14) Newsham I. et al., *Genes Chromosomes and Cancer* 12(1). 1-7, (1995).
- (15) Sherrington et al., *Nature*, vol. 375, p. 754-760 (1995).

REVENDICATIONS

- 1) Séquence nucléotidique correspondant à un gène comportant :
- 5 (a) une séquence selon l'une des IND.SEQ 4 à 11 ou
un gène équivalent qui comporte :
- (b) une séquence s'hybridant avec l'une des séquences selon (a),
(c) une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec (a)
ou (b), ou
- 10 (d) une séquence codant pour une protéine codée par un gène
selon (a), (b) ou (c) ou pour une protéine équivalente.
- 2) Séquence selon la revendication 1, caractérisée en ce que
l'expression cellulaire du gène est induite lors de l'apoptose cellulaire.
- 3) Séquence nucléotidique correspondant à un gène comportant :
- 15 (a) une séquence selon l'une des IND.SEQ 1 et 3 ou
un gène équivalent qui comporte :
- (b) une séquence s'hybridant avec l'une des séquences selon (a),
(c) une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec (a)
ou (b), ou
- 20 (d) une séquence codant pour une protéine codée par un gène
selon (a), (b) ou (c) ou pour une protéine équivalente,
caractérisée en ce que l'expression cellulaire du gène est induite par la
suppression tumorale.
- 4) Séquence nucléotidique correspondant à un gène comportant :
- 25 (a) une séquence selon l'une des IND.SEQ 2 ou
un gène équivalent qui comporte :
- (b) une séquence s'hybridant avec l'une des séquences selon (a),
(c) une séquence présentant au moins 80 % d'homologie avec (a)
ou (b), ou
- 30 (d) une séquence codant pour une protéine codée par un gène
selon (a), (b) ou (c) ou pour une protéine équivalente,
caractérisée en ce que l'expression cellulaire du gène est induite par
l'apoptose cellulaire.
- 5) Séquence selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en
ce que l'expression cellulaire du gène est induite par p53.
- 35 6) Séquence selon la revendication 2 ou 4, caractérisée en ce que
l'apoptose cellulaire est induite par p53.

7) Séquence selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi TSAP 1 à TSAP 8 et TSAP 3 humain ou un gène équivalent.

8) Séquence selon la revendication 1, caractérisée en ce que
5 l'expression cellulaire du gène est inhibée lors de l'apoptose cellulaire.

9) Séquence selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'apoptose cellulaire est induite par p53.

10) Séquence selon l'une des revendications 1 et 8 et 9, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi TSIP 1 et TSIP 2 ou un gène
10 équivalent.

11) Vecteur d'expression cellulaire d'une séquence selon l'une des revendications 1 à 10.

12) Vecteur d'expression selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur viral.

13) Vecteur selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il s'agit
15 d'un adénovirus, d'un rétrovirus, d'un virus herpès ou d'un poxvirus.

14) Vecteur selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur à acide nucléique nu.

15) Vecteur selon l'une des revendications 11 à 13, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence assurant le ciblage et/ou l'expression
20 spécifique des tissus ou organes.

16) Cellule transformée par un vecteur d'expression selon l'une des revendications 11 à 15.

17) Protéine pouvant être obtenue par culture de cellule transformée selon la revendication 16 et codée par la séquence selon l'une
25 des revendications 1 à 10.

18) A titre de médicament, un vecteur selon l'une des revendications 11 à 15 ou une protéine selon la revendication 17.

19) A titre de médicament, un composé assurant l'expression
30 cellulaire d'au moins une des séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 1 à 7 ou de leurs produits.

20) A titre de médicament selon la revendication 19, un vecteur nucléotidique assurant l'expression cellulaire de ladite séquence.

21) A titre de médicament, un composé assurant l'inhibition de
35 l'expression cellulaire d'au moins un gène cellulaire selon l'une des revendications 1, 8 à 10 ou de leurs produits.

22) A titre de médicament selon la revendication 21, un nucléotide activé assurant le blocage de la séquence nucléotidique.

23) A titre de médicament selon la revendication 21, un anticorps monoclonal dressé contre la ou les protéines codées par la séquence nucléotidique.

24) A titre de médicament destiné au traitement du cancer, un médicament selon l'une des revendications 18 à 23.

25) A titre de médicament destiné au traitement de la maladie d'Alzheimer, un médicament selon l'une des revendications 18 à 23.

26) A titre d'agent de diagnostic notamment pour la détermination de la prédisposition et le suivi des cancers, tout ou partie des séquences selon l'une des revendications 1 à 10 à utiliser comme sonde nucléotidique ou comme amorce d'amplification.

27) A titre d'agent de diagnostic notamment pour la détermination de la prédisposition et le suivi des cancers un antigène correspondant à tout ou partie des protéines codées par la séquence selon l'une des revendications 1 à 10 ou les anticorps correspondants.

28) A titre d'agent de diagnostic notamment pour la détermination de la prédisposition et le suivi de la maladie d'Alzheimer, tout ou partie des séquences selon l'une des revendications 1, 5, 7 à 10 à utiliser comme sonde nucléotidique ou comme amorce d'amplification.

29) A titre d'agent de diagnostic notamment pour la détermination de la prédisposition et le suivi de la maladie d'Alzheimer un antigène correspondant à tout ou partie des protéines codées par la séquence selon l'une des revendications 1, 5, 7 à 10 ou les anticorps correspondants.

30) A titre d'agent antiviral, un médicament selon la revendication 20.

31) Modèle pour la mise en évidence de médicament anti-cancéreux, des cellules selon la revendication 16.

32) A titre de perfectionnement de la méthode de Liang et Pardee le fait d'utiliser une diminution en palier lors de l'amplification PCR.

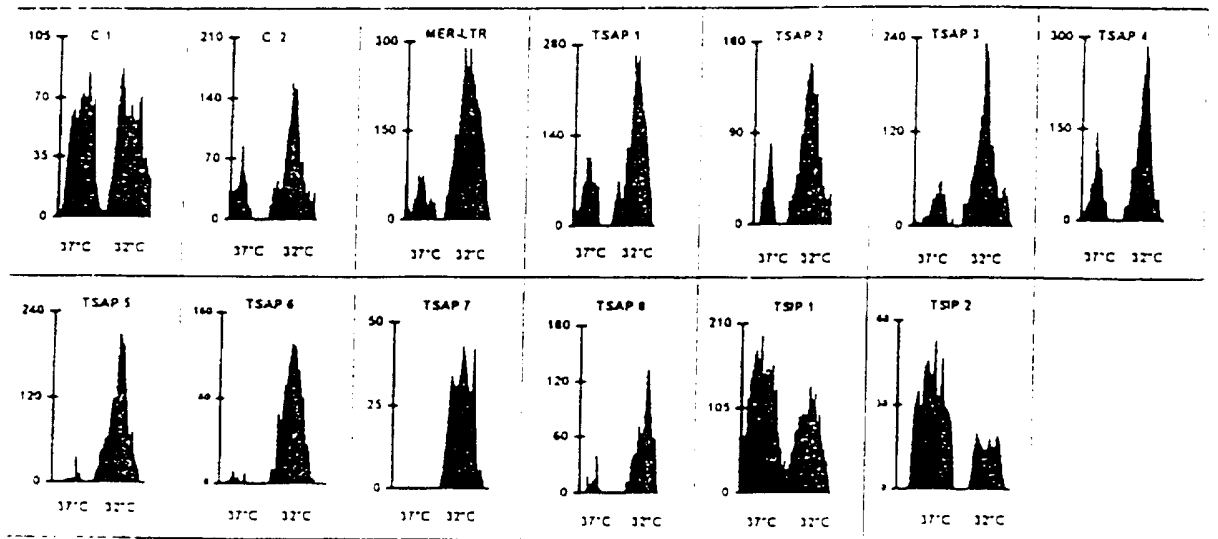


FIG. 1

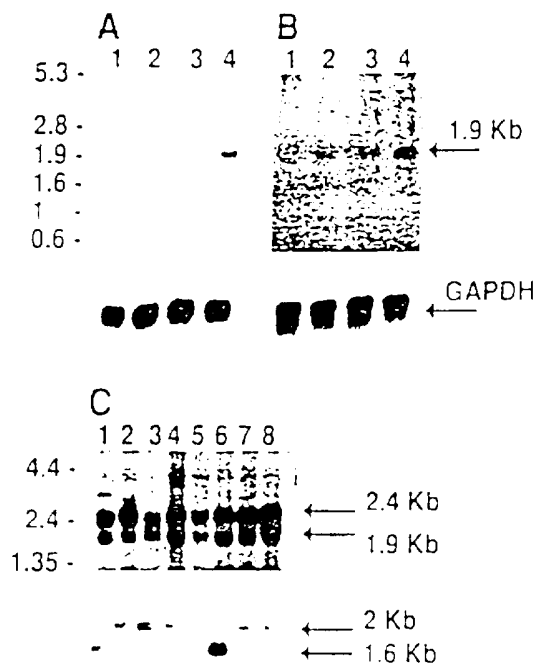


FIG. 2

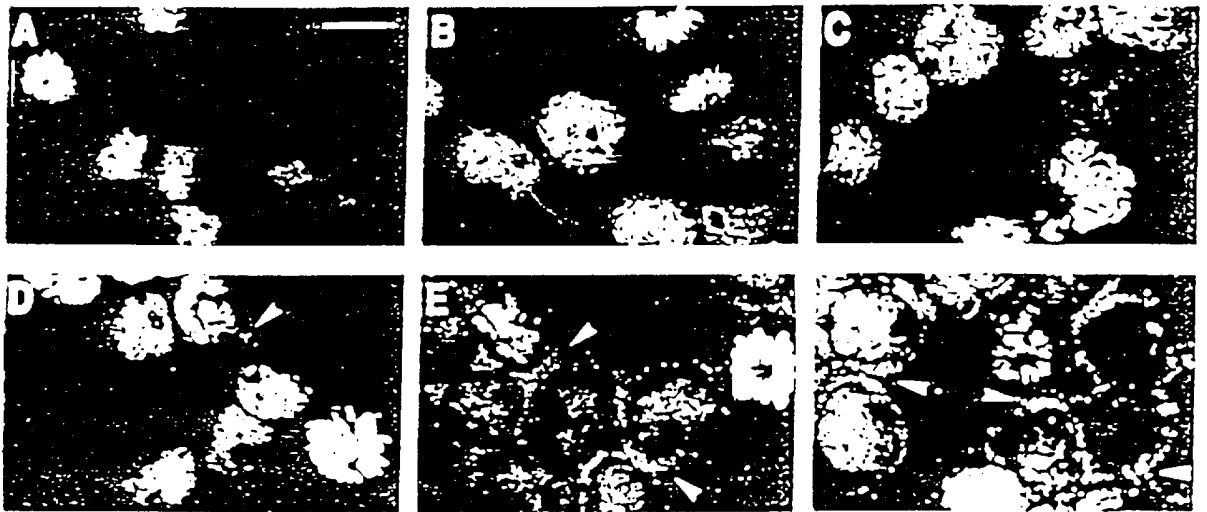


FIG. 3


```

HUMSIAH -----MSRQTATALPTGTSKCPPSQRVPALTGTTASNN-----
MMSIAH1A_1 -----MSRQTATALPTGTSKCPPSQRVPALTGTTASNN-----
MMSIAH1B_1 -----MSRQAATALSTGTSKCPPSQRVPALDTTASNN-----
DROSINA_1 MSNKINPKRREPTAAAAGAGATGVATNTSTSTGSSSAGNTSSANTSSSSSSSLSSAGGGD
          * * * * *

HUMSIAH -----DLASLFECPVCFDYVLPPI LQCQSGHLVCSNCRPKLTCCPTCRGPLGSI RN LAME
MMSIAH1A_1 -----DLASLFECPVCFDYVLPPI LQCQSGHLVCSNCRPKLTCCPTCRGPLGSI RN LAME
MMSIAH1B_1 -----DLASLFECPVCFDYVLPPI LQCQSGHLVCSNCRPKLTCCPTCRGPLGSI RN LAME
DROSINA_1 AGMSADLTSLFECPVCFDYVLPPI LQCSSGHLVCSNCRPKLTCCPTCRGPLANIRNLAME
          * * * * *

HUMSIAH KVANSVLFPC KYASSGCEITLPHTEKADHEELCEFRPYSCPCPGASC KWQGS L DAVM PHL
MMSIAH1A_1 KVANSVLFPC KYASSGCEITLPHTEKAEHEELCEFRPYSCPCPGASC KWQGS L DAVM PHL
MMSIAH1B_1 KVANSVLFPC KYASSGCEITLPHTKAEHEELCEFRPYSCPCPGASC KWQGS L DAVM PHL
DROSINA_1 KVASNVKFPCKHSGYGCTASLVYTEKTEHEETCECRPYLCPCPGASC KWQGPLDLVMQHL
          * * * * *

HUMSIAH MHQHKSI TTLOGEDIVFLATDINLPGAVDWMQSCFGHFMLVLEKQEKYDGHQQFFAI
MMSIAH1A_1 MHQHKSI TTLOGEDIVFLATDINLPGAVDWMQSCFGHFMLVLEKQEKYDGHQQFFAI
MMSIAH1B_1 MHQHKSI TTLOGEDIVFLATDINLPGAVDWMQSCFGHFMLVLEKQEKYDGHQQFFAI
DROSINA_1 MMSHKSI TTLOGEDIVFLATDINLPGAVDWMQSCFGHFMLVLEKQEKYDGHQQFFAI
          * * * * *

HUMSIAH VQLIGTRKQAENFAYRLELNGHRRRLTWEATPRSIHEGIATAIMNSDCLVFDTSIAQLFA
MMSIAH1A_1 VQLIGTRKQAENFAYRLELNGHRRRLTWEATPRSIHEGIATAIMNSDCLVFDTSIAQLFA
MMSIAH1B_1 VQLIGTRKQAENFAYRLELNGHRRRLTWEATPRSIHEGIATAIMNSDCLVFDTSIAQLFA
DROSINA_1 VQLIGSRKEAENFVYRLELNGNRRRLTWEAMPRSIHEGVASAIHNSDCLVFDTSIAQLFA
          * * * * *

HUMSIAH ENG N L G I N V T I S M C
MMSIAH1A_1 ENG N L G I N V T I S M C
MMSIAH1B_1 ENG N L G I N V T I S M C
DROSINA_1 D N G N L G I N V T I S L V
          * * * * *

```

FIG. 7

1 mms182	-----	10	20	30
3			
2 tsip2	CACCGGTGAG ACCTCTAGGG CGGGGCCTAG			
1 mms182	-----	40	50	60
3			
2 tsip2	GACGACCTGC TCCGTGGGCC GCGAGTATTC			
1 mms182	-----acc anacancggc agctgaggcg	70	80	90
3			
2 tsip2	GTCGGAAACA AAACAGCGGC AGCTGAGGCC			
1 mms182	-----	100	110	120
3			
2 tsip2	gaaacctagg ctgcgagccg gccgccccggg			
1 mms182	-----	130	140	150
3			
2 tsip2	GAAACCTAGG CTGCGAGCCG GCCGCCCCGGG			
1 mms182	cgcgagagaga gaaggaacca acacaagaca	150	170	180
3	-----			
2 tsip2	CGCGGAGAGA GAAGGAACCA ACACAAGACA			
1 mms182	gcagcccttc gaggtcttta ggcagcttgg	190	200	210
3	-----			
2 tsip2	GCAGCCCTTC GAGGTCTTTA GGCAGCTTGG			
1 mms182	aggagaacac atgagagaaa gaatcccaag	220	230	240
3	-----			
2 tsip2	AGGAGAACAC ATGAGAGAAA GAATCCCAAG			
1 mms182	aggttttgac ttctttgaga aggtatttct	250	260	270
3	-----			
2 tsip2	AGGTTTTGAC TTCTTTGAGA AGGTATTTCT			
1 mms182	gtccagctgc tccaatgaca gagatacctg	280	290	300
3	-----			
2 tsip2	GTCCAGCTGC TCCAATGACA GAGATACCTG			
1 mms182	cacctttgtc ctacttccag aatgcccaga	310	320	330
3	-----			
2 tsip2	CACCTTTGTC CTACTTCCAG AATGCCCAGA			
1 mms182	tgtctgagga cagccactcc agcagcgcca	340	350	360
3	-----			
2 tsip2	TGTCTGAGGA CAGCCACTCC AGCAGCGCCA			

FIG. 8

1 3 2	mms182 tsip2	340 350 360	tccggagcca gaatgacagc caagaacggc ----- TCCGGAGCCA GAATGACAGC CAAGAACGGC
1 3 2	mms182 tsip2	370 380 390	agcagcagca tgacaggcag agacttgaca ----- AGCAGCAGCA TGACAGGCAG AGACTTGACA
1 3 2	mms182 tsip2	400 410 420	accctgagcc aatatctaat gggcggcccc ----- ACCCTGAGCC AATATCTAAT GGGCGGCCCC
1 3 2	mms182 tsip2	430 440 450	agagtaactc aagacaggtg gtggaacaag ----- AGAGTAACTC AAGACAGGTG GTGGAACAAG
1 3 2	mms182 tsip2	460 470 480	atgaggagga agacgaagag ctgacattga ----- ATGAGGAGGA AGACGAAGAG CTGACATTGA
1 3 2	mms182 tsip2	490 500 510	aatatggagc caagcatgtc atcatgctct ----- AATATGGAGC CAAGCATGTC ATCATGCTCT
1 3 2	mms182 tsip2	520 530 540	ttgtccccgt gaccctctgc atggtcgtcg ----- TTGTCCCCGT GACCCTCTGC ATGGTCTCG
1 3 2	mms182 tsip2	550 560 570	tccgtggcccac catcaaatca gtcagcttct ----- TCGTGGCCAC CATCAAATCA GTCAGCTTCT
1 3 2	mms182 tsip2	580 590 600	ataccgggae ggacggtcag ctaatctaca ----- ATACCCGGAA GGACGGTCAG CTAATCTACA
1 3 2	mms182 tsip2	610 620 630	ccccattcac agaagacact gagactgtag ----- CCCCATTCAC AGAAGACACT GAGACTGTAG
1 3 2	mms182 tsip2	640 650 660	gccaaagagc cctgcaactcg atcctgaatg ----- GCCAAAGAGC CCTGCAACTCG ATCCTGAATG

FIG. 8 (suite)

1 3 2	mms182 tsip2	670 cggccatcat gaccagtgtc attgtcatca ----- CGGCCATCAT GACCAGTGTC ATTGTCAATTA	680 ----- -----	690 ----- -----
1 3 2	mms182 tsip2	700 tgaccatcct cctggggtggtc ctgtataaat ----- TGACCATCCT CCTGGGTGGTC CTGTATAAAT	710 ----- -----	720 ----- -----
1 3 2	mms182 tsip2	730 acaggtgcta caaggtcata caccgctggc ----- ACAGGTGCTA CAAGGTCATC CACGCCTGGC	740 ----- -----	750 ----- -----
1 3 2	mms182 tsip2	760 ctattatttc atctctgttg ttgctgttct ----- TTATTATTTC ATCTCTGTTG TTGCTGTTCT	770 ----- -----	780 ----- -----
1 3 2	mms182 tsip2	790 ttttttcggt catttactta ggggaagtat ----- TTTTTTCGTT CATTTACTTA GGGGAAGTAT	800 ----- -----	810 ----- -----
1 3 2	mms182 tsip2	820 ttaagacctt caatgtcgcc gtggactacc ----- TTAAGACCTA CAATGTGCCC GTGGACTACC	830 ----- -----	840 ----- -----
1 3 2	mms182 tsip2	850 ttacagttagc acccctaatic tggaaattctg ----- TTACAGTAGC ACCCCTAATIC TCGAATTTTC	860 ----- -----	870 ----- -----
1 3 2	mms182 tsip2	880 gtgtgggtcgg gatgattgcc atccactgga ----- GTGTGGGTCCG GATGATTGCC ATCCACTGGA	890 ----- -----	900 ----- -----
1 3 2	mms182 tsip2	910 aaggccccct tcgactgcag caggcgtatc ----- AAGGCCCCCT TCGACTGCAG CAGGCGTATC	920 ----- -----	930 ----- -----
1 3 2	mms182 tsip2	940 tcattatgat cagtgccttc atggccctgg ----- TCATTATGAT CAGTGCCTTC ATGGCCCTGG	950 ----- -----	960 ----- -----
1 3 2	mms182 tsip2	970 tatttatcaa gtacctcccc gaatggaccg ----- TATTTATCAA GTACCTCCCC GAATGGACCC	980 ----- -----	990 ----- -----

FIG. 8 (suite)

1	mms182	catggctcat	cttggctctg	atttcagtat
3		-----	-----	-----
2	tsip2	CATGGCTCAT	CTTGGCTCTG	ATTTCAGTAT
1	mms182	atgatttggc	ggctgtctta	tgccccaaag
3		-----	-----	-----
2	tsip2	ATGATTTGGT	GGCTGTTTAA	TGCCCCAAAG
1	mms182	gcccacttcg	tatgctggct	gaaacagctc
3		-----	-----	-----
2	tsip2	GCCCACTTCG	TATGCTGGCT	GAAACAGCTC
1	mms182	aggaaagaaa	tgagactctc	cttccagctc
3		-----	-----	-----
2	tsip2	AGGAAAGAAA	TGAGACTCTC	TTCCAGCTC
1	mms182	ctatctattc	ctcaacaatg	gtgtggttgg
3		-----	-----	-----
2	tsip2	TTATCTATTC	CTCAACAATG	GTGTGTTGG
1	mms182	tgaatatggc	tgaaggagac	ccagaagccc
3		-----	-----	-----
2	tsip2	TGAATATGCC	TGAAGGAGAC	CCAGAAGCCC
1	mms182	aaaggagggt	acccaagaac	cccaagtata
3		-----	-----	-----
2	tsip2	AAAGGAGGCT	ACCCAAGAAC	CCCAAGTATA
1	mms182	acacacaaa	agcggagaga	gagacacagg
3		-----	-----	-----
2	tsip2	ACACACAAA	AGCGGAGAGA	GAGACACAGG
1	mms182	acagtggctc	tgggaacgat	gatggtggct
3		-----	-----	-----
2	tsip2	ACAGTGGTTC	TGGGAACGAT	GATGGTGGCT
1	mms182	tcagtgagga	gtgggaggcc	caaagagaca
3		-----	-----	-----
2	tsip2	TCAGTCAGGA	GTGGGAGGCC	CAAAGAGACA
1	mms182	gtcacctggg	gcctcctcgc	tcacctcccc
3		-----	-----	-----
2	tsip2	GTCACCTGGG	GCCTCCTCGC	TCCACTCCCC

FIG. 8 (suite)

		1330	1340	1350
1	mms182	agtc	aagagc	tgctgtccag
3		-----	-----	gaactttctg
2	tsip2	AGTCAAGAGC	TGCTGTCCAG	GAAC TTTCTG
		1360	1370	1380
1	mms182	ggagcattct	aacyagtga	gacccggagg
3		-----	-----	-----
2	tsip2	GGAGCATTCT	AACUAGTGAA	GACCCGGAGG
		1390	1400	1410
1	mms182	aaagaggagt	aaaacttgya	ctgggagatt
3		-----	-----	-----
2	tsip2	AAAGAGGAGT	AAAAC TTGGA	CTGGGAGATT
		1420	1430	1440
1	mms182	tcattttcta	cagtgctctg	gttggtaagg
3		-----	-----	-----
2	tsip2	TCATTTTCTA	CAGTGTCTG	GTTGGTAAAG
		1450	1460	1470
1	mms182	cctcagcaac	cgccagtgga	gactggaaca
3		-----	-----	-----
2	tsip2	CCTCAGCAAC	CGCCAGTGA	GACTGGAACA
		1480	1490	1500
1	mms182	caaccatagc	ctgctttgta	gccatactga
3		-----	-----	-----
2	tsip2	CAACCATAGC	CTGCTTTGTA	GCCATACTGA
		1510	1520	1530
1	mms182	tcggcctgtg	ccttacatta	ctcctgctcg
3		-----	-----	-----
2	tsip2	TGGGCTGTG	CCTTACATTA	CTCCTGCTCG
		1540	1550	1560
1	mms182	ccattttcaa	gaaagccttg	ccagccctcc
3		-----	-----	-----
2	tsip2	CCATTTTCAA	GAAAGCCTTG	CCAGCCCTCC
		1570	1580	1590
1	mms182	ccatctccat	caccttcggg	ctcgtgttct
3		-----	-----	-----
2	tsip2	CCATCTCCAT	CACTTTCGGG	CTCOTGTTCT
		1600	1610	1620
1	mms182	acttcgccac	ggattacctt	gtgcagccct
3		-----	-----	-----
2	tsip2	ACTTCGCCAC	GGATTACCTT	GTGCAGCCCT
		1630	1640	1650
1	mms182	tcattggacca	acttgcattc	catcagtttt
3		-----	-----	-----
2	tsip2	TCATGGACCA	ACTTGCATTC	CATCAGTTTT

FIG. 8 (suite)

1	mms182	1650	1670	1680
3		atattctagcc	ttctctgcagt	tagaacatgg
2	tsip2	ATATCTAGCC	TTCCTGCAGT	TAGAACATGG
1	mms182	1690	1700	1710
3		atgcttctctc	tttgattatc	aaaaacacaa
2	tsip2	ATGTTTCTTC	TTTGATTATC	AAAAACACAA
1	mms182	1720	1730	1740
3		aaacagagag	caagccccgag	gaggagactg
2	tsip2	AAACAGAGAG	CAAGCCCCGAG	GAGGAGACTG
1	mms182	1750	1760	1770
3		gtgactttcc	tgtgtcttca	gctaacaaga
2	tsip2	GTGACTTTCC	TGTGTCTTCA	GCTAACAAAG
1	mms182	1780	1790	1800
3		gcaggactcc	agctggactt	ctgcagcttc
2	tsip2	GCAGGACTCC	AGCTGGACTT	CTGCAGCTTC
1	mms182	1810	1820	1830
3		cttccgagtc	tccctagcca	cccgacttac
2	tsip2	CTTCCGAGTC	TCCCTAGCCA	CCCGCACTAC
1	mms182	1840	1850	1860
3		tggactgtgg	aaggaagcgt	ctacagagga
2	tsip2	TGGACTGTGG	AAGGAAGCGT	CTACAGAGGA
1	mms182	1870	1880	1890
3		acggcttcca	acatccatcg	ctgcagcaga
2	tsip2	ACGGTTTCCA	ACATCCATCG	CTGCAGCAGA
1	mms182	1900	1910	1920
3		cyytgctccc	cagtgacttg	agagacaagg
2	tsip2	CGGTGTCCTC	CAGTGACTTG	AGAGACAAGG
1	mms182	1930	1940	1950
3		acaaggaaat	gtgctgggcc	aaggagctgc
2	tsip2	ACAAGGAAAT	GTCCTGGGCC	AAGGAGCTGC
1	mms182	1960	1970	1980
3		cgtgctctgc	tagctttgac	cgtgggcatg
2	tsip2	CGTGCTCTGC	TAGCTTTGAC	CGTGGGCATG

FIG. 8 (suite)

1 3 2	mms182 tsip2	1990 gagatttacc cgcacttctga actctcttaag ----- GAGATTTACC CGCACTTCTGA ACTCTCTAAG	2000	2010
1 3 2	mms182 tsip2	2020 gtaaacaagaag cgagggtgaac c ----- GTAACAAGAAG CGAGGTGAAC CAAACAGACC	2030	2040
1 3 2	mms182 tsip2	2050 <== <== TGCCATYCTT CCAACCCATG TTGGAAATAA	2060	2070
1 3 2	mms182 tsip2	2080 <== <== AACCGTCCCTA GCTGGAACCC TTA CTGTCCC	2090	2100
1 3 2	mms182 tsip2	2110 <== <== AGGAGGTTCC GTGTGGGGGT GGC ACTGGGC	2120	2130
1 3 2	mms182 tsip2	2140 <== <== CGGGCCTCCC TCTCAGGCTC CTTTGCTGCC	2150	2160
1 3 2	mms182 tsip2	2170 <== <== CACTTGTAAG TTTAAATAAG GACACCGCCC	2180	2190
1 3 2	mms182 tsip2	2200 <== <== TACACAAACC TCACCCCTGT CACATCCAGT	2210	2220
1 3 2	mms182 tsip2	2230 <== <== GACTCTGACC ACTTTAGTTC TCAA ACTCTC	2240	2250
1 3 2	mms182 tsip2	2260 <== <== TCACTATTAT CTGTGGTTGC CGTTTCTTCC	2270	2280
1 3 2	mms182 tsip2	2290 <== <== CAAGGCCAGC CTGGACGAAT TTGGGGTTGC	2300	2310

FIG. 8 (suite)

1	mms182	<==	2320	2330	2340
3		<==			
2	tsip2	TCTATCCTGA GAGTTGTAAC CTCAACTTCC			
			2350	2360	2370
1	mms182	<==			
3		<==			
2	tsip2	AAAGTTTATA TTTTCTTGAA ATGATGGATC			
			2380	2390	2400
1	mms182	<==			
3		<==			
2	tsip2	TATTGCTCAA CAGTCCCTGT CATCCTTAAG			
			2410	2420	2430
1	mms182	<==			
3		<==			
2	tsip2	TGACTTCTGG GTTTCCCACA AATTCCTCAC			
			2440	2450	2460
1	mms182	<==			
3		<==			
2	tsip2	TTTTAGACAC ACTCTAAGCT TACTTCTGGC			
			2470	2480	2490
1	mms182	<==			
3		<==			
2	tsip2	CTGGATGCTT CCTCTCCCTG TCTCTCCCTT			
			2500	2510	2520
1	mms182	<==			
3		<==			
2	tsip2	GCCCCACAGC GGTTCCTTGA CAGCAGACAA			
			2530	2540	2550
1	mms182	<==			
3		<==			
2	tsip2	GGCAGCTCTG GGAGGTAGCT AGTATCCAAT			
			2560	2570	2580
1	mms182	<==			
3		<==			
2	tsip2	AACCCAGGGG TTTCTTCATG TGATGCAAAT			
			2590	2600	2610
1	mms182	<==			
3		<==			
2	tsip2	ACTACGTGTC CAACCAATCA GTGCTGTCAA			
			2620	2630	2640
1	mms182	<==			
3		<==			
2	tsip2	CGGGCTGCCA TAGCTCCTTC GATGGCAAAT			

FIG. 8 (suite)

	2550	2600	2670
1 mms182	<==		
3	<==		
2 tsip2	AGGATGTGTG CCCAAAGAAT TAAAGCGATC		
	2680	2690	2700
1 mms182	<==		
3	<==		
2 tsip2	AGTGGCTGGT G		

FIG. 8 (fin)