



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mise au point d'un test permettant de doser l'activation du facteur de transcription MyoD dans des extraits cellulaires

Plennevaux, Christelle

Award date:
2002

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**MISE AU POINT D'UN TEST PERMETTANT DE DOSER L'ACTIVATION DU
FACTEUR DE TRANSCRIPTION MyoD DANS DES EXTRAITS CELLULAIRES**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Christelle Plennevaux

Juin 2002

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES

Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Mise au point d'un test permettant de doser l'activation du facteur de
transcription MyoD dans des extraits cellulaires**

PLENNEVAUX Christelle

Résumé

Ce travail consiste dans un premier temps, à mettre au point une méthode colorimétrique permettant de doser l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription myogéniques. La méthode est basée sur la mise en présence d'extraits nucléaires, provenant de différentes conditions de différenciation de cellules-cibles, avec un trappeur d'ADN double brin contenant la séquence consensus reconnue par les facteurs de transcription myogéniques. Le facteur éventuellement fixé à sa séquence sera reconnu par un anticorps lui étant spécifique, lequel sera détecté par une réaction colorimétrique grâce à un anticorps secondaire couplé à une peroxydase.

Afin de valider ce dosage, nous avons démontré sa spécificité avant de le comparer à la méthode de référence qui est l'EMSA (retard sur gel). Nous avons montré que notre test présente de multiples avantages : il est plus sensible, plus rapide mais surtout il ne fait pas intervenir d'isotopes radioactifs et permet de doser un grand nombre d'échantillons en parallèle étant donné qu'il se fait dans un format 96 puits.

Une fois notre dosage au point, nous l'avons utilisé pour étudier le processus de différenciation des cellules musculaires C₂C₁₂ en culture. Nous avons pu constater qu'il y avait une variation dans l'activité de liaison à l'ADN des facteurs myogéniques au cours de la différenciation.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2002

Promoteur: P. Renard

Ce mémoire couronne quelques années d'études. C'est au terme de celui-ci que je tiens à exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont soutenu dans ce cheminement.

Tout d'abord, je tiens à remercier Madame Raes de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Ensuite, je voudrais dire un grand merci à Monsieur Remacle. Ses conseils, son écoute et ses idées stimulantes ont dynamisé mon travail.

MERCI à toi, Val, pour ton aide, tes conseils, ton dynamisme et surtout pour tous les fous rires... Ce fût très agréable de partager ces 6 semaines de manip en ta compagnie, j'en regretterais presque de ne pas avoir changé de sujet plus tôt. A quand la prochaine extraction de 50 boîtes de cellules contrôles??

Merci à toi, Véronique, pour tes encouragements, ton attention, ta bonne humeur et tes petites histoires bien amusantes durant les moments de décompression.

Merci à toi, Patsy, pour ton aide dans la rédaction qui m'a été très précieuse mais aussi pour ta compréhension, ton écoute, ta sympathie,... Désolée pour les maux de crâne que mes phrases ont occasionnées et encore merci pour tout.

Je voudrais remercier l'équipe des chips de m'avoir accueillie durant ces premiers mois de manip et plus particulièrement toi, Mumu, pour ton aide et ta grande disponibilité. Merci aussi à Vincent et Nath pour leurs spotting sur DeeJy.

Merci à tous les mémorants pour l'ambiance au sein de notre cage et pour tous les bons moments de détente et de gâindailles. Merci aussi à toi Ludo pour les pensées de J-C V.

Merci aux «fratello brothers», à Isa, à J-J ainsi qu'à tous les membres du laboratoire pour la bonne ambiance qu'ils y font régner.

Un grand merci à ma famille et surtout à mes parents pour m'avoir donné la chance de faire ces études et pour m'avoir soutenue tout au long de celles-ci.

Merci à toi, Alain, pour ton aide, ton soutien, tes encouragements et surtout pour ta patience au cours de ces 4 années.

Christelle

Liste des abréviations utilisées

ADN	: Acide désoxyribonucléique
AP-1	: Activated Protein-1
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: ARN messenger
ARNT	: Aryl/hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATP	: Adénosine Triphosphate
b-HLH	: basic-Helix-Loop-Helix
BMP-2	: Bone Morphogenic Protein
BSA	: Bovine Serum Albumin
°C	: Degré Centigrade
CBP	: CREB Binding Protein
cdk	: Cyclin-dependent kinase
cdki	: Cyclin-dependent kinase inhibitor
cpm	: Coups par minute
CREB	: cAMP-Response Element Binding protein
CTL	: Contrôle
dNTP	: Dinucléotide Triphosphate
DTT	: Dithiothréitol
EDTA	: Ethylène Diamine Tétra Acétique
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
EMSA	: Electrophoretic Mobility Shift Assay
FGF	: Fibroblast Growth Factor
GSK3	: Glycogen Synthase Kinase 3
HAT	: Histone Acétyl-Transférase
HDAC	: Histone Déacétylase
HIF-1	: Hypoxia Inducible Factor-1
HLH	: Helix-Loop-Helix
HRP	: Horse Radish Peroxydase
HTH	: Helix-Turn-Helix
HB	: Hypotonic Buffer
Id	: Inhibitor of DNA binding/differentiation
IκB	: Inhibitor kappa B
Kb	: Kilo base
MAPK	: Mitogen-Activated Protein Kinase
MCK	: Muscle Creatine Kinase
MEF-2	: Myocyte Enhancer Factor-2
MHC	: Myosin Heavy Chain
MRFs	: Myogenic Regulatory Factors
MyoD	: Myoblast Determining gene
MyoR	: Myogenic Repressor
NFκB	: Nuclear Factor kappa B
NLS	: Nuclear Localisation Sequence
nm	: 10 ⁻⁹ mètre
Oligo	: Oligonucléotide

pb	: Paires de bases
PBS	: Phosphate Buffer Saline
PCAF	: p300/CREB-binding protein-Associated Factor
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PI₃K	: Phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	: cAMP-dependent Protein Kinase
PKC	: Protein Kinase C
pmole	: 10 ⁻¹² mole
PNK	: Polynucléotide Kinase
PNPP	: p-Nitrophenyl Phosphate
PPAR\square	: Peroxisome Proliferator Activated Receptor \square
PVDF	: Polyvinylidene Fluoride
rpm	: Rotations par minute
SDS	: Sodium Dodécyl Sulfate
Shh	: Sonic hedgehog
TAF	: TBP Associated Factors
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	: Tris Borate EDTA
TBP	: TATA Binding Protein
Temed	: N, N, N', N'-tétraméthyl-éthylènediamine
TFII	: Transcription Factor II
Th	: Température d'hybridation
Tm	: Température de melting
TRIS	: Tris Hydroxy Méthyl Aminométhane
Tween	: Polyoxyéthylène sorbitan monolaurate
U	: Unité enzymatique
μg	: 10 ⁻⁶ gramme
μl	: 10 ⁻⁶ litre
UV	: Ultra-Violets

Table des matières

Première partie : Introduction

1. AVANT PROPOS	1
2. LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION	3
2.1. RAPPEL SUR LA TRANSCRIPTION	3
2.1.1. <i>Les promoteurs</i>	3
2.1.2. <i>Les enhanceurs ou les silencers</i>	4
2.2. LES DOMAINES COMPOSANT LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION.....	5
2.2.1. <i>Le domaine de liaison à l'ADN</i>	5
2.2.2. <i>Le domaine transactivateur</i>	6
2.2.3. <i>Le domaine régulateur</i>	7
a) La phosphorylation.....	7
b) La dimérisation	8
c) La translocation.....	9
d) La liaison d'un ligand.....	9
e) L'acétylation	10
2.3. MÉTHODES D'ÉTUDE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION	10
2.3.1. <i>Étude de leur liaison à l'ADN</i>	10
2.3.2. <i>Étude de leur activité transactivatrice</i>	12
2.3.3. <i>Étude de leur interaction avec d'autres protéines</i>	12
a) La coimmunoprécipitation.....	12
b) Le double-hybride	13
3. LES FACTEURS MYOGÉNIQUES.....	15
3.1. LA MYOGENÈSE.....	15
3.2. MODÈLE CELLULAIRE POUR ÉTUDIER LA MYOGENÈSE	16
3.3. LES MRFs (MYOGENIC REGULATORY FACTORS)	17
3.3.1. <i>Une famille de facteurs de transcription</i> :	17
3.3.2. <i>Les MRFs interagissent avec les protéines E et MEF2</i> :	17
3.3.3. <i>Activation séquentielle des MRFs au cours de la différenciation</i> :	19
3.4. RÉGULATION DE L'ACTIVITÉ TRANSCRIPTIONNELLE DES MRFs :	20
3.4.1. <i>Régulation par des protéines inhibitrices</i>	20
a) Interactions avec les protéines Id	20
b) Interactions avec la protéine MyoR	21
c) Interactions avec la protéine Twist	21
d) Interactions avec la protéine OUT	22
3.4.2. <i>Régulation par phosphorylation / déphosphorylation</i> :	22
3.4.3. <i>Régulation par acétylation</i> :	23
3.5. MYOD ET LE CYCLE CELLULAIRE :	24
a) MyoD induit l'expression de p21.....	25
b) MyoD inhibe la phosphorylation de pRb	25

Deuxième partie : Objectifs du mémoire

Objectifs du mémoire.....	27
----------------------------------	-----------

Troisième partie : Matériel et méthodes

1. CULTURE CELLULAIRE.....	29
1.1. CULTURE CELLULAIRE.....	29
1.2. EXTRACTION DES PROTÉINES NUCLÉAIRES.....	30
2. RÉACTION DE POLYMÉRISATION EN CHAÎNE (PCR).....	33
2.1. PRINCIPE.....	33
2.2. MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	34
3. ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL D'AGAROSE.....	35
3.1. PRINCIPE.....	35
3.2. MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	36
4. CONCENTRATION DU TRAPPEUR	38
4.1. PRINCIPE.....	38
4.2. MATERIEL ET MÉTHODE.....	38
5. DOSAGE DE L'ACTIVITÉ DE LIAISON À L'ADN DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION EN PLAQUE MULTIPUITS.....	39
5.1. COATING D'UNE PLAQUE 96 PUIITS AVEC LE TRAPPEUR BIOTINYLÉ.....	39
5.2. DÉTECTION DE L'ACTIVITÉ DE LIAISON À L'ADN DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION EN PLAQUE 96 PUIITS	41
6. EMSA.....	43
6.1. PRINCIPE.....	43
6.2. HYBRIDATION DES OLIGONUCLÉOTIDES MYOD	44
6.3. MARQUAGE DE LA SONDE	45
6.4. LIAISON SONDE-PROTÉINE	47
6.5. GEL D'ÉLECTROPHORÈSE	48
6.6. RÉVÉLATION.....	49
7. WESTERN BLOTTING.....	50
7.1. PRINCIPE.....	50
7.2. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS	51
7.3. PRÉPARATION DU GEL ET MIGRATION	51
7.4. TRANSFERT SUR MEMBRANE DE PVDF	52
7.5. MISE EN PRÉSENCE DE LA MEMBRANE AVEC LES ANTICORPS ET RÉVÉLATION.....	53

Quatrième partie : Résultats et discussion

1. MISE AU POINT DU DOSAGE MULTIPUITS	55
1.1. PREMIÈRE ÉTAPE : LE TRAPPEUR	55
1.1.1. <i>Choix du trappeur</i>	55
1.1.2. <i>Amplification du trappeur</i>	56
1.1.3. <i>Fixation du trappeur sur les puits</i>	57
1.2. DEUXIÈME ÉTAPE : MISE AU POINT DU DOSAGE EN TANT QUE TEL.....	58
2. VALIDATION DU DOSAGE	61
2.1. SPÉCIFICITÉ DU DOSAGE.....	61
2.2. COMPARAISON DE LA SENSIBILITÉ.....	62
2.2.1. <i>Sensibilité de l'EMSA</i>	62
2.2.2. <i>Sensibilité du test colorimétrique</i>	64
3. UTILISATION DU DOSAGE POUR ÉTUDIER UN PROCESSUS DE DIFFÉRENCIATION.....	65
3.1. MODÈLE CELLULAIRE	65
3.2. ÉTUDE DES FACTEURS MYOGÉNIQUES AU COURS DE LA DIFFÉRENCIATION MUSCULAIRE EN CULTURE.....	66
3.2.1. <i>Abondance des facteurs myogéniques au cours de la différenciation</i>	66
3.2.2. <i>Liaison des facteurs myogéniques à leur séquence consensus au cours de la différenciation</i>	67
3.3. DÉTECTION DE PROTÉINES PARTENAIRES INTERAGISSANT AVEC LES FACTEURS MYOGÉNIQUES	69

Cinquième partie : Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives.....	72
----------------------------------	----

Sixième partie : Bibliographie

1. Avant propos

Les facteurs de transcription sont des protéines qui se lient à des séquences consensus sur l'ADN, et influencent le niveau d'expression des gènes contrôlés par ces séquences. Ces facteurs de transcription jouent un rôle capital dans le fonctionnement cellulaire puisqu'ils permettent à la cellule de contrôler l'expression de son génome en réponse à des modifications de l'environnement cellulaire. Dès lors, les facteurs de transcription constituent un centre d'intérêt dans tous les processus cellulaires, qu'il s'agisse de prolifération, de différenciation, de réponse à des cytokines ou à des hormones, ...

Le rôle capital que jouent les facteurs de transcription dans l'ensemble des processus cellulaires explique que ces dernières années aient vu une véritable explosion dans les recherches liées aux facteurs de transcription. Il suffit de regarder l'évolution du nombre de papiers publiés sur ceux-ci entre 1990 et 2002 pour se rendre compte de leur implication dans tous les processus cellulaires et surtout de leur diversité. En effet à l'heure actuelle on dénombre plus de 2000 facteurs de transcription encodés dans le génome humain. (Brivanlou *et al.*, 2002)

De plus, les mécanismes de régulation des facteurs de transcription sont également de mieux en mieux connus (voir point 2.2.3). On se rend compte que grâce à de multiples niveaux de régulations, la cellule parvient à réaliser un *fine tuning* de l'expression de ses gènes de manière à répondre le plus adéquatement possible à une modification environnementale. Vu leurs nombreuses implications dans les processus cellulaires, il n'est donc pas étonnant que les facteurs de transcription deviennent des cibles pharmacologiques pour diverses pathologies (ex : rôle de NF κ B dans les maladies inflammatoires (Tak *et al.*, 2001)).

Cette explosion des connaissances concernant les facteurs de transcription va de pair avec une évolution des techniques disponibles pour les étudier. A l'heure actuelle la technique de retard sur gel, que nous détaillerons plus loin, constitue la méthode de référence pour doser l'activité de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription particulier. Dans ce travail, nous développons une nouvelle technique colorimétrique permettant de doser beaucoup plus facilement l'activité de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription.

Nous avons optimisé ce dosage colorimétrique dans le cas particulier du facteur de transcription MyoD, un élément clé de la différenciation des cellules musculaires. Nous avons ensuite confronté les deux méthodes de dosage, à savoir le retard sur gel et le dosage colorimétrique, et avons utilisé notre dosage pour étudier l'activation de plusieurs facteurs de transcription myogéniques au cours du processus de différenciation des cellules musculaires en culture.

Avant de présenter nos résultats, nous allons d'abord introduire les facteurs de transcription en général, puis MyoD et son rôle dans le processus de différenciation musculaire.

2. Les facteurs de transcription

2.1. Rappel sur la transcription

Chez les eucaryotes, on distingue trois ARN polymérases différentes, celle que nous allons analyser plus particulièrement est l'ARN polymérase II, qui permet la synthèse des ARN messagers (ARNm). Afin d'arriver à un taux de transcription optimal, l'ARN polymérase II requiert la présence de plusieurs types de séquences régulatrices agissant *in cis* : les promoteurs ainsi que des séquences supplémentaires appelées *enhancers* (amplificateurs) ou *silencers*. Tous ces éléments sont reconnus par des facteurs exerçant un contrôle *in trans*. Des promoteurs adéquats sont nécessaires pour l'initiation de la transcription tandis que la fonction des amplificateurs ou des silencers est de réguler positivement ou négativement le taux de transcription à partir de ces promoteurs (Alberts *et al.*, 1998).

2.1.1. Les promoteurs

Contrairement à leurs homologues procaryotes, les promoteurs eucaryotes ne contiennent pas suffisamment de signaux de reconnaissance pour permettre à l'ARN polymérase seule d'initier la transcription *in vivo*. La boîte TATA ainsi que d'autres séquences en amont (comme la boîte CCAAT) doivent être reconnues par des protéines régulatrices qui s'y lient et activent la transcription (Roeder, 1991). C'est ainsi que des facteurs agissant *in trans* (TAF : TATA binding protein Associated Factors) sont requis pour permettre à l'ARN polymérase II d'initier la transcription.

Les facteurs de transcription pour l'ARN polymérase II (TFII) sont représentés par différentes lettres (A, B, D, E, F, J, H). Le facteur clé du complexe est probablement le facteur TFIID composé d'une protéine de liaison à la séquence TATA (TBP : TATA binding protein) et d'au moins dix sous-unités supplémentaires (TAF) (Struhl *et al.*, 1998). C'est à partir de celui-ci que va se former le complexe d'initiation de la transcription, via un assemblage séquentiel avec les autres facteurs, sur la boîte TATA (Fig 1.1). Une fois formé, ce complexe va recruter la polymérase qui commencera à transcrire au site d'initiation de la

transcription (c'est-à-dire 25 à 30 pb en aval de la boîte TATA dans les systèmes de mammifères et 40 à 120 pb chez la levure) (Hampsey, 1998).

Ces facteurs de transcription sont appelés facteurs de transcription de base ou généraux car ils représentent l'exigence minimale à satisfaire pour permettre l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II à un promoteur particulier (Goodrich *et al.*, 1994).

2.1.2. Les enhancers ou les silencers

Outre le promoteur proximal évoqué dans le paragraphe précédent, il existe d'autres séquences régulatrices constituant les séquences distales du promoteur. Celles-ci peuvent fortement accroître ou diminuer le taux de transcription à partir d'un promoteur localisé sur la même molécule d'ADN. Parmi ces séquences *cis*-régulatrices, on distingue les « *enhancers* » ou activateurs ainsi que les « *silencers* » ou séquences extinctrices.

De même que les promoteurs, ces séquences peuvent être reconnues par des facteurs opérant en *trans*. Mais elles se distinguent toutefois des promoteurs car elles peuvent agir à plus longue distance que ceux-ci : parfois jusqu'à 50 Kb. De plus, elles peuvent fonctionner dans les deux orientations, en agissant soit en amont soit en aval du promoteur qu'elles influencent (Griffiths, 1997).

Dans ce cas, ce ne sont plus les facteurs de transcription généraux qui sont concernés mais des facteurs de transcription spécifiques. Ceux-ci peuvent moduler le taux de transcription en interagissant soit directement avec les composants de la machinerie transcriptionnelle (c'est le cas notamment pour l'oncoprotéine c-Jun dont il a été montré une interaction avec la grande sous-unité TAF, TAF_{II}250, du complexe d'initiation (Lively *et al.*, 2001)), soit via des cofacteurs (Fig 1.2).

Dans la suite de ce travail, nous allons nous intéresser uniquement à ces facteurs de transcription spécifiques étant donné que ce sont eux qui régulent l'expression du génome en tant que réponse adaptative.

2.2. Les domaines composant le facteur de transcription

En règle générale, un facteur de transcription est constitué essentiellement de trois types de domaines : un domaine de liaison à l'ADN, un domaine transactivateur ainsi qu'un domaine régulateur.

2.2.1. Le domaine de liaison à l'ADN

La majorité des facteurs de transcription possèdent un domaine qui va leur permettre de se lier sur une séquence d'ADN qui leur est propre. Cette séquence consensus est spécifique à chaque facteur de transcription ou spécifique à une famille de facteurs de transcription. C'est ainsi que le facteur AP-1 (Karin *et al.*, 1997) reconnaît une séquence totalement différente de celle reconnue par NF κ B (Mercie *et al.*, 1998). Par contre, tous les facteurs myogéniques de la famille MyoD, dont nous parlerons plus loin, reconnaissent la même séquence consensus d'ADN.

Les facteurs de transcription peuvent être groupés en plusieurs classes, définies par la structure tridimensionnelle de leur domaine de liaison à l'ADN (pour une revue voir (Angrand, 1993)). Ces différentes classes utilisent fréquemment une hélice α comme motif de reconnaissance de l'ADN. Cette hélice s'ajuste dans le grand sillon de l'ADN et, par l'intermédiaire de ponts salins et de liaisons hydrogènes, interagit spécifiquement avec les paires de bases.

Un premier motif structural fréquent est celui de type hélice-coude-hélice (*helix-turn-helix*) parce que constitué de deux hélices α séparées par trois acides aminés formant un coude. Les gènes codant pour ces protéines appelées homéotiques comportent une séquence commune : la boîte homéotique, qui code pour l'hélice de reconnaissance à l'ADN. Comme le montre la figure 1.3 (A), ce domaine comporte trois hélices : l'hélice 3 étant l'hélice de reconnaissance qui va établir des contacts avec l'ADN tandis que les deux autres hélices sont en contact avec d'autres protéines régulatrices. Un exemple de protéine ayant cette structure en homéodomaine est donné par la protéine Engrailed, un facteur de transcription exprimé durant l'embryogenèse de *Drosophila* (Lodish *et al.*, 1997).

Une seconde famille de facteurs de transcription fréquemment rencontrée regroupe les protéines possédant des agrafes à leucines. Celles-ci forment des dimères grâce à des interactions hydrophobes entre des leucines présentes tous les sept résidus (Fig 1.3 (B)) et la formation de ce dimère est indispensable à la liaison à l'ADN. Les agrafes à leucine sont flanquées d'un domaine de liaison à l'ADN contenant de nombreux résidus lysine et arginine d'où leur appellation « *basic leucine zipper* ». De nombreux proto-oncogènes, comme c-Jun et c-Fos, codent pour des protéines à agrafes à leucine.

Les protéines à hélice-boucle-hélice basiques (b-HLH ; Fig 1.3 (C)) forment aussi des dimères mais dans ce cas, l'interface entre les deux protéines fait intervenir deux hélices \square liées par une boucle et non des agrafes à leucine. Les facteurs de transcription myogéniques (famille MyoD), que l'on abordera dans la section suivante, possèdent ce domaine de liaison de type b-HLH.

Un dernier motif communément rencontré est lié à la présence, dans les domaines de liaison à l'ADN, de régions riches en cystéines et en histidines capables de complexer le zinc. Les saillies apparaissant dans la structure de ces protéines ressemblent à des doigts d'où leur nom de « doigts à zinc ». Les structures tridimensionnelles de ces motifs sont très variables (Fig 1.4), mais tous possèdent une même fonction : ils permettent l'exposition d'une hélice \square (dite de reconnaissance) dans le grand sillon de l'ADN. Il existe trois classes de protéines en doigt à zinc suivant le nombre de cystéines qu'elles contiennent (C_2H_2 , C_4 et C_6). La protéine GAL 4, activateur transcriptionnel chez la levure, constitue un exemple bien caractérisé de la famille C_6 .

2.2.2. Le domaine transactivateur

En plus de son domaine de liaison à l'ADN, le facteur de transcription contient également un domaine transactivateur qui est nécessaire pour activer ou réprimer la transcription.

Ces domaines transactivateurs paraissent fonctionner soit par interaction directe avec les composants de la machinerie transcriptionnelle, soit par le biais de cofacteurs (coactivateurs ou corépresseurs) qui interagiront avec le complexe transcriptionnel. Le

résultat final aboutit ainsi à une stimulation ou à une répression de l'expression d'un ou d'une série de gènes particuliers.

Parmi les cofacteurs transcriptionnels, CBP (CREB Binding Protein) et p300 sont considérés comme étant des coactivateurs généraux de la transcription ; en effet, ils se lient à une liste sans cesse croissante de facteurs de transcription (CREB, AP-1, STAT, MyoD, ...) (Puri *et al.*, 1997b). CBP et p300 sont deux protéines homologues faisant partie *in vivo* d'un complexe multi-moléculaire et jouant des rôles similaires dans la régulation de l'expression génique. Ces deux protéines possèdent une activité Histone Acétyl-Transférase (HAT) qui intervient dans la régulation de la transcription en changeant l'état d'acétylation d'histones mais aussi d'autres protéines, non-histones, telles que les facteurs de transcription (Chan *et al.*, 2001).

Remarquons que les domaines de liaison à l'ADN et transactivateur peuvent être portés par des protéines partenaires (principe du double-hybride) comme c'est le cas pour les caténines dans la voie de transduction passant par le récepteur aux protéines Wnt. Dans ce cas, la β -caténine ne possède que le domaine de transactivation et se lie à l'ADN via son interaction avec des protéines (TCF/LEF) auxquelles il manque le domaine transactivateur. (Brivanlou *et al.*, 2002)

2.2.3. Le domaine régulateur

Différents processus permettent de réguler l'activité des facteurs de transcription, nous en détaillerons quelques-uns ci-dessous :

a) La phosphorylation

Parmi les modifications post-traductionnelles, la phosphorylation / déphosphorylation est probablement la mieux connue pour modifier l'activité des protéines en réponse à des changements environnementaux (Fig 1.5). (Jackson, 1992)

La phosphorylation peut réguler aussi bien l'activité de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription que son activité transactivatrice. C'est le cas par exemple pour c-jun (Fig

1.6), un membre de la famille AP-1 (Activated protein-1) qui, sous forme inactive, possède trois résidus (Thr 231, Ser 243 et Ser 249) phosphorylés constitutivement par la GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3) dans son domaine de liaison à l'ADN. Ce facteur de transcription est incapable de se lier à l'ADN sous cette forme.

Une activation cellulaire, par l'intermédiaire de la voie des PKC (Protein Kinase C) notamment, conduit à la déphosphorylation de ces résidus par une phosphatase permettant au facteur de transcription de se lier à sa séquence consensus sur l'ADN. Pour que c-Jun exerce une activité transactivatrice, il faut encore que deux résidus (Ser 63 et Ser 73) de son domaine transactivateur soient phosphorylés par la voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (Karin *et al.*, 1997).

Le facteur de transcription CREB (cAMP-Response-Element-Binding protein) représente un autre exemple d'activation par phosphorylation. Dans plusieurs modèles cellulaires, CREB est lié constitutivement à l'ADN. Suite à une activation cellulaire, il peut être phosphorylé sur la sérine 133, notamment par la PKA (Protein Kinase A) ou par des Ca^{2+} -calmodulin-dependent protein kinases constituant de ce fait un point de convergence pour plusieurs voies de transduction (Mayr *et al.*, 2001). Ce n'est que lorsque sa sérine 133 est phosphorylée que CREB peut interagir avec CBP et de ce fait augmenter le taux de transcription du gène contrôlé (Fig 1.7) (De Cesare *et al.*, 1999).

b) La dimérisation

Certains facteurs de transcription doivent dimériser avec un partenaire pour pouvoir jouer leur rôle d'activateur transcriptionnel. C'est ainsi que le facteur HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1) n'est actif que lorsqu'il hétérodimérise avec ARNT (Aryl/hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator). Ces deux protéines appartiennent à la famille des facteurs *trans* bHLH (voir figure 1.3 (C)). Le domaine basique intervient dans la liaison à l'ADN tandis que le domaine HLH permet l'hétérodimérisation des deux sous-unités et la juxtaposition des domaines basiques dans le grand sillon de l'ADN (Fig 1.8) (Semenza, 2000).

c) La translocation

L'exemple le plus connu de régulation transcriptionnelle via translocation nucléaire est certainement le facteur de transcription NF κ B (Nuclear factor kappa B). En dehors de toute stimulation, celui-ci est maintenu dans le cytoplasme par I κ B (Inhibitor kappa B) qui masque sa séquence NLS (Nuclear Localisation Sequence) (Fig 1.9). Toutefois, lorsque les cellules sont activées, notamment via des cytokines, I κ B est phosphorylé avant d'être protéolysé, ce qui aboutit à la translocation nucléaire de NF κ B. Une fois dans le noyau il pourra se lier à sa séquence cible sur l'ADN et activer la transcription des gènes en aval (Ghosh *et al.*, 2002).

d) La liaison d'un ligand

Une grande famille de facteurs de transcription, les récepteurs nucléaires, sont régulés via leur association avec des ligands (hormones). En plus de leur domaine de liaison à l'ADN et de leur domaine transactivateur, ces facteurs de transcription possèdent un domaine de liaison au ligand.

En absence de ligand, les récepteurs sont associés à des protéines chaperones et sont transcriptionnellement inactifs. Comme indiqué sur la figure 1.10, le récepteur aux hormones stéroïdiennes peut être activé par deux mécanismes distincts : un mécanisme ligand-dépendant et un autre ligand-indépendant. Dans le premier, l'hormone se lie au récepteur après avoir traversé la membrane plasmique, tandis que le second mécanisme fait intervenir une autre voie de régulation dans laquelle le récepteur se fait phosphoryler suite à une cascade d'activation. L'activation conduit à une modification conformationnelle du récepteur nucléaire de telle sorte qu'il soit libéré de la protéine chaperone. Suite à cette modification, le récepteur nucléaire va dimériser et se fixer sur sa séquence cible afin d'induire la transcription des gènes cibles (DeMayo *et al.*, 2002).

Tous les récepteurs nucléaires (excepté le récepteur aux glucocorticoïdes) sont localisés dans le noyau en absence de leur hormone respective. Le récepteur aux glucocorticoïdes est quant-à-lui dans le cytoplasme jusqu'à ce que les glucocorticoïdes s'y fixent et le libèrent afin qu'il puisse entrer dans le noyau (Brivanlou *et al.*, 2002).

e) L'acétylation

Comme indiqué précédemment (voir point 2.2.2) les coactivateurs transcriptionnels possèdent une activité histone acétyl transférase mais sont aussi capables d'acétyler des facteurs de transcription (comme c'est le cas pour MyoD dont nous parlerons ultérieurement).

L'activation de la transcription par l'acétylation se déroule via deux mécanismes différents : l'acétylation sur des histones facilite le désenroulement de l'ADN à ces endroits et permet ainsi une meilleure accessibilité de l'ADN vis-à-vis des facteurs de transcription et de la polymérase. D'autre part, l'acétylation des facteurs de transcription favorise leur interaction avec les cofacteur vont jouer le rôle d'adaptateur transcriptionnel en formant un pont entre le facteur et la machinerie transcriptionnelle (Fig 1.11) (Chan *et al.*, 2001). Ce phénomène est également illustré à la figure 1.7 dans le cas du facteur de transcription CREB.

2.3. Méthodes d'étude des facteurs de transcription

Il existe différentes méthodes pour étudier les facteurs de transcription suivant que l'on veuille étudier leur capacité de liaison à l'ADN, leur activité transactivatrice ou leur interaction avec d'autres protéines.

2.3.1. Étude de leur liaison à l'ADN

La technique de retard sur gel (EMSA : electrophoretic mobility shift assay) est certainement la méthode de référence pour étudier l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription (Fig 1.12). (Latchman, 1991)

Dans cette méthode, le facteur de transcription étudié, présent sous forme purifié ou dans des extraits cellulaires est incubé avec une sonde oligonucléotidique double brins radioactive, contenant la séquence consensus qu'il reconnaît spécifiquement.

Si le facteur de transcription étudié est capable de se fixer à la séquence consensus, la migration de ce complexe après électrophorèse sur gel de polyacrylamide non dénaturant, suivie de l'autoradiographie, sera retardée par rapport à la migration de la sonde libre. Deux

bandes de migration seront donc visibles : la première, dans le haut du gel, correspond au complexe formé par liaison du facteur à la sonde tandis que la bande qui a migré plus loin représente la sonde libre en excès. L'utilisation d'anticorps dirigés spécifiquement contre le facteur de transcription ou une autre protéine présente dans le complexe permet leur identification par la technique du *supershift*.

Bien qu'étant un outil puissant et d'une remarquable sensibilité, cette méthode présente néanmoins certains inconvénients. D'un point de vue pratique, c'est une technique assez lourde à mettre en œuvre, elle est relativement longue et ne permet le traitement simultané que d'un nombre restreint d'échantillons. De plus les marqueurs radioactifs utilisés rendent cette technique onéreuse et obligent l'expérimentateur à prendre de nombreuses précautions durant les manipulations (Mercie *et al.*, 1998).

C'est pour toutes ces raisons qu'un système novateur de détection de l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription, en plaque multipuits (Fig 1.13), a été développé au sein de l'URBC (Renard *et al.*, 2001). Cette méthode a été développée afin d'estimer, dans un extrait cellulaire, l'activité de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription précis. Le test est basé sur le principe de l'ELISA, excepté que la protéine d'intérêt est capturée non pas par un anticorps mais par une sonde oligonucléotidique contenant la séquence consensus de cette protéine.

Cela implique que seuls les facteurs de transcription capables de se lier à l'ADN, éventuellement suite à une activation cellulaire, seront capturés par les sondes fixées dans les puits. La liaison de la protéine à sa séquence consensus est alors détectée par un anticorps qui lui est spécifique suivi d'un anticorps secondaire conjugué à une peroxydase. Les résultats sont finalement quantifiés par une réaction chromogénique.

Ce système de détection colorimétrique est simple à mettre en œuvre, plus rapide et généralement plus sensible que l'EMSA et permet de traiter simultanément un grand nombre d'échantillons étant donné que ce test se fait sur un format 96 puits.

2.3.2. Étude de leur activité transactivatrice

On peut aussi étudier l'activité transactivatrice d'un facteur de transcription via l'utilisation de gènes rapporteurs (gène de la luciférase ou de la β -galactosidase par exemple) placés sous le contrôle d'un promoteur contenant la séquence consensus du facteur de transcription choisi. Ce promoteur peut être artificiel ou naturel mais dans ce second cas, il peut y avoir interférence avec d'autres facteurs de transcription, de telle sorte que ceux-ci influenceraient le niveau d'expression du gène rapporteur. Cette méthode est néanmoins très utilisée vu sa simplicité et sa facilité à être réalisée sur un grand nombre d'échantillons en même temps. Toutefois, une contrainte majeure qu'il puisse y avoir est que cette technique est tributaire du taux de transfection, celui-ci étant différent d'un type cellulaire à un autre.

Comme autre alternative pour étudier l'activité transactivatrice d'un facteur de transcription, il est possible de doser l'expression d'un de ses gènes cibles au niveau de son ARNm (Northern blot, RT-PCR) ou de sa protéine (Western blot, ELISA, dosage enzymatique). Toutefois, ces méthodes sont très indirectes.

2.3.3. Étude de leur interaction avec d'autres protéines

Les interactions protéiques entre deux ou plusieurs partenaires peuvent être étudiées par diverses méthodes, nous en analyserons certaines ci-dessous. Il est important de noter que toutes ces méthodes ne sont pas applicables pour l'étude des facteurs de transcription.

a) La coimmunoprécipitation

Dans cette technique, l'interaction entre deux protéines est étudiée via l'immunoprécipitation. A partir d'un lysat cellulaire, on va précipiter la protéine d'intérêt (l'antigène), c'est-à-dire celle dont on veut étudier les interactions protéiques, via des anticorps spécifiques. Dans sa précipitation celle-ci va entraîner d'autres protéines, avec lesquelles elle établit des interactions, et il sera possible de détecter ces partenaires en réalisant un criblage avec une gamme d'anticorps.

Cette méthode possède plusieurs avantages. Premièrement, de multiples interactions peuvent être détectées étant donné que chacune des protéines présentes dans le lysat cellulaire

est susceptible d'interagir avec notre protéine d'intérêt. Deuxièmement, les complexes multiprotéiques, qui sont difficile à réaliser *in vitro*, sont dans leur état natif et peuvent être coprécipités facilement. Troisièmement, les protéines sont présentes dans leur état naturel et ont donc subi toutes les modifications post-traductionnelles qui peuvent influencer leur interaction avec d'autres partenaires.

L'immunoprécipitation a aussi deux inconvénients majeurs. D'une part, les protéines coimmunoprécipitées n'interagissent pas nécessairement de manière directe, il se peut qu'elles fassent partie d'un complexe protéique et qu'elles se situent de part et d'autre de celui-ci sans interagir physiquement l'une avec l'autre. D'autre part, la coimmunoprécipitation est tributaire des anticorps dirigés contre les protéines impliquées dans l'interaction et ces anticorps ne sont pas toujours disponibles (Phizicky *et al.*, 1995).

b) Le double-hybride

Ce système développé dans la levure permet de détecter, *in vivo*, l'interaction entre deux protéines. Initialement ce système a été décrit pour le facteur de transcription GAL4 chez *Saccharomyces cerevisiae* (Fields *et al.*, 1989).

Cette méthode est basée sur les propriétés de la protéine GAL4 qui possède, comme la majorité des facteurs de transcription, un domaine transactivateur ainsi qu'un domaine de liaison à l'ADN. Cela va permettre de préparer des plasmides contenant deux protéines hybrides. Le premier encode une protéine X fusionnée au domaine de liaison à l'ADN de GAL4 et le second code pour une protéine Y fusionnée au domaine transactivateur de GAL4. Ces deux plasmides sont introduits dans la levure et seule l'interaction entre les deux protéines X et Y permettra la reconstitution du facteur de transcription GAL4 et la transcription d'un gène rapporteur placé en aval du site de liaison de la protéine GAL4 (Fig 1.14).

En utilisant une banque de plasmides codant pour des protéines de fusion différentes, il est ainsi possible de détecter un grand nombre de protéines interagissant avec la protéine d'intérêt. Ce système, développé dans la levure, peut être adapté aux autres systèmes eucaryotes (Dang *et al.*, 1991).

Cette technique est intéressante étant donné qu'elle est très sensible et qu'elle permet d'identifier le domaine minimal d'interaction de deux protéines en effectuant des délétions de l'ADN codant pour une des protéines incriminées.

Toutefois, les interactions qui dépendent de modifications post-traductionnelles absentes dans les cellules de levure ne peuvent être détectées, ce qui constitue un inconvénient majeur (Phizicky *et al.*, 1995). De plus si l'une des protéines partenaires est un facteur de transcription, le résultat sera faussé étant donné que ce facteur possède son propre domaine de liaison à l'ADN et de transactivation. Dans notre cas, le double-hybride est donc déconseillé.

Après cette introduction générale sur les facteurs de transcription, nous allons nous concentrer sur la famille des facteurs de transcription myogéniques.

3. Les facteurs myogéniques

3.1. La myogenèse

La différenciation cellulaire s'établit à partir de cellules précurseurs pluripotentes qui, suite aux signaux qu'elles reçoivent, vont se différencier en un type cellulaire particulier. Ces cellules précurseurs sont appelées cellules souches.

Le terme de « cellule souche » est utilisé pour désigner une cellule qui, lorsqu'elle est placée dans un environnement tissulaire approprié, est capable de se multiplier (capacité de d'autorenouvellement) et de produire des cellules qui deviendront spécialisées (capacité de différenciation), qui acquièrent une morphologie et une fonction spécifique du tissu (Slack, 2001). Une cellule souche n'exprime, quant à elle, aucune spécialisation, on la dit « indifférenciée ».

La myogenèse squelettique implique une série d'événements hautement orchestrés au cours desquels les cellules souches embryonnaires sont engagées vers la lignée cellulaire myogénique, donnant naissance à des cellules musculaires précurseurs appelées myoblastes. Ceux-ci quittent le cycle cellulaire et se différencient en myocytes, qui fusionnent ensuite pour donner naissance à des myotubes. Ces derniers expriment les marqueurs de la différenciation terminale comme MHC (Myosin Heavy Chain) (Fig 1.15).

Chez les vertébrés, l'ensemble des tissus musculaires (sauf ceux de la tête) dérivent des somites ; ceux-ci étant des structures mésodermiques situées de part et d'autre du tube neural. Au cours du développement, les somites vont se différencier en trois tissus distincts ; le dermamyotome, le myotome (dérivant du dermamyotome) et le sclérotome (Fig 1.16) (Bailey *et al.*, 2001).

C'est suite à la différenciation du myotome qu'a lieu la mise en place du tissu musculaire squelettique. Les cellules du myotome vont proliférer en myoblastes, certaines cellules vont se différencier et d'autres restent plus petites et moins différenciées (ce sont les futures cellules satellites). Les myoblastes, durant leur différenciation, se disposent bout à bout et leurs membranes cellulaires fusionnent aux points de contact. De cette façon se

développent des tubules musculaires syncytiaux appelés myotubes. Simultanément, d'autres myoblastes viennent s'attacher et accroître ainsi la longueur des myotubes. Les autres myoblastes restés indifférenciés migrent autour des myotubes et deviennent les cellules satellites. Celles-ci constituent une réserve en cellules souches susceptibles de se diviser et de régénérer les fibres musculaires en cas de besoin (traumatisme, croissance, ...) (Yoshida *et al.*, 1998).

La différenciation morphologique et biochimique des cellules musculaires requiert une série d'événements coordonnés comprenant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₀, l'expression temporelle de gènes spécifiques du muscle et la fusion des myoblastes en myotubes multinucléés.

3.2. Modèle cellulaire pour étudier la myogenèse

Les cellules C₂C₁₂, lignée myoblastique murine (ATCC #CRL-1772) constituent un modèle fréquemment utilisé pour étudier la différenciation myogénique (Puri *et al.*, 1997a).

Ces cellules ont une apparence fibroblastique tant qu'elles sont maintenues dans un état hautement prolifératif, c'est-à-dire en deçà de la confluence et en présence de 20 % de sérum de veau fœtal. Lorsque l'on désire induire la différenciation de ces myoblastes mononucléés en myotubes multinucléés, on laisse les cellules atteindre la confluence et on les cultive en présence d'un faible pourcentage de sérum de manière à rendre les cellules quiescentes. Après 3 à 4 jours de ce traitement, la culture présente de nombreux myotubes exprimant des protéines contractiles. Une partie des cellules ne présentent pas ces caractères de différenciation : elles sont considérées comme des cellules « de réserve » comparables aux cellules satellites dans les muscles (Yoshida *et al.*, 1998).

Remarquons que cette lignée cellulaire peut aussi être utilisée comme modèle adipocytaire (Hu *et al.*, 1995) ou ostéoblastique. En présence de BMP-2 (Bone Morphogenic Protein) par exemple, les C₂C₁₂ se différencient non plus en myocytes mais en ostéocytes (Vinals *et al.*, 2002).

3.3. Les MRFs (Myogenic Regulatory Factors)

3.3.1. Une famille de facteurs de transcription :

La différenciation musculaire est régulée par une série de facteurs de transcription appelés MRFs (Myogenic Regulatory Factors) ; le premier à être identifié est MyoD (Myoblast Determining gene) (Davis *et al.*, 1987), les autres sont la myogénine, Myf5 et Myf6 (aussi appelé MRF4 ou herculine). Chacun de ces facteurs possède un motif composé d'un domaine basique et d'un domaine adjacent de type hélice-boucle-hélice (ce motif est nommé b-HLH ; voir point 2.2.1). Le domaine basique permet la liaison à l'ADN tandis que le second domaine sert à la dimérisation avec d'autres protéines possédant un motif HLH (Lassar *et al.*, 1994b).

Ces facteurs de transcription myogéniques ont la capacité de reprogrammer des cellules précurseurs (fibroblastes, adipoblastes,...) en cellules musculaires lorsque leur expression y est induite (Fig 1.17), ce phénomène est connu sous le nom de conversion myogénique (Filvaroff *et al.*, 1996).

Nous verrons plus loin que de nombreuses protéines peuvent interagir avec les membres de la famille MRF, mais l'interaction la plus fréquente et la mieux décrite s'opère avec les protéines ubiquistes à motif b-HLH de la famille E (E proteins) (Murre *et al.*, 1989).

3.3.2. Les MRFs interagissent avec les protéines E et MEF2 :

La famille des protéines E est composée de trois membres : E2A (pouvant donner trois produits majeurs par épissage alternatif ; E12, E47 et E2-5), E2-2 (aussi appelé ITF2) et HEB. Tous les membres de cette famille peuvent hétérodimériser, via leur domaine HLH, avec les facteurs myogéniques décrits auparavant.

Les protéines E peuvent se fixer sur l'ADN sous forme d'homodimères mais sont inactives en tant que tel, du moins lorsqu'elles se fixent au niveau du *enhancer* MCK (Muscle Creatine Kinase). En effet, elles possèdent un domaine répresseur (Rep) et deux domaines transactivateurs (AD1 et AD2) dont l'un (AD1) réprime constitutivement la transcription (Fig

1.18). Sous forme homodimérique, le domaine répresseur réprime AD2 et ce n'est que sous forme hétérodimérique avec un MRF que la transcription peut-être enclenchée via la répression du domaine AD1 (Markus *et al.*, 2002).

Cette hétérodimérisation est obligatoire pour permettre la transcription dépendante des MRFs : ce sont les hétérodimères MRF-E proteins qui se fixent sur les séquences consensus appelées boîtes E (E-box) contenant la séquence nucléotidique CANNTG (N étant un nucléotide quelconque) (Lassar *et al.*, 1994a). Ces séquences, présentes dans la plupart des promoteurs de gènes musculaires, permettent l'expression spécifique de nombreux gènes musculaires tels que le gène MCK (Muscle Creatine Kinase) (Lassar *et al.*, 1989).

Des données supplémentaires (Naya *et al.*, 1999) indiquent que les hétérodimères MyoD-E12 peuvent également collaborer avec les facteurs musculaires de la famille MEF2 (Myocyte Enhancer Factor-2) pour activer la transcription de gènes spécifiquement musculaires ainsi que la myogenèse.

La famille MEF2 comporte quatre membres (MEF2 A ; B ; C et D) qui se lient spécifiquement à un motif d'ADN « A-T rich » présent au niveau des promoteurs de nombreux gènes musculaires (Black *et al.*, 1998). Des expériences de co-transfection ont montré que l'expression de MEF2 augmentait l'efficacité de la myogenèse induite par un MRF, mais contrairement aux MRFs, les MEF2 ne sont pas capables à eux seuls d'induire la myogenèse dans des cellules non musculaires (Yun *et al.*, 1996).

Plusieurs modèles d'interaction entre les MRFs et les MEF2 existent en fonction de la présence ou non d'une boîte E ou d'un site permettant la liaison de MEF2 (Fig 1.19) (Molkentin *et al.*, 1996). Signalons que cette collaboration MRF / MEF2 permet d'expliquer l'expression de certains gènes spécifiques du muscle alors que leur promoteur est dépourvu de boîte E (Olson *et al.*, 1995).

3.3.3. Activation séquentielle des MRFs au cours de la différenciation :

Au cours de la myogenèse, il y a une expression séquentielle des facteurs de transcription myogéniques (Fig 1.20). En effet, MyoD et Myf5 sont souvent appelés « facteurs de détermination musculaire » étant donné qu'ils s'expriment dans les cellules musculaires déterminées mais indifférenciées : les myoblastes (Brand-Saberi *et al.*, 1999).

Quant aux deux autres facteurs de transcription de la famille MyoD, myogénine et Myf6, ils sont induits durant les étapes terminales de la différenciation myogénique. La myogénine est exprimée après fusion des myoblastes, il est d'ailleurs possible d'empêcher cette fusion en inhibant son expression via un oligonucléotide antisens (Florini *et al.*, 1990), tandis que Myf6 est hautement exprimé dans le muscle squelettique mature (Lassar *et al.*, 1994b).

Cette activation séquentielle des différents membres de la famille MRF est confirmée par des données provenant de souris knockout (KO) (pour une revue, voir (Arnold *et al.*, 1996)). Des souris double knockout pour Myf5 et MyoD présentent l'absence complète de myoblastes et donc de muscles squelettiques (Rudnicki *et al.*, 1993). Remarquons que ces deux facteurs de transcription fonctionnent au moins partiellement de manière redondante puisque des souris KO pour MyoD ou Myf5 présentent des muscles squelettiques apparemment normaux.

Par contre, des souris KO pour la myogénine ont une importante population myoblastique là où on s'attend normalement à trouver des fibres musculaires, ces cellules restent donc indifférenciées. Ces données expérimentales confirment donc le schéma suivant lequel MyoD et Myf5 sont nécessaires à la détermination musculaire, alors que la myogénine régule la différenciation.

In vivo, la première étape du développement du muscle squelettique est l'engagement des cellules mésodermiques dans la lignée myogénique. Ce phénomène est induit positivement par des molécules extracellulaires comme les membres de la famille Sonic Hedgehog (Shh) et Wnt qui sont sécrétés par les tissus avoisinant. Il a été proposé que c'était l'activité combinée de ces deux molécules qui induisait la formation du myotome, Shh étant

sécrétée par la notochorde et la plaque ventrale (« floor plate ») tandis que le tube neural sécrète les ligands Wnt (Munsterberg *et al.*, 1995).

Ces signaux induisent l'expression de deux membres de la famille MyoD : MyoD et Myf5. Cette induction se fait via une cascade d'activation qui implique le facteur de transcription Pax-3 ainsi que d'autres facteurs coopérant avec celui-ci (Eya-2, Six-1 et Dach-2) afin de réguler la myogenèse (Heanue *et al.*, 1999).

Une fois exprimés et activés, MyoD et Myf5 contribuent à arrêter le cycle cellulaire, à induire la transcription de gènes spécifiques du muscle et à déclencher la différenciation terminale par l'intermédiaire de l'expression de la myogénine et de Myf6 (Lassar *et al.*, 1994b).

3.4. Régulation de l'activité transcriptionnelle des MRFs :

3.4.1. Régulation par des protéines inhibitrices

En plus des interactions avec les protéines E et MEF2 décrites précédemment, d'autres protéines peuvent interagir avec les MRFs afin d'inhiber leur activité. Ces régulations négatives de l'activité des MRFs sont essentielles pour permettre un processus de différenciation harmonieux. En effet, on constate que MyoD et Myf5 sont exprimés dans les myoblastes en prolifération alors que les gènes musculaires comme celui de la MCK, dont la transcription est contrôlée par les MRFs, ne le sont pas. Il y a donc nécessairement des mécanismes qui répriment l'activité transactivatrice de MyoD et Myf5 tant que la différenciation n'est pas enclenchée, comme c'est le cas pour les myoblastes C₂C₁₂ en prolifération. *In vivo*, des régulations négatives interviennent également pour permettre une spécification tissulaire autre que musculaire, dans les tissus adjacents au myotome par exemple (voir l'exemple de la protéine Twist ci-dessous).

a) Interactions avec les protéines Id

Il existe divers inhibiteurs myogéniques, les plus connus étant certainement les protéines Id (Benezra *et al.*, 1990). Les membres de la famille Id (Inhibitor of DNA

binding/differentiation) contiennent un motif HLH mais sont dépourvus de motif basique de liaison à l'ADN. Ils vont ainsi hétérodimériser avec les protéines E et les facteurs myogéniques b-HLH, ce qui va conduire à la séquestration de ces protéines qui ne pourront dès lors plus se lier à l'ADN. Au cours de la différenciation myogénique, le taux de protéines Id diminue de telle sorte que MyoD puisse hétérodimériser avec les protéines E, se lier à sa séquence consensus et jouer son rôle d'activateur transcriptionnel (Langlands *et al.*, 1997).

b) Interactions avec la protéine MyoR

MyoR (myogenic repressor) est une protéine de type b-HLH dont l'expression est élevée dans les myoblastes en prolifération et diminue au cours de la différenciation. MyoR forme des hétérodimères avec les protéines E et peut lier la même séquence d'ADN que les facteurs myogéniques b-HLH, mais il agit comme un répresseur de la myogenèse.

Il y a au moins trois types de mécanismes par lesquels MyoR bloque l'expression des gènes musculaires. Tout d'abord, il peut compéter avec les hétérodimères MRF-E proteins pour se lier à l'ADN étant donné qu'ils reconnaissent la même séquence (E-box). Deuxièmement, MyoR peut, lorsqu'il est sur la E-box, réprimer la transcription grâce à son domaine répresseur. Dernièrement, MyoR peut compéter avec les facteurs myogéniques en limitant la quantité de protéines E partenaires. Toutefois, ce dernier mécanisme semble être d'une moindre importance étant donné que l'excès de E12 ne contrecarre pas l'effet de MyoR (Lu *et al.*, 1999).

c) Interactions avec la protéine Twist

La protéine Twist, faisant également partie de la famille b-HLH, a la capacité d'inhiber la myogenèse par plusieurs mécanismes. Premièrement, Twist séquestre les protéines E et empêche ainsi la formation d'hétérodimères MyoD-E proteins. Deuxièmement, Twist peut également inhiber l'activité transactivatrice de MEF2 via une interaction directe médiée par l'extrémité C-terminale de Twist (Spicer *et al.*, 1996).

Toutefois, la surexpression à la fois des protéines E et de MEF2 ne permet pas d'enlever cette inhibition, ce qui suggère l'existence d'autres mécanismes par lesquels Twist empêcherait la myogenèse. Parmi ceux-ci, il a été montré que la protéine Twist pouvait

inhiber l'action de MyoD en interagissant directement avec lui. Cette interaction ne se fait pas de manière conventionnelle via les domaines HLH mais met en jeu les domaines basiques des deux protéines (Hamamori *et al.*, 1997).

Au cours du développement des somites, Twist est exprimé dans les structures mésodermiques mais pas dans le myotome qui est le tissu où le muscle squelettique se développe (Spicer *et al.*, 1996).

d) Interactions avec la protéine OUT

La protéine OUT, appartenant à la famille b-HLH, est exprimée principalement dans les organes reproducteurs de souris. Ce facteur possède une fonction inhibitrice de la différenciation similaire à celle des protéines Id, bien que OUT contient en plus du domaine HLH un domaine basique.

Comme les protéines Id, OUT séquestre les protéines E en hétérodimérisant avec elles à travers la région HLH, ce qui laisse moins de protéines E disponibles pour les facteurs myogéniques (Narumi *et al.*, 2000).

3.4.2. Régulation par phosphorylation / déphosphorylation :

Comme la plupart des facteurs de transcription, l'activité des MRFs est régulée par phosphorylation et déphosphorylation. La phosphorylation peut dans certains cas promouvoir la myogenèse, dans d'autres l'inhiber. Bien que ce domaine soit encore largement inexploré, on connaît au moins deux exemples de régulation de l'activité des MRFs par des kinases.

Premièrement, les MRFs possèdent un résidu thréonine conservé (thr 87 dans le cas de la myogénine) dans leur région basique, qui est le substrat de la PKC β (Protein Kinase C β) *in vitro*. La phosphorylation de la myogénine par cette PKC inhibe sa liaison à l'ADN. En présence de facteurs de croissance comme le FGF (Fibroblast Growth Factor), les cellules prolifèrent et les facteurs de transcription myogéniques ne peuvent se lier à l'ADN notamment parce qu'ils sont phosphorylés par la PKC β (Li *et al.*, 1992).

Un second exemple de régulation fait intervenir la voie de la PI₃K (Phosphatidylinositol 3-kinase) et de la p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase). Ces deux kinases peuvent être activées via des récepteurs à activité tyrosine kinase par l'insuline ou les « insulin-like growth factors ». Ceux-ci sont connus pour avoir une activité positive sur la différenciation des myoblastes (Gredinger *et al.*, 1998). En effet, la PI₃K et sa protéine cible (Akt ou protéine kinase B) activent la différenciation myogénique : la surexpression de formes constitutivement actives de ces deux kinases augmente la différenciation myogénique des cellules C₂C₁₂, tandis que leur inhibition empêche la formation des myotubes et l'expression de protéines musculaires (Jiang *et al.*, 1999).

En ce qui concerne la p38 MAPK, elle est présente dans les myoblastes en division et augmente graduellement au cours de la différenciation des myoblastes C₂C₁₂ en myotubes multinucléés (Zetser *et al.*, 1999). En inhibant cette kinase, on inhibe la fusion des myoblastes ainsi que l'expression des gènes spécifiques du muscle. Par contre, une activation de la p38 MAPK, stimule l'expression des gènes musculaires (Cuenda *et al.*, 1999).

Bien que les mécanismes moléculaires par lesquels la PI₃K et la p38 MAPK ne soient pas encore complètement éclaircis, on sait que ces deux voies participent en parallèle à la différenciation musculaire via la phosphorylation du domaine transactivateur de MEF2. Cette phosphorylation conduit à une augmentation de l'activité transcriptionnelle de cette dernière (Tamir *et al.*, 2000).

3.4.3. Régulation par acétylation :

La présence d'une E-box sur un promoteur est nécessaire mais pas suffisante pour permettre la transcription MyoD-dépendante, c'est pourquoi les facteurs myogéniques interagissent également avec les coactivateurs généraux CBP et p300 (voir point 2.2.2.) (Polesskaya *et al.*, 2000).

Des expériences de transfection ont montré que la protéine acétylée *in vitro* avait une activité transactivatrice plus élevée que la protéine non acétylée. Cette acétylation est réalisée, *in vivo*, via des protéines à activité histone acétyl-transférase (HAT), sur trois lysines (99, 102 et 104) adjacentes au domaine basique de MyoD (Sartorelli *et al.*, 1999).

CBP/p300 sont des coactivateurs nécessaires à la transactivation de MyoD. Comme mentionné précédemment, ces deux protéines possèdent une activité HAT (Bannister *et al.*, 1996) et sont aussi capables de recruter d'autres HATs comme PCAF (p300/CREB-binding protein-associated factor) (Yang *et al.*, 1996). Il a été montré que le recrutement de PCAF par MyoD, à travers le complexe p300/CBP, était nécessaire au processus de différenciation des cellules musculaires (Puri *et al.*, 1997b).

Physiologiquement, l'interaction entre MyoD et une acétylase, comme PCAF, ne se fait que lorsque les cellules sont en cours de différenciation. En effet, dans les cellules musculaires non différenciées MyoD est associé à une déacétylase (HDAC1) ce qui constitue un système de contrôle supplémentaire responsable du *silencing* de la transcription MyoD-dépendante.

De plus, l'acétylation de MyoD est conditionnée par son niveau de phosphorylation, qui lui-même dépend du cycle cellulaire (Mal *et al.*, 2001). Comme nous allons le voir au point suivant, MyoD est phosphorylé par des cdk tant que les cellules prolifèrent. Lorsque le cycle cellulaire s'arrête, ces cdk ne phosphorylent plus MyoD. Celui-ci peut alors être acétylé et donc exercer son activité transcriptionnelle.

3.5. MyoD et le cycle cellulaire :

Comme beaucoup de facteurs de transcription, MyoD est une protéine ayant une courte durée de vie dans la cellule : son temps de demi-vie avoisine les 30 minutes. La dégradation de MyoD passant par la voie du protéasome (via l'ubiquitine ligase Cdc34) est précédée d'une phosphorylation (Song *et al.*, 1998). Cette phosphorylation se fait sur la Ser 200 par des kinases dépendantes de cyclines (cdk) et plus particulièrement cdk1 et cdk2. Comme ces deux kinases sont actives simultanément tout au long du cycle cellulaire, cela signifie que tant que les cellules sont en prolifération, MyoD est facilement phosphorylé et sa demi-vie est donc plus courte (Kitzmann *et al.*, 1999).

En plus d'être régulé par des kinases dépendant du cycle cellulaire, MyoD peut être considéré comme un régulateur du cycle cellulaire. En effet, comme nous allons le voir, MyoD peut arrêter le cycle cellulaire dans les myoblastes avant différenciation. On peut donc

facilement imaginer une boucle de régulation entre le cycle cellulaire et la régulation de MyoD. En effet, si MyoD arrête le cycle cellulaire il ne sera plus phosphorylé par les cdk (cyclin-dependent kinase) et donc plus dégradé. Son abondance devrait donc augmenter, et en plus il pourra être acétylé par CBP / p300, et deviendra donc transcriptionnellement actif.

Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer comment MyoD participe à l'arrêt du cycle cellulaire dans les myoblastes lors de la différenciation myogénique :

a) MyoD induit l'expression de p21

La progression du cycle cellulaire à travers la phase G₁ est modulée par une famille de cdk (cyclin-dependent kinase) lesquelles sont sous le contrôle d'un groupe de protéines inhibitrices appelées cdk_i (cyclin-dependent kinase inhibitor). MyoD est capable d'arrêter le cycle cellulaire en induisant p21, qui est un inhibiteur des cdk. On pourrait postuler que ce soit par hétérodimérisation avec des protéines inhibitrices comme les protéines Id (voir point 3.4.1.a) (Guo *et al.*, 1995).

b) MyoD inhibe la phosphorylation de pRb

Le cycle cellulaire dépend du niveau de phosphorylation de la protéine Rb (protéine du rétinoblastome). Lorsqu'elle est hypophosphorylée, il y a une répression des gènes nécessaires à la réplication de l'ADN et donc une diminution de la croissance cellulaire (Wei *et al.*, 2001). Par contre, lorsque pRb est phosphorylé par des cdk, le facteur E₂F est libéré et participe au déclenchement du cycle cellulaire (fig 1.21).

In vitro, des expériences d'immunoprécipitation ont montré une interaction entre MyoD et pRb (Gu *et al.*, 1993). Ce résultat pourrait suggérer qu'un mécanisme d'interaction directe entre MyoD et pRb bloquerait la phosphorylation de pRb et supprimerait la prolifération des myoblastes. Cependant le mécanisme par lequel MyoD empêcherait la phosphorylation de pRb n'est pas connu. On peut supposer que des changements dans la conformation de pRb, suite à la liaison de MyoD, empêcherait sa phosphorylation par des kinases ou augmenterait son affinité pour des protéines phosphatases.

Signalons que dans une population myoblastique, une partie des cellules quiescentes (en phase G₀) peuvent à nouveau rentrer dans le cycle cellulaire et réinitier leur prolifération en présence d'un signal particulier. C'est ce qui se passe notamment pour les cellules satellites lors du processus de régénération musculaire. Ces cellules satellites sont des petites cellules mononucléées, localisées entre la lame basale et le sarcolemme des fibres musculaires, qui constituent une réserve en cellules souches susceptibles de se diviser et régénérer les fibres musculaires en cas de besoin (traumatisme, croissance, etc) (Bailey *et al.*, 2001).

La technique de l'EMSA, ou retard sur gel, est certainement la méthode la plus répandue actuellement pour étudier les protéines, telles que les facteurs de transcription, qui se lient à l'ADN. Bien qu'étant un outil puissant et d'une grande sensibilité, cette technique présente néanmoins certains inconvénients. D'un point de vue pratique, c'est une technique assez lourde à mettre en œuvre. Elle est relativement longue et ne permet le traitement simultané que d'un nombre restreint d'échantillons. Les marqueurs radioactifs utilisés rendent cette technique onéreuse et obligent l'expérimentateur à prendre de nombreuses précautions durant les manipulations.

Le but de ce mémoire est de développer une technique alternative à l'EMSA, qui soit à la fois rapide et sensible et qui permettrait de détecter l'activation des facteurs de transcription myogéniques sans avoir recours à des isotopes radioactifs.

La technique colorimétrique employée est simple et permet le dosage d'un grand nombre d'échantillons en parallèle puisqu'elle s'effectue suivant un format 96 puits. Le principe (fig 1.13) est celui d'un ELISA, excepté le fait que la molécule d'intérêt, le facteur de transcription, est capturé non par un anticorps mais par une molécule d'ADN double brin contenant la séquence consensus du facteur de transcription étudié. Ce trappeur d'ADN est biotinylé à une extrémité, ce qui permet sa fixation sur un support solide coaté à la streptavidine (plaque 96 puits). Une fois le trappeur fixé, les extraits cellulaires provenant de diverses conditions de culture (cellules à l'état de contrôles, cellules confluentes et myotubes) sont incubés en sa présence. Après des étapes de lavages successives, la protéine fixée sur le trappeur sera détectée à l'aide d'un anticorps qui lui est spécifique (anticorps primaire) avant d'incuber le tout avec un anticorps secondaire couplé à une peroxydase (HRP : *horse radish peroxydase*).

Ce test colorimétrique sur puits a été développé au laboratoire initialement pour fournir une alternative avantageuse à la technique de retard sur gel utilisée pour doser l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription NF κ B (Renard *et al.*, 2001). Par la suite, ce principe a été appliqué avec succès à d'autres facteurs de transcription comme AP-1, CREB, HIF-1 α , p53, PPAR α et NFAT. L'objectif de ce mémoire est d'optimiser ce dosage pour MyoD et les autres MRFs.

Ce principe s'applique particulièrement bien aux facteurs myogéniques de la famille MyoD puisqu'ils reconnaissent tous la même séquence d'ADN. Ce qui veut dire qu'avec le même trappeur il va être possible d'étudier l'activité de liaison à l'ADN de toute une famille de facteur de transcription en parallèle. La seule chose qui variera sera l'anticorps primaire utilisé.

L'expérience acquise au laboratoire lors du développement du dosage pour d'autres facteurs de transcription a permis de définir les paramètres importants pour l'optimisation du dosage.

Les étapes de développement du dosage sont les suivantes :

- Choix de la séquence du trappeur et amplification par PCR de celui-ci ;
- Fixation du trappeur biotinylé sur la plaque 96 puits coatés à la streptavidine ;
- Mise au point du dosage en tant que tel ;
- Validation du dosage en le comparant à la méthode de référence qui est l'EMSA ;
- Utilisation de ce dosage pour étudier un processus de différenciation.

Il est important de remarquer que toutes les étapes de mises au point seront réalisées sur un seul facteur de transcription (MyoD) et cela pour des raisons de facilité. Ce n'est que lorsque le dosage sera au point que les autres facteurs myogéniques interviendront.

1. Culture cellulaire

1.1. Culture cellulaire

➤ Matériel

- Cellules :

Les cellules C2C12 sont des myoblastes murins ; elles sont fournies par l'American Type Culture Collection.

- Solutions :

- Trypsine-EDTA : solution stérile de trypsine à 0.05 % ; EDTA (Ethylène Diamine Tétra acétique) 0,53 mM (**Gibco BRL**, Paisley, Grande-Bretagne).
- Milieu de rinçage : solution stérile de PBS (Phosphate Buffer Saline : 0,9 % NaCl, 10 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$; pH 7,4).
- DHG : Dulbecco's modified eagle's medium + High Glucose (4,5 g/l) (**Gibco BRL**, Paisley, Grande-Bretagne) auquel on ajoute 4 mM de L-glutamine (**Sigma**, Saint-Louis USA) ainsi que des antibiotiques (pénicilline 50 U/ml ; streptomycine 50 $\mu\text{g/ml}$, **Biowhittaker**).
- DHG + 20 % FBS : milieu DHG enrichi avec 20 % de sérum de veau fœtal (**Gibco BRL**, Paisley, Grande-Bretagne).
- DHG + 2 % HS : milieu DHG enrichi avec 2 % de sérum de cheval (**Gibco BRL**, Paisley, Grande-Bretagne).

➤ Méthode de culture

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm² (T 75, Corning, New-York, USA). Lorsqu'elles arrivent à 40 % de confluence (cellules contrôles), c'est-à-dire quand leur densité moyenne est de 8000 cellules/cm² (600.000 cellules /T 75), on les repique en 3 ou en 4.

Les milieux utilisés sont préchauffés à 37°C. L'ancien milieu est décanté et les cellules sont rincées avec 10 ml de milieu de rinçage dans le but d'éliminer l'excédant de sérum. Après deux minutes, ce milieu est retiré de la boîte de culture et 2 ml de trypsine-EDTA sont incubés durant 30 secondes à température ambiante. Lorsque les cellules se sont arrondies, la trypsine est décantée et la boîte est placée à 37°C durant 2 à 3 minutes, ce qui va accélérer leur détachement de la paroi.

Lorsque la majorité des cellules se sont détachées, 10 ml de DHG + Ab + 20 % FBS sont ajoutés : le sérum contenant des inhibiteurs de protéases, la trypsine est inactivée.

Le milieu est alors agité avec une pipette Pasteur afin de rompre les agrégats cellulaires et de rincer la boîte de culture sur le fond de laquelle étaient attachées les cellules. Les cellules sont alors transférées dans des boîtes de cultures de 75 cm², les volumes de milieu sont portés à 15 ml par T 75 avec du DHG + Ab + 20% FBS. Les boîtes sont placées dans une étuve conditionnée à 37°C et 5 % de CO₂ pour l'ajustement du pH (**Heraeus**, Germany).

➤ Méthode de différenciation des cellules

Les cellules confluentes sont rincées avec 10 ml de milieu de rinçage avant d'être placées dans 15 ml de milieu DHG + 2 % HS afin d'induire leur différenciation en myotubes multinucléés. Le milieu est renouvelé tous les jours jusqu'à l'extraction des myotubes.

1.2. Extraction des protéines nucléaires

➤ Matériel

- PBS (Phosphate Tampon Saline) : 0,9 % NaCl, 10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄; pH 7,4.
- HB 2x (Hypotonic Buffer) : 10 mM NaF (**Merck**, Darmstadt, Germany), 2 mM Na₂MoO₄ (**Sigma**, Saint-Louis, USA), 40 mM Hepes pH7,9 (**Acros**

- Organics**, Belgique) et 0.2 mM EDTA (Titriplex, **Merck**, Darmstadt, Germany)
- Solution de lyse : HB 1x, NP-40 0.5 % (Nonidet P-40 ; **Sigma**, Saint-Louis, USA)
 - Re (Re-suspension Buffer) : HB 1x, glycérol 17.4 % (**Merck**, Darmstadt, Germany)
 - Sa : (Saline Buffer) pour 20 ml ; HB 1x, glycérol 17.4 % (**Merck**, Darmstadt, Germany), NaCl 0.4 M (**Merck**, Darmstadt, Germany)
 - PIC (Protease Inhibitor Cocktail) (**Roche**, Mannheim, Germany): une tablette de PIC diluée dans 2 ml H₂O
 - PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer): 25 mM Na₃VO₄ (**Sigma**, Saint-Louis, USA) ; 250 mM PNPP (p-Nitrophenyl Phosphate; **Sigma**, Saint-Louis, USA) ; 250 mM □glycérol phosphate (**Sigma**, Saint-Louis, USA) et 125mM NaF (**Merck**, Darmstadt, Germany)
 - Racloirs
 - Microtubes

➤ Méthode d'extraction des protéines nucléaires

Les boîtes sont décantées et les cellules sont rincées avec 10 ml de PBS froid (4°C) avant d'être raclées dans 5 ml de PBS froid. Après les avoir transférées dans un tube de 10 ml, les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1000 rpm et à 4°C.

Suite à l'élimination du surnageant, le culot cellulaire est resuspendu dans du tampon de lyse (100 µl par T75 de cellules contrôles et 500 µl par T75 contenant des cellules confluentes ou des myotubes) pendant 5 minutes à 4°C avant d'être transféré dans un microtube.

Le lysat cellulaire est alors centrifugé 30 secondes à 13000 rpm et le culot est resuspendu dans du Re (on prépare 500 µl de Re + 20 µl PIC + 20 µl de PIB). Le volume total du microtube est mesuré et un même volume de Sa (préparé comme Re) est ajouté. Les tubes sont dès lors placés sur une roue en chambre froide (4°C) où ils sont légèrement agités pendant minimum 30 minutes.

Dès l'agitation terminée, les tubes sont centrifugés à 13000 rpm pendant 10 minutes à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. Les surnageants sont récoltés, fractionnés et stockés à -70°C après avoir effectué un dosage de protéines selon la méthode de Bradford.

-Dosage des protéines selon la méthode de Bradford

➤ Matériel

- Etalon : BSA : Bovin Serum Albumin (5µg de protéines dans 3.6µl)
- Colorant : Bio-Rad Protein Assay (**Biorad**, Munich, Germany)
- Solution de Re-Sa (en quantité équivalente)
- Extraits cellulaires à doser
- Spectrophotomètre (**Perkin Elmer**, USA)

➤ Méthode

Mettre 1 ml de colorant Bradford par tubes (faire des triples : 3 blancs, 3 étalons, 3 CTL et 3 stimulées). Ajouter toutes les 30 secondes :

- 2 µl du mélange Re-Sa dans les tubes « blancs »
- 3.6 µl de l'étalon dans les tubes « étalons »
- 2 µl d'extraits nucléaires des cellules non stimulées dans les tubes « CTL »
- 2 µl d'extraits nucléaires des cellules confluentes ou myotubes dans les tubes « test »

Laisser incubé 5 à 10 minutes à température ambiante avant de lire, toutes les 30 secondes, l'absorbance à 595 nm. D'après la valeur d'absorbance que l'on mesure pour l'étalon, il est aisé de retrouver la concentration protéique de nos échantillons.

2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

2.1. Principe

La PCR est une méthode enzymatique qui permet d'amplifier une séquence d'ADN déterminée de manière exponentielle et cyclique (Mullis *et al.*, 1987). Elle se base sur l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable. Chaque cycle d'amplification peut se subdiviser en trois étapes s'effectuant à des températures particulières (Fig 3.1).

La première étape, appelée dénaturation, permet l'obtention d'ADN cible sous forme de simples brins. La seconde étape concerne l'hybridation de deux oligonucléotides sur l'ADN cible dénaturé. En s'hybridant, les deux oligonucléotides, choisis spécifiquement selon des règles de base (taille, température de melting, pourcentage en G-C), vont former des amorces doubles brins reconnues par une ADN polymérase qui va initier la troisième étape, à savoir, l'élongation. Après un nombre de cycles pouvant varier de 20 à 45, il y a amplification de la séquence spécifique d'ADN d'au moins un million de fois.

Dans un cycle de PCR typique, l'ADN est dénaturé pendant une minute à 94°C, les amorces sont ensuite hybridées pendant une minute à une température comprise entre 40 et 72°C. Suite à cela, durant de nouveau une minute, se produit l'extension des amorces par l'ADN polymérase à 72°C.

Le premier cycle est précédé d'une dénaturation initiale pendant 3 à 5 minutes à 94°C. Quand au dernier cycle, il est suivi d'une élongation de 10 minutes à 72°C afin d'assurer la terminaison des fins de chaînes.

Pour sélectionner la température d'hybridation (T_h) des oligonucléotides sur l'ADN cible, il est nécessaire de connaître la température de melting (T_m) (c'est-à-dire ; la température à laquelle 50 % des hybrides sont formés) des oligonucléotides. Cette température se calcule grâce à la formule suivante : $T_m (^{\circ}C) = 2(A+T) + 4(G+C)$

La température d'hybridation est optimale quand elle est de 5 à 10°C inférieure à la température de melting des primers.

Le problème majeur de la PCR est le risque de faux positifs occasionnés par de l'ADN contaminant provenant d'amplifications antérieures. Afin d'éviter ce type de problème, nous allons travailler dans 3 pièces PCR différentes de façon à limiter au maximum les risques de contaminations. Une première pièce ADN free pour préparer le mix PCR contenant le tampon de réaction, les primers, la Taq polymérase et les nucléotides, une deuxième pièce pour ajouter l'ADN cible et une troisième pièce où l'on ouvre les microtubes après PCR pour les révéler sur gel. De plus, des contrôles négatifs sont réalisés ; ce sont des microtubes PCR qui contiennent le tampon PCR, les primers, les nucléotides et la Taq polymérase mais pas d'ADN cible.

Avec cette technique nous allons amplifier notre trappeur, contenant la séquence consensus du facteur MyoD, qui sera par la suite fixé sur la plaque multipuits. Dans ce but, un des deux primers utilisé comporte une biotine à son extrémité 5' afin de permettre la fixation du trappeur par liaison à la streptavidine.

2.2. Matériel et méthode

➤ Matériel

- ADN polymérase 5 U/μl (**Biotools**, B&M Labs, Spain)
- Tampon PCR 10x (**Biotools**, B&M Labs, Spain)
- dNTPs 20 μM (**Eurogenetec**, Belgique)
- Primers 200 μM
 - FT MyoD : n° 878389, **Eurogenetec**, Belgique:
5'-CTC-AGG-CAG-CAG-GTG-TTG-GGG-C-3'
 - FT biot : n° 822725, **Eurogenetec**, Belgique:
5'-TGG-CCA-AGC-GGC-CTC-TGA-TAA-CC-3'
- Plasmide contenant la séquence consensus de MyoD : 4000 μg/μl
- Tubes PCR de 200 μl : MicroAmp Reaction tube with cap (**Perkin Elmer**, USA)
- Appareil PCR : GeneAmp PCR System 9600 (**Perkin Elmer**, USA)

➤ Méthode

La première étape consiste à préparer le mélange PCR contenant :

- 1 μM de chaque amorce
- Tampon PCR 1x
- 0.8 μM de dNTPs
- 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de plasmide
- 2.5 U d'ADN polymérase
- Ajuster le volume à 100 μl avec de l'eau distillée

La seconde étape consiste à lancer le programme PCR :

- 3 minutes à 94°C
- 35 cycles avec +30 secondes à 94°C
+30 secondes à 55°C
+30 secondes à 72°C
- 10 minutes à 72°C

3. Électrophorèse sur gel d'agarose

3.1. Principe

Cette technique permet la séparation de différents fragments d'ADN selon leur poids moléculaire. Elle permet de vérifier la spécificité et la sensibilité de la PCR. A pH neutre, l'ADN est chargé négativement. Dès lors si un champ électrophorétique est appliqué, l'ADN va migrer vers l'électrode chargée positivement. La séparation des différents fragments d'ADN dépend de la force de migration due au champ électrique et à la force de freinage exercée par le gel d'agarose (Fig 3.2).

Cette vitesse de migration des fragments dépend de la concentration en agarose du gel. Un pourcentage élevé en agarose (2 %) permet une bonne séparation des petits fragments (de 100 à 500 pb) tandis qu'un pourcentage plus faible en agarose (1 %) assure la visualisation de fragments plus grands (de 500 à 3000 pb). Cependant, la vitesse de migration des fragments

dépend, aussi, d'autres paramètres tels que le voltage appliqué, le tampon utilisé et le poids moléculaire de la molécule.

Afin d'estimer la taille des fragments d'ADN, nous faisons migrer en parallèle un marqueur de poids moléculaire qui servira de référence (Fig 3.3).

Pour visualiser les fragments d'ADN, du bromure d'éthidium est ajouté lors de la préparation du gel. Le bromure d'éthidium, molécule fluorescente, s'intercale au niveau des doubles brins d'ADN et permet donc une visualisation de celui-ci par lecture sur un banc U.V.

3.2. Matériel et méthode

➤ Matériel

- Agarose electrophoresis grade (**Gibco Brl**, Paisley, Grande-Bretagne)
- Tampon TBE 10 x (Tris-Borate-EDTA) dont la composition pour un litre est :
 - + 108 g de Tris-HCl (**Merck**, Darmstadt, Germany)
 - + 55 g d'acide borique (**Merck**, Darmstadt, Germany)
 - + 40 ml d'EDTA 0.5M pH 8 (**Merck**, Darmstadt, Germany)
- Bromure d'éthidium 500 µg/ml (**Sigma**, Saint-Louis, USA)
- Bleu de bromophénol de composition :
 - + glycérol 50 % (**Merck**, Darmstadt, Germany)
 - + EDTA 100mM (**Merck**, Darmstadt, Germany)
 - + SDS 1 % (**Merck**, Darmstadt, Germany)
 - + Bleu de bromophénol 0.1 % (**Janssen chimica**, Belgique)
- Marqueur DNA Ladder 100 pb (**Promega**, Madison, USA)
- Cuve d'électrophorèse Horizon 11.14 (**Gibco Brl**, Paisley, Grande-Bretagne)
- Générateur EPS 500/400 (**Pharmacia**, Sweden)
- Lampe UV (**Vulber-Lourmat**, France)
- Appareil photo Kaiser RA1 (Allemagne) + Photo-print IP-001-SD (**Vulber-Lourmat**, France)
- Film K65HM (**Mitsubishi**, Japan) + Imprimante P91 (**Mitsubishi**, Japan)

➤ Méthode

L'électrophorèse sur gel d'agarose nécessite trois étapes qui sont la préparation de la cuve d'électrophorèse, la préparation des échantillons d'ADN et la migration.

- Préparation de la cuve d'électrophorèse :

- Peser 1.6 g d'agarose.
- Diluer l'agarose dans 80 ml de tampon TBE 1x afin d'obtenir un gel d'agarose 2 %.
- Chauffer le mélange agarose-TBE jusqu'à l'obtention d'une solution limpide.
- Laisser refroidir jusqu'à environ 60°C.
- Ajouter 15 µl de bromure d'éthidium.
- Couler le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- Placer les peignes et laisser polymériser le gel pendant 45 minutes.
- Retirer délicatement les peignes.
- Remplir la cuve d'électrophorèse de tampon TBE 1x.

- Préparation des échantillons :

a) Produits PCR

- Transférer 10 µl de chaque produit PCR dans un microtube.
- Ajouter 2 µl de bleu de bromophénol ; solution destinée à alourdir les échantillons.

b) Etalon de poids moléculaire

- Transférer 10 µl d'étalon DNA ladder 100 pb dans un microtube.
- Ajouter 2 µl de bleu de bromophénol.

- La migration :

- Déposer les échantillons dans les différents puits .
- Laisser migrer les échantillons dans le gel durant une heure à 100 volts.
- Visualiser le gel sous UV et prendre une photo du gel.

4. Concentration du trappeur

4.1. Principe

Dans le but de concentrer le trappeur que l'on a amplifié par PCR, nous avons utilisé un centricon (Fig 3.4 ; 3.5). Celui-ci permet, grâce à une membrane contenant des pores calibrés, la rétention de molécules ayant un poids moléculaire plus important que le diamètre des pores. Selon la catégorie de centricon utilisé, il est possible d'empêcher le passage d'une certaine catégorie de molécules suivant leurs poids moléculaire et ainsi de concentrer ces molécules. Après avoir été concentré, le trappeur est quantifié via une mesure de son absorbance optique à 260 nm.

4.2. Matériel et méthode

➤ Matériel

- Centricon YM-30 (**Millipore Corporation**, Bedford, USA)
- Trappeur amplifié par PCR (cfr : 2.2)
- Gel d'agarose 2 % (cfr : 3.2)
- Centrifugeuse (**Heraeus**, Germany)

➤ Méthode

- Déposer le trappeur (produit PCR) dans le réservoir du centricon (Fig 3.4).
- Centrifuger à 2500 rpm jusqu'à ce que le volume soit diminué de moitié (environ 5 à 6 minutes).
- Après avoir enlevé la fiole contenant le filtrat, retourner le réservoir afin que le trappeur se retrouve dans le capuchon (Fig 3.5).
- Centrifuger à 2500 rpm durant 3 minutes pour récupérer l'entièreté du produit PCR dans le capuchon.
- Placer le produit PCR concentré ainsi que le filtrat et l'étalon de poids moléculaire sur un gel d'agarose 2%.

5. Dosage de l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription en plaque multipuits

Après avoir fixé le trappeur biotinylé, comportant la séquence consensus du facteur de transcription, sur la plaque 96 puits coatée à la streptavidine, on réalise un dosage de l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription étudié.

5.1. Coating d'une plaque 96 puits avec le trappeur biotinylé

➤ Matériel

- plaque 96 puits coatée à la streptavidine (**Roche**, Mannheim, Germany)
- film plastique autocollant
- PBS
- PBS 50 (tampon phosphate 10 mM; pH 7.4; NaCl 0.3 %)
- tween 20 (**Sigma**, Saint-Louis, USA)
- trappeurs biotinylés contenant la séquence consensus du facteur de transcription MyoD (cfr : 2.2)

➤ Méthode

Disposer 50 µl d'une concentration finale de trappeurs de 4 pmoles / 50 µl, dilué dans du PBS, dans chaque puits. Recouvrir d'un film autocollant et incuber 1 heure à 37°C avant de laver deux fois les puits avec 100 µl de PBS 50 + tween 20 0.1%.

Un deuxième lavage est réalisé avec 200 µl d'eau distillée, les puits seront finalement séchés à 37°C avant d'être placés en chambre froide jusqu'au dosage proprement dit.

-Dosage au Picogreen

Ce dosage est effectué dans le but d'une quantification du trappeur réellement fixé sur les puits. A partir d'une courbe d'étalonnage il sera possible de retrouver cette quantité et l'on fait ça pour chaque trappeur.

➤ Matériel

- strips de plaques streptavidine fixées avec le trappeur (puits-test)
- strips de plaques streptavidine vierges (c'est-à-dire sans trappeur)
- trappeur biotinylé ayant servi à coater la plaque 96 puits
- tampon TE : tampon Tris 10 mM (**Merck**, Darmstadt, Germany) EDTA 1 mM (Titriplex, **Merck**, Darmstadt, Germany) pH 7.5 autoclavé.
- Picogreen : Molecular Probe (n°de cat. : P-7589, L : 4951-49)
- Fluostar : lecteur de plaque en fluorescence (FLUO star, **BMG Lab Technologies**, Offenburg, Germany)

➤ Méthode

- Préparation de la courbe d'étalonnage

Effectuer la première dilution de manière à avoir 400 µl d'une solution à 4 pmoles de Trappeur / 50 µl de tampon TE (= dilution A).

Dilutions suivantes :

- 2 pmoles / 50 µl : 100 µl de la dilution A + 100 µl de Tp TE
- 1 pmoles / 50 µl : 50 µl de la dilution A + 150 µl Tp TE
- 0.5 pmoles / 50 µl : 25 µl de la dilution A + 175 µl Tp TE
- 0.25 pmoles / 50 µl : 12.5 µl de la dilution A + 187.5 µl Tp TE

Dispenser 3 x 50 µl de chaque dilution dans les puits vierges.

- Dosage

- Dispenser 50 µl de tampon TE dans tous les puits test.
- Dispenser 50 µl de Picogreen dilué 100 x dans tous les puits (test + étalonnage) et emballer les strips dans du papier aluminium, à l'abri de la lumière.

- Pour terminer, lire la fluorescence au fluostar (λ d'excitation = 480nm ; λ d'émission = 530nm).

Les moyennes des valeurs de chaque concentration, pour les puits vierges, vont servir à tracer une droite d'étalonnage dont l'équation va permettre de déterminer la quantité de trappeur fixé dans les puits test.

5.2. Détection de l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription en plaque 96 puits

➤ Matériel

- tampon de lyse : 500 μ l Re (cfr : 1.2) ; 500 μ l Sa (cfr : 1.2) ; 40 μ l PIC (cfr : 1.2) ; 40 μ l PIB (cfr : 1.2) ; 1 μ l DTT 1 M (Dithiotréitol, **Sigma**, Saint-Louis, USA)
- tampon de liaison : tampon de binding MyoD (2 x ; pH 7.8) de composition :
 - 20 mM Hepes 99 % (**Acros Organic**, New Jersey, USA)
 - 100 mM KCl (**Merck**, Darmstadt, Germany)
 - 10 mM MgCl₂ (**Merck**, Darmstadt, Germany)
 - 2 mM EDTA (**Merck**, Darmstadt, Germany)
 - glycérol 10 % (**Merck**, Darmstadt, Germany)
- strips de plaques streptavidine fixés avec le trappeur (cfr : 5.1)
- PBS
- tween 20 (**Sigma**, Saint-Louis, USA)
- PBS 50 (tampon phosphate 10 mM; pH 7.4; NaCl 0.3 %)
- gloria (**Nestle**, Belgique)
- BSA (100K1355, **Sigma**, Saint-Louis, USA)
- extraits nucléaires (cfr : 1.2)
- Anticorps anti-MyoD: anticorps polyclonal de lapin dirigé contre l'entièreté de la protéine (M-318, SC-760, n°lot : C071, **Santa Cruz**)
- Anticorps anti-Myogénine: anticorps polyclonal de souris dirigé contre les résidus 138 à 158 de la protéine (556358, n°lot : M051586, **PharMingen**, USA)

- Anticorps anti-Myf5 : anticorps polyclonal de lapin dirigé contre l'extrémité C-terminale de la protéine (C-20, SC-302, n°lot : D242, **Santa Cruz**)
- Anticorps anti-Myf6 : anticorps polyclonal de lapin dirigé contre l'entièreté de la protéine (242, SC-784, n°lot : C151, **Santa Cruz**)
- Anticorps anti-E47 : anticorps polyclonal de lapin dirigé contre l'extrémité C-terminale de la protéine (V-18, SC-349, n°lot : E091, **Santa Cruz**)
- Anticorps anti-MEF2 : anticorps polyclonal de lapin dirigé contre l'extrémité N-terminale de la protéine (H-300, SC-10794, n°lot : B211, **Santa Cruz**)
- Anticorps anti-p300 : anticorps polyclonal de lapin dirigé contre l'extrémité N-terminale de la protéine (N-15, SC-584, n°lot : B082, **Santa Cruz**)
- Anticorps anti-CBP : anticorps polyclonal de lapin dirigé contre le domaine de liaison à CREB (451, SC-1211, n°lot : J310, **Santa Cruz**)
- Anticorps secondaire: conjugué anti-lapin/HRP (Horse Radish Peroxidase) (SC-2054, n°lot : G271, **Santa Cruz**)
- Anticorps secondaire: conjugué anti-souris/HRP (Horse Radish Peroxidase) (SC-2055, n°lot : F221, **Santa Cruz**)
- TMB : Tetra-Methyl Benzidine (**Biosource europe**, Belgique)
- Solution stop : H₂SO₄ (**Biosource europe**, Belgique)
- Lecteur de plaques multipuits (Ultramark, Microplate Imaging System, **Biorad**, Munich, Germany)

➤ Méthode

- Liaison du facteur de transcription à sa séquence consensus

Préparer les extraits nucléaires, dilués au moyen du tampon de lyse, à une concentration finale de 5 µg/10 µl.

Dispenser 40 µl de tampon de liaison 1x par puits et soit 10 µl d'extraits protéiques pour les puits « tests », soit 10 µl de tampon de lyse pour les « blancs » et recouvrir d'un film autocollant. Incuber 1 heure, à température ambiante, sous légère agitation.

Laver les puits 3 x 2 minutes avec 200 µl de PBS + tween 20 0.1 %.

- Fixation de l'anticorps primaire

Diluer 500 x l'anticorps primaire dans le PBS 50 + BSA 1 %.

Dispenser 100 µl de cette dilution par puits et recouvrir d'un film autocollant.

Incuber 1 heure à température ambiante avant de laver les puits 3 x 2 minutes avec 200 µl de PBS + tween 20 0,1 %.

- Fixation du conjugué anticorps anti-lapin/peroxydase

Diluer 1000 x l'anticorps secondaire dans le PBS 50 + gloria 1 % et dispenser 100 µl de cette dilution par puits. Recouvrir d'un film autocollant et incuber 1 heure à température ambiante avant de laver les puits 4 x 2 minutes avec 200 µl de PBS + tween 20 0,1 %.

- Révélation

Dispenser 100 µl de TMB par puits et incuber 10 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière (dans papier aluminium).

Dispenser 100 µl de solution stop par puits et lire la densité optique à 450 nm.

6. EMSA

6.1. Principe

La technique de l'EMSA (electrophoretic mobility shift assay) ou retard sur gel permet l'étude de protéines se liant à l'ADN. Cette méthode est basée sur la capacité d'une protéine à se lier *in vitro* à un fragment d'ADN double brin, marqué avec un isotope radioactif, suivie d'une séparation des complexes ADN-protéine et de la sonde libre par électrophorèse sur gel de polyacrylamide non-dénaturant.

Durant l'électrophorèse, les fragments d'ADN libres migrent plus rapidement que ceux liés à une protéine. Ceci résulte en l'apparition d'une bande retardée (« retard sur gel ») sur l'autoradiographie détectant les sondes marquées. Une détermination précise du poids moléculaire d'une protéine se liant à l'ADN n'est toutefois pas possible sur ce type de gel.

Afin de montrer la spécificité de l'interaction, on réalise soit une compétition avec la même sonde, mais cette fois non marquée, soit un *supershift*. Ceci va conduire à une

réduction d'intensité ou à une disparition de la bande retardée, ce qui démontre bien la spécificité de la reconnaissance.

La technique requiert plusieurs étapes : un oligonucléotide radioactif contenant la séquence consensus d'un facteur de transcription est incubé en présence d'un extrait cellulaire avant d'être déposé sur un gel d'électrophorèse. Si la protéine active est présente dans l'extrait cellulaire, elle se lie à l'ADN marqué, et la migration du complexe ADN-protéine formé sera retardée par rapport à la migration de la sonde libre.

6.2. Hybridation des oligonucléotides MyoD

Les sondes utilisées pour les EMSA sont préparées par hybridation d'oligonucléotides, sens et anti-sens, via un programme PCR.

➤ Matériel

- Primers 200 μ M
 - MyoD sens : n° 822714, **Eurogenetec**, Belgique :
5'-GCC-CCA-ACA-CCT-GCT-GCC-TGA-G-3'
 - MyoD anti-sens : n° 878389, **Eurogenetec**, Belgique :
5'-CTC-AGG-CAG-CAG-GTG-TTG-GGG-C-3'
 - MyoD muté sens : n° 822718, **Eurogenetec**, Belgique :
5'-GCC-CCA-ATC-CCG-ACT-GCC-TGA-G-3'
 - MyoD muté anti-sens : n° 822719, **Eurogenetec**, Belgique :
5'-CTC-AGG-CAG-TCG-GGA-TTG-GGG-C-3'
- Tampon 10x (Tris 500 mM, MgCl₂ 100 mM, pH 7,6)
- Tubes PCR de 200 μ l : MicroAmp Reaction tube with cap (**Perkin Elmer**, USA)
- Appareil PCR : GeneAmp PCR System 9600 (**Perkin Elmer**, USA)

➤ Méthode

La première étape consiste à préparer le mélange suivant :

- Tampon 1x
- 20 μ M de chaque amorce
- Ajuster le volume à 50 μ l avec de l'eau distillée

La seconde étape consiste à lancer le programme d'hybridation :

- 2 minutes à 85°C
- 2 cycles avec + 15 minutes à 65°C
+ 15 minutes à 37°C
+ 15 minutes à 22°C

6.3. Marquage de la sonde

La sonde est marquée avec du phosphore radioactif (^{32}P), qui émet un rayonnement γ capable d'imprimer un film autoradiographique ; ceci permet donc de détecter sa position sur le gel après migration. Cet atome radioactif est présent dans le dernier groupement phosphate d'une molécule d'ATP, et est transféré à la sonde par phosphorylation de ses extrémités 5' grâce une polynucléotide kinase (PNK).

Après marquage, la sonde est purifiée sur une colonne à tamis moléculaire de manière à éliminer le [γ - ^{32}P] ATP non consommé par la kinase. Ce type de colonne permet la récupération de la sonde dans les premières fractions, alors que l'ATP radioactif est retenu plus longtemps en raison de sa petite taille.

➤ Matériel

- Kinase buffer 10 x et T4 polynucléotide kinase 5U/ μ l (**Promega**, Madison, USA)
- Gamma ATP ^{32}P (**Perkin Elmer**, USA)
- Sonde à marquer (cfr : 6.2)
- EDTA 0,25 M pH8 autoclavé (**Merck**, Darmstadt, Germany)

- Quick spin colonne : Sephadex G-25 (**Roche**, Mannheim, Germany)
- centrifugeuse (**Jouan** B3.11, Germany)
- Aqualuma (**Lumac**, Pays-Bas)
- Compteur à scintillations (**Packard**, Downers Grove, USA)

➤ Méthode

Mixture réactionnelle : - 1 μ l de la sonde à marquer

- 1 μ l de tampon de réaction
- 2 μ l d'enzyme T4 polynucléotide kinase
- 1 μ l ATP 32 P
- 5 μ l H₂O

Après avoir chauffé un bain à 37°C et décongelé le [32 P] ATP, la mixture réactionnelle est préparée dans un microtube et incubée durant 30 minutes à 37°C. A la fin de l'incubation, la réaction est stoppée en ajoutant 2 μ l d'EDTA. Ensuite la sonde est purifiée sur spin colonne.

La sonde consensus, liant les facteurs de la famille MyoD, à la séquence suivante :

5'-GCC-CCA-ACA-CCT-GCT-GCC-TGA-G-3'
3'-CGG-GGT-TGT-GGA-CGA-CGG-ACT-C-5'

Les nucléotide en gras correspondent à la séquence consensus minimale de reconnaissance de ces facteurs.

Dans certaines expériences, nous avons utilisé une sonde mutée et non reconnue par les facteurs, dérivé de celle mentionnée ci-dessus, mais présentant une substitution de 4 paires de bases au niveau du site consensus de liaison à MyoD :

5'-GCC-CCA-ATC-CCG-ACT-GCC-TGA-G-3'
3'-CGG-GGT-TAG-GGC-TGA-CGG-ACT-C-5'

Protocole de purification sur spin colonnes :

La colonne est placée dans un tube de 10 ml, puis tassée par une centrifugation de 2 minutes à 2400 rpm. A ce moment, l'échantillon auquel on a ajouté 10 μ l d'eau distillée est déposé au centre de la colonne et on procède à une nouvelle centrifugation de 2 minutes à 2400 rpm avant de récolter l'éluat. La dernière opération va être répétée 7 fois. Il s'agit de déposer 40 μ l d'eau au centre de la colonne et de centrifuger pendant 2 minutes à 2400 rpm en récoltant l'éluat à chaque fois.

Un échantillon de chaque fraction récupérée après purification sur spin colonne est placé dans un compteur à scintillations à raison de 1 μ l de chaque fraction mélangée à 5 ml de liquide scintillant (Aqualuma). Ceci permet d'évaluer la radioactivité présente dans chacune des fractions qui contiennent la sonde marquée, ces fractions étant rassemblées et les autres écartées. Il est conseillé d'utiliser la sonde oligonucléotidique assez rapidement après son marquage car la durée de demi-vie du ^{32}P n'est que de 14 jours.

Le profil de purification obtenu lors du marquage de la sonde contenant la séquence consensus des facteurs myogéniques est montré à la figure 3.6. Ce profil nous permet de déterminer la fraction contenant la sonde marquée qui nous intéresse (dans notre cas il s'agit de la fraction 2). L'ATP radioactif libre sort quant à lui dans une fraction plus tardive non montrée sur la figure 3.6.

6.4. Liaison sonde-protéine

➤ Matériel

- Tampon de liaison : tampon de binding MyoD 2 x (cfr : 5.2)
- Tampon de lyse (cfr : 5.2)
- Sonde marquée (cfr : 6.3)
- Extraits protéiques (cfr : 1.2)

➤ Méthode

Pour chaque échantillon, nous prélevons un volume d'extraits cellulaires correspondant à la quantité de protéines désirée (20 µg, 15 µg, 10 µg, 5 µg ou 1 µg), puis nous homogénéisons les volumes des différents échantillons (pour avoir 10 µl) en ajoutant du tampon de lyse. A ce mélange, nous ajoutons 40 µl de tampon de liaison 1 x afin de conserver le rapport 40/10.

Si l'on veut réaliser un *supershift* on ajoute aussi 4 µl d'anticorps (anti-MyoD, SC-760, n°lot : C071, **Santa Cruz**) dirigé contre la protéine que l'on veut détecter, avec les extraits protéiques et cela 20 minutes avant de mettre la sonde radioactive. En plus des échantillons, nous réalisons un blanc qui contient, en plus du rapport tampon de liaison-tampon de lyse 40/10, 1 µl de bleu de bromophénol. Ce dernier nous permettra de visualiser le front de migration du gel.

Nous ajoutons à chaque microtube 1 µl de sonde radioactive (un volume équivalent à 100.000 cpm) en excès, puis nous laissons incuber 20 minutes à température ambiante avant de charger les différents échantillons sur un gel d'électrophorèse.

6.5. Gel d'électrophorèse

Il s'agit d'un gel de polyacrylamide 4 % qui est natif, c'est-à-dire sans SDS, afin de ne pas dénaturer les protéines présentes dans nos extraits cellulaires. En effet, il faut que les protéines gardent leur conformation native pour pouvoir se fixer à leur séquence consensus sur la sonde.

➤ Matériel

- Tampon d'électrophorèse (TBE 10 x) (**Gibco BRL**, Paisley, Grande-Bretagne) (cfr : 3.2 pour la composition)
- Acrylamide 30 % / bisacrylamide 0.8 % (**Bio-Rad**, , Munich, Allemagne)
- Temed (N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylènediamine; **Pharmacia**, Sweden)

- APS (Ammonium peroxodisulphate; **Pharmacia**, Sweden)
- Papier Whatman (**Macherey-Nagel**, Allemagne)

➤ Méthode

Composition du gel d'électrophorèse (pour 50 ml) :

- 7 ml d'Acrylamide 30 % / bisacrylamide 0.8 %
- 2.5 ml de tampon d'électrophorèse 10 x
- 40.33 ml eau distillée
- 150 µl d'une solution d'APS 20 %
- 25 µl de Temed

Après avoir coulé et laissé polymériser le gel pendant environ 1 heure, on le place dans la cuve d'électrophorèse (V15-17, **Life Technologies**, Paisley, Grande-Bretagne) avec le tampon TBE 0.5 % et un pré-run est réalisé durant 1 h 30 à 100 Volts. La migration, qui fait suite au dépôt des échantillons dans le gel, se déroule à 200 Volts et dure environ 1 h 30, jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne le bas du gel.

Le gel est alors démoulé et placé entre un papier Whatman d'un côté et un papier Cellophane de l'autre avant d'être séché pendant 45 minutes sous vide à 80°C. A ce moment, on expose un film autoradiographique sur le gel pendant 4 à 5 jours avant de pouvoir le révéler.

6.6. Révélation

➤ Matériel

- Film autoradiographique : Hyperfilms MP (**Amersham**, Grande-Bretagne)
- Révélateur (**Ilford 2000 RT**, Ilford, Grande-Bretagne)
- Fixateur (**Ilford 2000 RT**, Ilford, Grande-Bretagne)

➤ Méthode

Après exposition, le film est plongé quelques minutes (maximum 3 minutes) dans la solution de révélation puis lavé à l'eau distillée avant d'être fixé quelques minutes dans une solution de fixateur. Le film est ensuite rincé à l'eau pour éliminer toute trace de fixateur avant d'être séché à l'air libre .

7. Western blotting

7.1. Principe

Les extraits protéiques, préparés à partir de lysats cellulaires, sont chargés sur un gel de polyacrylamide de pourcentage déterminé et soumis à une différence de potentiel qui va entraîner leur migration dans le gel. La séparation s'effectue selon le poids moléculaire des protéines. Un marqueur de poids moléculaire coloré, contenant un mélange de protéines de poids moléculaire connu, est utilisé afin de vérifier la taille de la protéine recherchée. Ces protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (Polyvinylidene fluoride), tout en respectant leurs positions relatives. Il est alors possible, après traitement destiné à limiter la fixation non spécifique des anticorps sur la membrane, de détecter la position de la protéine d'intérêt à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'un de ses épitopes.

Dans un deuxième temps, un anticorps secondaire reconnaissant les fragments Fc de l'anticorps primaire est ajouté. Cet anticorps secondaire est conjugué à une peroxydase issue du raifort, la HRP (*horse radish peroxydase*). Enfin, l'étape de révélation se fait en présence du substrat de l'enzyme (H_2O_2) et de luminol qui va permettre l'émission de photons capables d'imprimer un film autoradiographique.

7.2. Préparation des échantillons

➤ Matériel

- Lysats cellulaires provenant de différentes conditions de culture (cfr : 1.2)
- Tampon de lyse (cfr : 1.2)
- Sample buffer 5x de composition : 0.5 M Tris pH 6,8 ; 20 % SDS ; 20 % glycérol ; 1 % bleu de bromophénol ; 20 % bromo-mercaptoéthanol
- Etalon de poids moléculaire (SeeBlue Plus2, **Invitrogen**, USA)

➤ Méthode

Un volume de lysat cellulaire correspondant à la quantité de protéines désirées (20 µg) est prélevé et porté à 20 µl avec du tampon de lyse. On ajoute ensuite 5 µl de *sample buffer 5x* à ces 20 µl. Les échantillons sont alors portés à 100 °C pendant 3 minutes et centrifugés 30 secondes à 13000 rpm avant d'être chargés dans les puits du gel. Dans un des puits, on ajoute 10 µl d'étalon de poids moléculaire afin d'estimer le poids moléculaire de la protéine d'intérêt.

7.3. Préparation du gel et migration

La migration se fait successivement dans deux gels de composition différentes : le premier (*stacking gel*) va concentrer les protéines qui seront ensuite séparées en fonction de leur poids moléculaire dans le second (*running gel*). Dans notre manipulation, nous avons utilisé un gel NuPage (« mini-gel ») qui est pré-coulé et qui contient les deux gels précédents.

La concentration du gel de séparation est fonction du poids moléculaire de la protéine d'intérêt. Le pourcentage d'acrylamide choisi sera d'autant plus élevé que le poids moléculaire de la protéine est faible.

➤ Matériel

- Gel 4-12 % Bis-Tris Gel (Nu Page ; **Invitrogen**, USA)
- Running buffer 20 x (Nu Page MOPS SDS; **Invitrogen**, USA)
- Antioxydant (Nu Page ; **Invitrogen**, USA)
- Cuve d'électrophorèse (Novex Mini-Cell ; **Invitrogen**, USA)

➤ Méthode

Après chargement des différents échantillons et de l'étalon de poids moléculaire dans les puits, la migration se fait dans du tampon de migration ou *running buffer 1x* contenant 0,25 % d'antioxydant. Le reste de la cuve étant rempli avec du tampon de migration 1x. Les échantillons migrent 50 minutes dans le gel sous un voltage constant de 200 Volts.

7.4. Transfert sur membrane de PVDF

➤ Matériel

- Membrane de PVDF (Polyvinylidene fluoride; Hybond-P ; **Amersham**, Grande-Bretagne)
- Transfert buffer 20 x (Nu Page ; **Invitrogen**, USA)
- Antioxydant (Nu Page; **Invitrogen**, USA)
- Méthanol (**Acros Organics**, Belgique)
- Papiers Whatman (**Macherey-Nagel**, Allemagne)
- Cuve de transfert (Novex Mini-Cell ; **Invitrogen**, USA)

➤ Méthode

Cette étape de « blotting » se déroule dans un tampon de transfert 1 x contenant 20 % de méthanol ainsi que 0.1 % d'antioxydant.

Une fois la migration terminée, le gel est démoulé et déposé sur une membrane PVDF dans un assemblage selon une disposition en « sandwich ». Le tout est placé dans une cuve de transfert dans laquelle deux électrodes enserrant le montage suivant : la membrane (vers l'anode) et le gel (vers la cathode) sont placés entre deux papiers Whatman imbibés de tampon de transfert, puis entre deux éponges également imbibées (Fig 3.7).

Il faut veiller à éviter la formation de bulles d'air entre les différentes couches de ce montage. Un courant de 30 Volts est ensuite appliqué durant 2 heures pour permettre le transfert et la fixation des protéines (chargées négativement en présence de SDS) à la membrane.

7.5. Mise en présence de la membrane avec les anticorps et révélation

➤ Matériel

- Tampon TBS (Tris buffer saline) de composition : 2,4 g/l Tris ; 8 g/l NaCl ; pH 7.4.
- Tween 20 (**Sigma**, Saint-Louis, USA)
- Tampon TBS-T : TBS auquel on a ajouté 0,1 % de tween 20
- Gloria (**Nestle**, Belgique)
- Anticorps anti-MyoD: anticorps polyclonal de lapin dirigé contre l'entièreté de la protéine (M-318, SC-760, n°lot : C071, **Santa Cruz**)
- Anticorps anti-Myf6 : anticorps polyclonal de lapin dirigé contre l'entièreté de la protéine (242, SC-784, n°lot : C151, **Santa Cruz**)
- Anticorps anti-Myogénine: anticorps polyclonal de souris dirigé contre les résidus 138 à 158 de la protéine (556358, n°lot : M051586, **PharMingen**, USA)
- Anticorps secondaire anti-lapin-HRP (NA934V, n°lot :201949, **Amersham**, Grande-Bretagne)
- Anticorps secondaire anti-souris-HRP (NA931V, n°lot :201415, **Amersham**, Grande-Bretagne)

- Solution ECL (Western Lightning, **Perkin Elmer**, USA) contenant 50 % d'H₂O₂ et 50 % de luminol.
- Film autoradiographique : Hyperfilms ECL (**Amersham**, Grande-Bretagne)
- Révélateur (**Ilford 2000 RT**, Ilford, Grande-Bretagne)
- Fixateur (**Ilford 2000 RT**, Ilford, Grande-Bretagne)

➤ Méthode

Afin de saturer les sites de liaison non spécifique que pourraient reconnaître les anticorps primaires utilisés, la membrane est incubée 30 minutes sous agitation dans du TBS-T contenant 5 % de gloria.

Après cette étape de « *blocking* », les anticorps primaires sont dilués 500 x dans du TBS-T + gloria 5 % et mis en présence de la membrane pendant 1 heure à température ambiante. Pour détecter la protéine MyoD et Myf-6, nous disposons d'un anticorps de lapin tandis que la protéine Myogénine est reconnue par un anticorps de souris.

Suite à cette heure d'incubation avec les anticorps primaires, la membrane est rincée 3 x 5 minutes au TBS-T + gloria 5 % avant d'être incubée 45 minutes, à température ambiante, avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP dilué 2000 x dans du TBS-T + gloria 5 %. Les anticorps secondaires utilisés sont différents pour détecter MyoD (ainsi que Myf-6) et la myogénine ; le premier est un anti-lapin couplé à la peroxydase tandis que le second est un anti-souris couplé à la peroxydase.

Les derniers rinçages sont effectués 5 minutes dans différents tampons ; une fois dans du TBS-T + gloria 5 %, ensuite 3 fois dans du TBS-T et enfin une fois dans du TBS.

Pour terminer, on procède à la révélation de la membrane dans une solution d'ECL (Enhanced ChemoLuminescent) pendant 1 minute. En chambre noire, on expose un film autoradiographique sur la membrane, pendant des périodes variables, de manière à obtenir l'exposition souhaitée. Le film est révélé comme décrit au paragraphe 6.6.

Le but de ce travail est de mettre au point un dosage colorimétrique qui nous permettra de doser l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription myogéniques. Comme décrit précédemment, ce dosage est une alternative à l'EMSA en ce sens qu'il est beaucoup plus facile, plus rapide et surtout qu'il ne dépend pas d'isotopes radioactifs. La première étape de notre travail a été de mettre au point ce dosage et afin de tester son efficacité, nous l'avons comparé à la méthode de référence qui est l'EMSA.

1. Mise au point du dosage multipuits

Avant d'aborder les résultats proprement dit, nous allons rappeler les grandes étapes du dosage (se référer à la figure 1.13) : tout d'abord, les extraits nucléaires provenant de différentes conditions de culture sont incubés avec le trappeur immobilisé contenant la séquence consensus du facteur étudié. Suite à des étapes de lavages, la protéine éventuellement fixée sur sa séquence est reconnue par un anticorps primaire dirigé contre elle. Cet anticorps primaire sera reconnu par la suite par un anticorps secondaire couplé à une peroxydase (HRP : *horse radish peroxydase*) qui, en présence de son substrat, donnera un produit coloré.

Ce dosage s'effectue sur des plaques multipuits (96 puits) dans lesquelles il y a de la streptavidine, ce qui permet d'y fixer notre trappeur biotinylé à l'une de ses extrémités.

1.1. Première étape : le trappeur

1.1.1. Choix du trappeur

Le trappeur doit répondre à trois critères :

- ✓ Il doit contenir la séquence consensus du facteur étudié, en l'occurrence MyoD. Nous avons choisi la E-box contenue dans le *enhancer* du gène de la MCK (Muscle Creatine Kinase) (Puri *et al.*, 1997a).

5'-CTC-AGG-CAG-**CAG-GTG**-TTG-GGG-C-3'

E-box

- ✓ Cette séquence consensus doit être séparée du support solide, la plaque 96 puits, par un *spacer*. Ceci permet d'éviter les problèmes d'encombrement stérique qui gênerait la liaison du facteur de transcription à sa séquence-cible. La longueur de ce trappeur a été optimisée pour d'autres facteurs de transcription et doit se situer entre 70 et 200 bp.
- ✓ Le trappeur doit posséder une biotine à l'une de ses extrémités pour pouvoir se lier à la plaque multipuits tapissée de streptavidine. Cette biotine est introduite par PCR grâce à un primer biotinylé.

1.1.2. Amplification du trappeur

Description de l'expérience réalisée

A partir d'un plasmide contenant la séquence du trappeur (figure 4.1), nous avons réalisé une PCR, comme décrit au point 2.2 du matériel et méthodes, à l'aide de deux amorces. L'une d'entre elle est spécifique du facteur de transcription utilisé car elle contient la séquence consensus de ce facteur (primer 2 dans la figure 4.1), tandis que la seconde est spécifique du spacer et contient une biotine à son extrémité 5' (primer 1 dans la figure 4.1).

Après l'étape d'amplification ainsi qu'après concentration au centricon (décrit au point 4.2 du matériel et méthodes), le trappeur est déposé sur un gel d'agarose 2 % comme décrit au point 3.2 du matériel et méthodes. Ceci afin de visualiser à la fois que l'étape de PCR s'est bien déroulée et qu'il n'y a pas eu de perte de trappeur suite à sa concentration. Il est facile de détecter une perte de trappeur, lors de l'étape de concentration au centricon, en vérifiant la présence ou non du trappeur dans le filtrat après migration sur gel d'agarose.

Observations et conclusion

Comme le montre la figure 4.2 (A), nous avons bien amplifié le trappeur de 127 bp. Cette amplification est spécifique étant donné qu'il n'y a pas de bande contaminante dans les « blancs » et qu'il n'y a qu'une seule bande d'amplification, de taille attendue, dans le puits où le produit PCR a été déposé.

Suite à l'étape de concentration du trappeur par centricon (Fig 4.2 (B)), la bande spécifique à 127 bp est toujours présente et aucune perte de matériel n'est observée étant donné qu'aucune trace d'ADN n'est présente dans le filtrat.

Par la suite, nous allons donc pouvoir fixer ce trappeur dans les puits coatés à la streptavidine.

1.1.3. Fixation du trappeur sur les puits

Description de l'expérience réalisée

Une fois le trappeur amplifié et quantifié, il est fixé sur les puits coatés à la streptavidine comme décrit au point 5.1 de la section précédente. Après fixation, on quantifie le nombre de picomoles de trappeur fixé dans les puits en réalisant un dosage au picogreen. Le picogreen étant une molécule qui devient fluorescente lorsqu'elle s'intercale entre les brins d'ADN, par simple lecture de la fluorescence et suivant un étalonnage il est possible de déterminer la quantité de trappeur fixé par puits.

Observations et conclusion

Après avoir effectué une droite d'étalonnage du dosage au picogreen (Fig 4.3), il est aisé de retrouver la quantité de trappeur fixé dans les puits en se référant à la valeur de fluorescence obtenue dans les puits tests. Dans notre cas, 0.9 pmole de trappeur biotinylé ont été fixées par puits ce qui était approximativement la valeur attendue.

Une fois le trappeur MyoD fixé dans les puits, nous allons pouvoir mettre au point le dosage colorimétrique.

1.2. Deuxième étape : mise au point du dosage en tant que tel

Pour rappel, nous nous intéressons au facteur de transcription MyoD et plus particulièrement à son activité de liaison à l'ADN dans les myoblastes murins C₂C₁₂.

Des extractions nucléaires (voir point 1.2 du matériel et méthodes) ont été réalisées sur ces cellules afin de doser cette activité de liaison à l'ADN au cours de la différenciation myogénique. Des extractions de cellules C₂C₁₂ non confluentes (cellules contrôles) ainsi que des extractions de cellules confluentes (engagées dans le processus de différenciation) ont été effectuées et ce sont ces extraits protéiques qui ont servi à mettre le dosage colorimétrique au point. Par la suite, lorsque le dosage sera au point, nous utiliserons des extraits nucléaires supplémentaires provenant de cellules C₂C₁₂ différenciées en myotubes multinucléés. Deux extractions ont été réalisées sur les myotubes : la première après 4 jours de différenciation et la seconde après 10 jours. Rappelons que cette différenciation se déclenche en modifiant le milieu de culture des cellules qui atteignent la confluence : le milieu initial contenant 20 % de sérum de veau fœtal est remplacé par du milieu contenant 2 % de sérum de cheval.

Différents paramètres intervenant dans le dosage ont été optimisés (voir paragraphe 5.2 du matériel et méthodes) afin d'améliorer le signal d'absorbance obtenu. Les conditions testées ont été choisies suivant les expériences antérieures réalisées sur d'autres facteurs de transcription.

Nous avons tout d'abord comparé le tampon de liaison classique, utilisé dans la plupart des dosages sur puits, à un tampon que l'on appellera « tampon MyoD ». La composition de ce dernier (point 5.2 du matériel et méthodes) est extraite d'un article mentionnant une expérience de retard sur gel sur MyoD (Marshall *et al.*, 2001). La composition du tampon classique 10x est la suivante : 100 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 500 mM NaCl et 40 % glycérol. Le tampon MyoD donnant un meilleur signal que le tampon classique, il sera utilisé dans la suite des résultats.

Parmi les différents paramètres testés pour optimiser le dosage, nous en développerons un à titre d'exemple, le contenu en DTT du tampon de liaison, et nous résumerons les autres paramètres sous forme d'une table récapitulative.

Lors de l'optimisation des conditions de liaison du facteur de transcription à sa séquence consensus, nous essayons de mimer les conditions naturelles dans lesquelles se trouve la protéine au niveau du noyau. Comme le noyau est connu pour être un environnement réducteur, un des paramètres testés est la concentration en DTT (dithiothréitol), un agent réducteur, dans le milieu de liaison. L'expérience acquise au laboratoire indique que les conditions rédox influencent fortement l'activité de liaison à l'ADN de certains facteurs (NF κ B, CREB, p53) et pas du tout celle d'autres facteurs (HIF-1 α , PPAR α), dans le type de dosage que nous développons.

Description de l'expérience réalisée

Différentes concentrations en DTT sont ajoutées au tampon de liaison et un dosage classique de l'activation de MyoD est réalisé comme décrit au point 5.2 du matériel et méthodes.

Observations et conclusion

En observant la figure 4.4, on remarque que le DTT n'a pas vraiment d'effet sur la liaison de MyoD à sa séquence consensus. Par comparaison, l'exemple du facteur p53 est montré à la figure 4.5. Comme on peut le constater, ce dernier est fortement dépendant de la présence en DTT, ce qui signifie que ce facteur nécessite des conditions réductrices afin de se lier de manière optimale à l'ADN.

On peut donc en conclure que, dans le type de dosage que nous développons, certains facteurs de transcription sont plus dépendant que d'autres des conditions réductrices du point de vue de leur liaison à l'ADN. Signalons que, *in vivo*, outre le fait que le milieu cellulaire est réducteur (Deneke *et al.*, 1989), il existe des enzymes nucléaires telles que Ref-1 qui réduisent certaines cystéines de facteurs de transcription comme AP-1 (Xanthoudakis *et al.*, 1992) et NF κ B (Mitomo *et al.*, 1994), ce qui augmente fortement l'activité de liaison à l'ADN de ces facteurs.

Par la suite, d'autres paramètres ont été testés comme le rapport tampon de liaison / tampon de lyse par puits (en μ l), la durée d'incubation des extraits en présence du trappeur, le choix de l'anticorps primaire utilisé ainsi que le tampon de dilution de cet anticorps en

présence ou non d'un agent bloquant. L'agent bloquant étant nécessaire pour minimiser le bruit de fond correspondant à une fixation non-spécifique de l'anticorps. Les résultats obtenus pour ces différents paramètres sont résumés dans la table 4.1.

L'optimisation de ces différents paramètres nous a permis de mettre au point un dosage de l'activité de liaison à l'ADN de MyoD. Ce dosage donne une absorbance de 0,4 pour 5 µg d'extraits nucléaires provenant de myoblastes en prolifération et une absorbance de 1,5 pour les cellules confluentes, ce qui constitue l'étape de différenciation où MyoD doit avoir une activité maximale (voir point 3.4 de l'introduction).

Avant d'utiliser ce dosage pour étudier le processus de différenciation musculaire, nous devons vérifier sa spécificité et déterminer sa sensibilité vis-à-vis de la méthode de référence qui est l'EMSA.

2. Validation du dosage

2.1. Spécificité du dosage

Dans la technique de retard sur gel, il existe deux façons de déterminer si une interaction protéine-ADN est spécifique :

- ✓ Réaliser un *supershift* : cela consiste à incuber le lysat cellulaire avec la sonde oligonucléotidique marquée et un anticorps dirigé spécifiquement contre le facteur de transcription. La bande retardée spécifique du complexe ADN / facteur de transcription doit voir sa migration ralentie puisqu'il y a formation d'un complexe ADN / facteur de transcription / anticorps.

- ✓ Réaliser une compétition avec des oligonucléotides non radioactifs en excès contenant soit la séquence consensus sauvage (*wild type* : *wt*) du facteur de transcription (même séquence pour les oligonucléotides radioactifs et non radioactifs), soit une séquence mutée non reconnue par le facteur de transcription. La bande spécifique du complexe ADN / facteur de transcription doit s'éteindre en présence de l'oligonucléotide *wt* et pas en présence de l'oligonucléotide muté.

Dans notre dosage sur puits, nous réalisons l'équivalent d'un *supershift* puisque la liaison du facteur à l'ADN est détectée par un anticorps spécifique de ce facteur de transcription. Le seul moyen de tester la spécificité du dosage consiste donc à réaliser des expériences de compétition avec des excès de sondes *wt* ou mutée non biotinylées. Ici aussi, le signal colorimétrique, s'il est spécifique, doit s'éteindre en présence de sonde *wt* non biotinylée, puisque les complexes facteur de transcription / sonde *wt* seront éliminés au cours des lavages. Par contre, un excès de sonde mutée ne doit pas interférer avec la liaison du facteur de transcription sur le trappeur.

Description de l'expérience réalisée

La technique consiste à ajouter au tampon de liaison l'excès de sonde mutée ou *wt* (un excès 1 x correspond à 0.9 pmole de sonde). La séquence de ces sondes est donnée au point 6.3 de la partie matériel et méthodes. Suite à cela, les extraits (5 µg / puits) sont incubés normalement avec le trappeur et le reste de l'expérience se déroule comme un dosage classique (voir point 5.2 du matériel et méthodes).

Observations et conclusion

Le résultat du test de compétition sur puits montré à la figure 4.6 indique qu'une diminution de l'intensité du signal n'est observée qu'en présence d'un excès de sonde *wt* dans la réaction. Ceci montre bien la spécificité de l'interaction du facteur avec sa séquence étant donné qu'il se lie uniquement à la sonde *wt* et non à la sonde mutée.

Le dosage colorimétrique que nous avons mis au point étant spécifique, nous pouvons dès lors comparer sa sensibilité face à l'EMSA.

2.2. Comparaison de la sensibilité

2.2.1. Sensibilité de l'EMSA

La première expérience d'EMSA réalisée avec des extraits nucléaires de C₂C₁₂ confluentes a montré deux bandes retardées (expérience non montrée). Afin de déterminer laquelle correspond au complexe MyoD / ADN, nous avons réalisé un EMSA avec une compétition et un EMSA avec un *supershift*.

Description de l'expérience de spécificité réalisée

Lors de la compétition dans l'EMSA, différents excès en sonde *wt* sont ajoutés à la sonde radioactive avant d'incuber celle-ci avec 20 µg de protéines (provenant des cellules confluentes). Afin de réaliser un *supershift*, l'anticorps primaire dirigé contre MyoD a été mis en présence des extraits (20 µg) comme décrit au point 6.4 du matériel et méthodes.

Observations et conclusion

En analysant la figure 4.7, on observe deux bandes retardées dans la piste ne contenant pas d'oligonucléotide compétiteur (piste 5). La bande supérieure est la plus marquée et disparaît progressivement quand on ajoute l'oligonucléotide non-radioactif (comparer les pistes 1 à 4 avec la piste 5). Ceci suggère que cette bande correspond à la bande spécifique des facteurs myogéniques.

Une confirmation aurait pu être apportée par le *supershift*, mais ce dernier n'a pas fonctionné. En effet aucune variation d'intensité n'est observée en comparant le *supershift* avec la condition équivalente sans anticorps (Fig 4.8, comparer les pistes 5 et 6). Cela pourrait s'expliquer par une instabilité du complexe MyoD-sonde qui n'aurait pas résisté aux conditions de migration et donc ce complexe serait présent en faible proportion par rapport aux autres complexes formés par les autres facteurs myogéniques. Il serait donc intéressant de réaliser un supershift pour chaque facteur myogénique afin de trouver celui qui est responsable de la liaison à la sonde.

La sensibilité de l'EMSA a ensuite été déterminée en incubant des quantités croissantes de protéines en présence de la sonde radioactive.

Description de l'expérience de sensibilité réalisée

Les extraits nucléaires provenant des cellules contrôles étant trop peu concentrés, nous n'avons utilisé que les extraits cellulaires provenant des cellules confluentes et des myotubes (après 4 jours de différenciation). Une concentration protéique s'étallant de 1 à 20 μg a été chargée dans les différentes pistes du gel comme décrit au point 6.4 de la partie matériel et méthodes.

Observations et conclusion

La détermination de la sensibilité se fait en observant la limite de détection du signal à la fois pour les cellules confluentes et pour les myotubes. Sur les EMSA présentés aux figures 4.8 et 4.9, on constate que la limite de détection se situe aux alentours de 10 à 15 μg de protéines.

De plus, si on regarde à la fois les cellules confluentes et les myotubes, on s'aperçoit que l'intensité du signal diminue dans ces derniers. La sonde étant susceptible d'être reconnue par chacun des facteurs myogéniques, cela suggère qu'il y a plus de facteurs qui se lient à leur séquence dans les cellules confluentes que dans les myotubes. Théoriquement, il serait possible de déterminer précisément les facteurs impliqués dans cette liaison par la réalisation d'un *supershift* pour chaque facteur.

2.2.2. Sensibilité du test colorimétrique

Description de l'expérience réalisée

Différentes concentrations en extraits nucléaires (de 0.5 à 13 µg de protéines par puits) provenant de cellules C₂C₁₂ contrôles, confluentes et différenciées durant 4 jours en myotubes ont été incubées avec le trappeur biotinylé. Un dosage classique de l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription MyoD a été réalisé comme décrit au point 5.2 du matériel et méthodes.

Observations et conclusion

Si l'on regarde la sensibilité du test sur puits par rapport à l'EMSA (figure 4.10), on s'aperçoit que l'on détecte une plus faible concentration en protéines et donc que notre test est au moins 10 fois plus sensible. En effet, la limite de détection en EMSA était située aux alentours de 10 µg de protéines et dans le dosage sur puits, on parvient facilement à détecter 1 µg de protéines.

De plus, nous observons une variation dans l'activité de liaison à l'ADN du facteur MyoD, au cours de la différenciation. En effet, le signal est faible dans les contrôles, fort dans les confluentes et intermédiaire dans les myotubes. Ceci s'explique facilement par le fait que ce facteur est impliqué dans les toutes premières étapes de la différenciation myogénique ; il est donc normal que son activité de liaison à l'ADN soit plus importante dans les cellules confluentes. C'est en effet à ce moment que la différenciation des myoblastes en myotubes est enclenchée.

3. Utilisation du dosage pour étudier un processus de différenciation

Suite à la mise au point du dosage colorimétrique, nous allons utiliser celui-ci pour étudier les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation myogénique des myoblastes murins C₂C₁₂.

Comme nous en avons déjà discuté dans l'introduction, les facteurs de transcription myogéniques sont exprimés de manière séquentielle dans les cellules en différenciation. Nous allons étudier ce phénomène aussi bien au niveau des variations d'expression des différents MRFs qu'au niveau de leur activité de liaison à l'ADN. Pour ce faire, nous avons besoin de différentes conditions cellulaires qui représentent l'ensemble du processus de différenciation.

3.1. Modèle cellulaire

Dans notre travail nous avons utilisé différents extraits nucléaires (voir point 1.2 du matériel et méthodes) provenant des C₂C₁₂ afin de représenter au mieux l'ensemble du processus de différenciation. Nous avons besoin de cellules en prolifération et donc indifférenciées, de cellules atteignant la confluence et qui sont sur le point d'enclencher la différenciation, et de cellules différenciées.

C'est pourquoi nous avons réalisé plusieurs extractions nucléaires à ces différentes étapes. Ces extractions ont été faites sur des cellules non confluentes (approximativement 50 % de confluence : cellules CTL), sur des cellules confluentes et sur des cellules qui, à l'état de confluence ont été placées dans 2 % de sérum de cheval afin d'induire leur différenciation en myotubes. Ces derniers ont été extraits au début de leur différenciation (après 4 jours de différenciation) et à un stade plus avancé (après 10 jours de différenciation). Afin de visualiser les différentes conditions, des photos ont été prises et sont montrées à la figure 4.11.

3.2. Étude des facteurs myogéniques au cours de la différenciation musculaire en culture

D'après la littérature, nous savons que les facteurs de transcription MyoD et Myf-5 sont présents dans les étapes précoces de la différenciation tandis que la myogénine et Myf-6 sont exprimés plus tardivement. Nous allons donc voir ce qu'il en est dans notre modèle cellulaire en terme d'expression protéique (western blot) et d'activité de liaison à l'ADN (dosage sur puits).

3.2.1. Abondance des facteurs myogéniques au cours de la différenciation

L'abondance des facteurs de transcription myogéniques (MyoD, myogénine et Myf-6) va être analysée par la technique du western blot (voir point 7 du matériel et méthodes). Nous n'avons pas réalisé l'expérience pour Myf-5 étant donné que l'anticorps ne nous avait pas encore été fourni.

Description de l'expérience réalisée

Un volume d'extraits nucléaires correspondant à 20 µg de protéines a été chargé dans les puits d'un gel de polyacrylamide 12 % comme décrit au point 7.2 du matériel et méthodes. Les différents anticorps primaires et secondaires sont incubés avec la membrane avant d'effectuer la révélation. De plus, un contrôle de charge a été réalisé grâce à un anticorps anti-histone H1 afin de s'assurer que tous les puits ont reçu la même quantité de protéines.

Observations et conclusion

Les résultats du western blot sont montrés à la figure 4.12. Il faut tout d'abord noter qu'il y a eu un problème dans le puits correspondant aux myotubes 10 jours de différenciation (pour MyoD et la myogénine), car nous n'observons pas de bandes de migration bien nettes.

Nous observons que MyoD est faiblement exprimé dans les myoblastes en prolifération (CTL), et que son expression augmente quand les cellules atteignent la

confluence. Elle diminue ensuite dans les myotubes. Inversement, la myogénine n'est exprimée que dans les myotubes.

Ces profils correspondent à ce que l'on retrouve dans la littérature (voir point 3.3.3 de l'introduction) (Lassar *et al.*, 1994b). MyoD étant responsable du déclenchement de la différenciation, il est normal de le retrouver le plus abondamment dans les cellules confluentes étant donné qu'elles sont au terme de leur prolifération. Suite au déclenchement de la différenciation, MyoD va laisser la place à la myogénine, c'est ainsi que l'on observe une diminution de la protéine MyoD dans les myotubes alors que la myogénine apparaît uniquement dans ceux-ci. En effet, l'expression de la myogénine étant déclenchée notamment par l'association de MyoD avec les protéines E et MEF2, elle arrive donc plus tardivement.

En ce qui concerne la protéine Myf-6, nous ne sommes pas parvenus à mettre en évidence, avec certitude, la bande qui lui est spécifique. Ceci est peut-être dû à un manque de spécificité de l'anticorps, qui est un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine entière. Toutefois, dans la zone incriminée du gel (voir flèche fig 4.12) où devrait se situer Myf-6, il est possible de mettre en évidence des bandes dans les myotubes qui ne sont pas présentes dans les contrôles ou dans les confluentes. Une de ces bandes pourrait correspondre à notre protéine mais il faudrait réitérer l'expérience. Dans cette optique il faudrait augmenter le pourcentage en polyacrylamide du gel afin d'obtenir une meilleure séparation des protéines dans la zone étudiée.

3.2.2. Liaison des facteurs myogéniques à leur séquence consensus au cours de la différenciation

Nous avons utilisé notre test sur puits afin de détecter, au cours de la différenciation, l'activité de liaison à l'ADN des différents facteurs de transcription myogéniques. Cette expérience a été réalisée sur les quatre facteurs myogéniques : MyoD, la myogénine, Myf-5 et Myf-6.

Description de l'expérience réalisée

Nous avons incubé les différents extraits cellulaires avec le trappeur contenant la séquence consensus des facteurs myogéniques comme décrit au point 5.2 du matériel et méthodes. La détection des facteurs liés à l'ADN s'est faite par incubation avec les anticorps adéquats (anti-MyoD, myogénine, Myf-5 et Myf-6).

Observations et conclusion

Si nous analysons la figure 4.13, nous observons qu'à la fois MyoD et Myf-5 se fixent à l'ADN dans les étapes précoces de la différenciation tandis que la myogénine n'apparaît liée à l'ADN que dans les cellules différenciées. Ce résultat confirme donc bien ce que nous avons obtenu par western blot à la figure 4.12. En ce qui concerne Myf-5, nous n'avons pu réaliser le western blot par manque de temps, mais il n'est pas surprenant du tout que son activité de liaison à l'ADN soit maximale dans les cellules confluentes puisque, tout comme MyoD, c'est un facteur de transcription précoce de la différenciation (Brand-Saberi *et al.*, 1999).

On remarque qu'il n'y a pas de variation dans le signal correspondant à la protéine Myf-6 pour les différentes étapes de la différenciation. Cela pourrait s'expliquer par un problème de reconnaissance vis-à-vis de l'anticorps. Afin de tester cette hypothèse, on pourrait utiliser une protéine Myf-6 recombinante avec laquelle on réaliserait le dosage. Cela nous permettrait de savoir si le problème provient de l'anticorps. Dans le cas contraire, ça pourrait s'expliquer par un modèle d'étude non adéquat pour Myf-6 qui ne serait lié à sa séquence que dans une phase plus tardive de la différenciation.

Il est important de préciser qu'il ne faut pas comparer l'intensité du signal entre les différents facteurs de transcription. Il faut analyser chaque facteur séparément en regardant le profil obtenu et non comparer les dosages réalisés avec différents types d'anticorps. En effet, l'intensité du signal obtenu dépend de l'anticorps utilisé. Afin d'illustrer cela, nous avons comparé deux types d'anticorps reconnaissant MyoD (lors de la mise au point du dosage) et le résultat est présenté à la figure 4.14.

D'après les résultats obtenus en western blot et en puits, nous pouvons conclure qu'il y a une variation des facteurs myogéniques, aussi bien au niveau de leur expression que dans leur activité de liaison à l'ADN, au cours de la différenciation cellulaire.

Comme le dosage en multipuits produit, avec quatre fois moins de matériel, des résultats tout à fait comparables à ceux obtenus par western blot, et en accord avec la littérature, on pourrait utiliser ce dosage rapide et sensible pour suivre la progression vers la différenciation de cellules en culture et détecter une éventuelle dérive des myoblastes vers un stade différencié.

Nous voudrions maintenant déterminer si ce type de dosage peut être utilisé non seulement pour doser l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription, mais aussi pour identifier d'éventuelles interactions protéiques avec ces facteurs liés à l'ADN.

3.3. Détection de protéines partenaires interagissant avec les facteurs myogéniques

Comme décrit dans l'introduction sur les facteurs myogéniques (voir point 3.4), ceux-ci ont besoin d'hétérodimériser avec des protéines partenaires ubiquistes (les protéines E) afin d'activer la transcription de leurs gènes cibles. Les hétérodimères ainsi formés vont interagir avec des protéines de la famille MEF2.

De plus, l'activation de la transcription dépendante des MRFs ne peut se faire que quand ces facteurs se font acétyler par les coactivateurs généraux de la transcription (CBP/p300 et PCAF). En utilisant notre test sur puits, nous allons voir s'il est possible de détecter, en plus des facteurs de transcription fixés sur l'ADN, ces protéines partenaires.

Description de l'expérience réalisée

Un dosage en plaques multipuits des partenaires protéiques des facteurs de transcription myogéniques va être effectué, comme décrit au point 5.2 du matériel et méthodes, sur les extraits nucléaires provenant des cellules contrôles et confluentes. A cette fin, nous utilisons des anticorps contre les protéines E47, MEF2, CBP et p300. Un dosage

classique de MyoD est effectué en parallèle afin de contrôler le bon fonctionnement de l'expérience.

Observations et conclusion

Les résultats du dosage sont présentés à la figure 4.15. Tout d'abord, on remarque que le contrôle positif (dosage MyoD) est correct ce qui indique le bon fonctionnement de l'expérience.

En ce qui concerne E47 et MEF2, on observe une différence d'activité de liaison à l'ADN entre les cellules contrôles et confluentes. Cela peut s'expliquer facilement car, comme l'indique la figure 4.13, dans les cellules CTL très peu de facteurs myogéniques sont liés à l'ADN comparativement aux cellules confluentes. Comme les protéines E47 et MEF2 s'associent à ces facteurs (voir point 3.3.2 de l'introduction), on détecte beaucoup plus de E47 et MEF2 dans les cellules confluentes par rapport aux cellules contrôles. Ce résultat est très prometteur pour l'avenir étant donné que notre test colorimétrique permet de détecter des interactions protéiques de manière très facile et rapide sans avoir recours à des étapes supplémentaires de purification.

Par contre, si l'on regarde ce qui se passe pour les cofacteurs généraux de la transcription, CBP et p300, la tendance est inversée. En effet, il semblerait qu'il y ait plus de ces protéines liées dans les cellules contrôles que dans les cellules confluentes. Ces résultats ne sont donc pas cohérents avec les données de la littérature étant donné que les coactivateurs ne se lient à la E-box que par l'intermédiaire des facteurs myogéniques, on s'attendrait donc à observer un signal plus élevé dans les cellules confluentes par rapport aux contrôles (voir point 3.4.3 de l'introduction).

Toutefois, cette observation pourrait s'expliquer par la présence d'une autre protéine que MyoD qui se fixerait soit sur la E-box, soit sur une autre partie du trappeur et qui recruterait les protéines coactivatrices. Afin de vérifier cette hypothèse, on pourrait réaliser le dosage des cofacteurs sur un trappeur dépourvu de E-box et donc non reconnu par les facteurs myogéniques. En effet, si l'on détecte un signal pour les cofacteurs après avoir incubé les extraits de cellules contrôles et confluentes avec ce trappeur dépourvu de E-box, cela signifie que le signal ne dépend pas des facteurs myogéniques étant donné qu'ils ne sont pas capables

de s'y fixer (ceci serait évidemment contrôlé en effectuant une détection directe des facteurs myogéniques sur ce même trappeur).

En plus de détecter l'activité de liaison à l'ADN des facteurs myogéniques, notre test permet la détection de protéines leur étant associées comme E47 et MEF2. Toutefois, en ce qui concerne les coactivateurs généraux de la transcription, le résultat est beaucoup moins probant. Dans ce deuxième cas, il faudrait refaire des expériences afin de déterminer si le signal que l'on détecte dépend des facteurs myogéniques ou pas.

L'objectif principal de ce travail était de mettre au point une technique rapide, facile et sensible permettant de doser l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription myogéniques. Cet objectif a été atteint et nous avons montré que cette technique était beaucoup plus avantageuse que la méthode de référence qui est l'EMSA (ou retard sur gel). En effet, notre test est plus rapide, plus sensible et surtout plus facile. De plus, nous n'avons pas recours à des isotopes radioactifs et nous pouvons doser un grand nombre d'échantillons en parallèle étant donné que l'on utilise un format 96 puits.

Une fois notre test au point, nous l'avons utilisé pour étudier le processus de différenciation des myoblastes murins C₂C₁₂ en culture. Nous avons pu mettre en évidence une variation de l'activité de liaison à l'ADN des différents facteurs myogéniques au cours de la différenciation. De plus, ces variations se vérifient au niveau de l'expression des facteurs myogéniques (western blot). Nous avons ainsi pu déterminer que les facteurs impliqués dans les étapes précoces de la différenciation (MyoD et Myf5) avaient une activité de liaison à l'ADN plus importante dans les cellules confluentes tandis que la myogénine ne se lie à sa séquence consensus que dans les cellules différenciées en myotubes. Cela confirme les données de la littérature étant donné que ce sont les facteurs précoces qui, lorsqu'ils sont liés à leur séquence consensus, vont induire la différenciation via notamment l'induction des facteurs plus tardif comme la myogénine.

En plus d'étudier l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription myogéniques, nous nous sommes intéressés aux interactions protéiques entre ces facteurs et leurs protéines partenaires. Nous avons montré que notre test permettait aisément de détecter les protéines partenaires comme E47 et MEF2. Cela implique que, en plus d'être un bon outil pour étudier l'activité de liaison à l'ADN, ce test peut être utilisé pour étudier des interactions protéiques faisant intervenir un facteur de transcription lié à l'ADN.

Ceci constitue un progrès non négligeable. En effet, la principale méthode utilisée pour détecter des interactions protéiques avec un facteur de transcription est la coimmunoprécipitation (le double-hybride est déconseillé comme nous l'avons expliqué au point 2.3.3. de l'introduction). Cependant lorsque l'un des deux partenaires protéiques est peu abondant, ou les deux, on a souvent recours à la surexpression d'une ou de plusieurs protéines intervenant dans l'interaction, ce qui ne reflète pas toujours les conditions réelles de la cellule. De plus, la coimmunoprécipitation permet de détecter des interactions protéiques sans donner

d'informations sur l'état de liaison à l'ADN des facteurs de transcription. Le dosage colorimétrique sur puits, par contre, permet de mettre en évidence des interactions protéiques uniquement lorsque les facteurs de transcription sont liés à l'ADN. Les deux techniques, dosage sur puits et coimmunoprécipitation, fournissent donc des informations complémentaires et peuvent être utilisées de concert pour étudier en détail les mécanismes d'activation des facteurs de transcription. Jusqu'à présent, la seule technique qui permettait de fournir une information sur les interactions protéiques avec un facteur de transcription lié à l'ADN était le *supershift* en retard sur gel. L'équipe de Puri (Puri *et al.*, 1997a), par exemple, a mis en évidence par *supershift* une interaction CBP / MyoD en réalisant un retard sur gel avec un oligonucléotide marqué contenant une E-box, et un *supershift* avec des anticorps MyoD ou CBP. Néanmoins, les expériences de *supershift* demandent du doigté et leur réussite est aléatoire et très dépendante de la qualité des anticorps utilisés. Le dosage sur puits nous semble beaucoup plus facile à mettre en oeuvre.

Dans notre dosage, nous n'avons pas pu mettre en évidence avec certitude une interaction entre les facteurs myogéniques et les cofacteurs généraux de la transcription (CBP/p300). Étant donné que, suite à l'interaction avec ces cofacteurs, les facteurs myogéniques se font acétyler, nous avons essayé de détecter cette acétylation avec un anticorps spécifique. Nous n'avons pas pu tirer de conclusion à partir de cette expérience (résultat non montré) car cet anticorps (anti-acétyl lysine) se fixait de manière non-spécifique dans les puits (même les puits ne contenant pas d'extraits cellulaires étaient positifs). Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer cela : soit l'anticorps s'adsorbe sur le plastique, soit il se fixe sur la streptavidine qui posséderait des lysines acétylées pour une raison quelconque. Pour remédier à ce problème, nous pourrions tester d'autres anticorps ou d'autres agents bloquants (gloria, BSA, ovalbumine,...).

Toutefois cette approche mériterait d'être approfondie car le niveau d'acétylation des MRFs donne une idée de leur activité transactivatrice puisque la transcription dépendante de MyoD est fortement augmentée lorsque ces facteurs de transcription sont acétylés (Sartorelli *et al.*, 1999). Cette approche pourrait être validée en réalisant, à différents stades du processus de différenciation, des dosages sur puits avec un anticorps anti-acétyl lysine et des mesures d'activité transcriptionnelle par transfection de gènes rapporteurs.

Si cette perspective pouvait être menée à bien, cela signifie que ce dosage sur puits donnerait pour un même extrait cellulaire, une triple information:

- activité de liaison à l'ADN des MRFs
- interactions protéiques (MEF2 et E47)
- activité transactivatrice du facteur de transcription

Déjà dans l'état actuel de son développement, nous pourrions envisager d'utiliser notre test dans le cadre des processus de régénération du tissu musculaire à partir de cellules souches en culture. Parmi les pathologies affectant le tissu musculaire, on retrouve les dystrophies musculaires qui sont majoritairement représentées par la dystrophie musculaire de Duchenne. Dans cette dernière, le gène codant pour la dystrophine étant altéré, les myofibrilles perdent leur intégrité, ce qui conduit à un épuisement des cellules satellites qui sont continuellement sollicitées pour régénérer les myofibrilles. En vue d'aider la régénération, il est envisagé d'apporter des cellules souches exprimant le gène sauvage de la dystrophine pour suppléer aux cellules satellites dans leur travail de régénération.

La possibilité d'utiliser la circulation sanguine pour véhiculer de telles cellules jusqu'aux muscles malades ayant épuisé leurs capacités de régénération et pour ainsi participer à leur reconstruction, suscite de grands espoirs dans le domaine des thérapies cellulaires.

Parmi les cellules souches, celles qui nous intéressent le plus sont les cellules souches mésenchymateuses issues de la moëlle osseuse qui peuvent donner naissance, en réponse à des signaux de l'environnement, à des lignées cellulaires de type fibroblastes, ostéoblastes, chondroblastes, myoblastes ou adipoblastes (Pittenger *et al.*, 1999) et même de cardiomyocytes (Wang *et al.*, 2000) et de neurones (Woodbury *et al.*, 2000). Ces cellules souches mésenchymateuses sont des cellules pluripotentes qui, en fonction des signaux extracellulaires perçus et donc des facteurs de transcription qui y sont exprimés, vont donner naissance à un type cellulaire plutôt qu'à un autre. C'est ainsi que l'expression de MyoD induit la voie myoblastique et que celle de PPAR α (Peroxisome Proliferator Activated Receptor α) induit la différenciation adipocytaire (Marie, 2001).

Toutefois, le problème majeur des cellules mésenchymateuses est qu'elles sont pluripotentes et qu'il est nécessaire d'induire leur détermination dans la voie désirée sans

toutefois les différencier. Il est ainsi possible d'induire la voie myogénique en forçant l'expression de certains facteurs de transcription comme Pax7 (équivalent chez l'adulte de Pax3) dans les cellules utilisées ultérieurement pour la régénération (Seale *et al.*, 2001).

Dans ce but, il est donc important de détecter à quel moment les cellules peuvent faire l'objet d'une greffe. Il faudrait pouvoir amener le plus possible de cellules souches dans la voie désirée et pouvoir contrôler l'état de différenciation de ces cellules. C'est pourquoi il serait intéressant d'utiliser un test simple et sensible permettant de détecter les marqueurs de la différenciation. Par exemple, si l'on veut sélectionner les cellules qui sont engagées dans la voie myogénique afin de les réimplanter chez un patient, on pourrait le faire en dosant les facteurs myogéniques présents dans ces cellules. Il serait ainsi aisé de savoir si les cellules sont engagées ou non dans la voie de différenciation voulue et dans quel cas on pourrait les employer à usage thérapeutique.

- Alberts B., D. Bray *et al.*, *Essential Cell Biology*, Garland, 1998.
- Angrand P. O., *Les domaines de liaison de l'ADN des facteurs de transcription eucaryotes*, Médecine/Sciences, 9, 725-736, 1993.
- Arnold H. H. and T. Braun, *Targeted inactivation of myogenic factor genes reveals their role during mouse myogenesis: a review*, Int J Dev Biol, 40, 345-353, 1996.
- Bailey P., T. Holowacz *et al.*, *The origin of skeletal muscle stem cells in the embryo and the adult*, Curr Opin Cell Biol, 13, 679-689, 2001.
- Bannister A. J. and T. Kouzarides, *The CBP co-activator is a histone acetyltransferase*, Nature, 384, 641-643, 1996.
- Benezra R., R. L. Davis *et al.*, *The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins*, Cell, 61, 49-59, 1990.
- Black B. L., J. D. Molkenin *et al.*, *Multiple roles for the MyoD basic region in transmission of transcriptional activation signals and interaction with MEF2*, Mol Cell Biol, 18, 69-77, 1998.
- Brand-Saberi B. and B. Christ, *Genetic and epigenetic control of muscle development in vertebrates*, Cell Tissue Res, 296, 199-212, 1999.
- Brivanlou A. H. and J. E. Darnell, Jr., *Signal transduction and the control of gene expression*, Science, 295, 813-818, 2002.
- Chan H. M. and N. B. La Thangue, *p300/CBP proteins: HATs for transcriptional bridges and scaffolds*, J Cell Sci, 114, 2363-2373, 2001.
- Cuenda A. and P. Cohen, *Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis*, J Biol Chem, 274, 4341-4346, 1999.
- Dang C. V., J. Barrett *et al.*, *Intracellular leucine zipper interactions suggest c-Myc hetero-oligomerization*, Mol Cell Biol, 11, 954-962, 1991.
- Darnell J., H. Lodish *et al.*, *Molecular cell biology-3rd ed*, New York, Scientific American Books, 1995.
- Davis R. L., H. Weintraub *et al.*, *Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts*, Cell, 51, 987-1000, 1987.
- De Cesare D., G. M. Fimia *et al.*, *Signaling routes to CREM and CREB: plasticity in transcriptional activation*, Trends Biochem Sci, 24, 281-285, 1999.
- DeMayo F. J., B. Zhao *et al.*, *Mechanisms of action of estrogen and progesterone*, Ann N Y Acad Sci, 955, 48-59, 2002.
- Deneke S. M. and B. L. Fanburg, *Regulation of cellular glutathione*, Am J Physiol, 257, L163-173, 1989.

- Fields S. and O. Song, *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*, Nature, 340, 245-246, 1989.
- Filvaroff E. H. and R. Derynck, *Induction of myogenesis in mesenchymal cells by MyoD depends on their degree of differentiation*, Dev Biol, 178, 459-471, 1996.
- Florini J. R. and D. Z. Ewton, *Highly specific inhibition of IGF-I-stimulated differentiation by an antisense oligodeoxyribonucleotide to myogenin mRNA. No effects on other actions of IGF-T*, J Biol Chem, 265, 13435-13437, 1990.
- Ghosh S. and M. Karin, *Missing pieces in the NF-kappaB puzzle*, Cell, 109 Suppl, S81-96, 2002.
- Gilbert S. F., *Developmental Biology-6rd ed*, Sinauer, 454, 2000.
- Goodrich J. A. and R. Tjian, *TBP-TAF complexes: selectivity factors for eukaryotic transcription*, Curr Opin Cell Biol, 6, 403-409, 1994.
- Gredinger E., A. N. Gerber *et al.*, *Mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the differentiation of muscle cells*, J Biol Chem, 273, 10436-10444, 1998.
- Griffiths M., Susuki, Lewontin, Gelbart, *Introduction à l'analyse génétique*, De Boeck Université, 1997.
- Gu W., J. W. Schneider *et al.*, *Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation*, Cell, 72, 309-324, 1993.
- Guo K., J. Wang *et al.*, *MyoD-induced expression of p21 inhibits cyclin-dependent kinase activity upon myocyte terminal differentiation*, Mol Cell Biol, 15, 3823-3829, 1995.
- Hamamori Y., H. Y. Wu *et al.*, *The basic domain of myogenic basic helix-loop-helix (bHLH) proteins is the novel target for direct inhibition by another bHLH protein, Twist*, Mol Cell Biol, 17, 6563-6573, 1997.
- Hampsey M., *Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery*, Microbiol Mol Biol Rev, 62, 465-503, 1998.
- Heanue T. A., R. Reshef *et al.*, *Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for Drosophila eye formation*, Genes Dev, 13, 3231-3243, 1999.
- Hu E., P. Tontonoz *et al.*, *Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha*, Proc Natl Acad Sci U S A, 92, 9856-60., 1995.
- Jackson S. P., *Regulating transcription factor activity by phosphorylation*, Trends in cell biology, 2, 104-108, 1992.

- Jiang B. H., M. Aoki *et al.*, *Myogenic signaling of phosphatidylinositol 3-kinase requires the serine- threonine kinase Akt/protein kinase B*, Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 2077-2081, 1999.
- Karin M., Z. Liu *et al.*, *AP-1 function and regulation*, Curr Opin Cell Biol, 9, 240-246, 1997.
- Kitzmann M., M. Vandromme *et al.*, *cdk1- and cdk2-mediated phosphorylation of MyoD Ser200 in growing C2 myoblasts: role in modulating MyoD half-life and myogenic activity*, Mol Cell Biol, 19, 3167-3176, 1999.
- Langlands K., X. Yin *et al.*, *Differential interactions of Id proteins with basic-helix-loop-helix transcription factors*, J Biol Chem, 272, 19785-19793, 1997.
- Lassar A. and A. Munsterberg, *Wiring diagrams: regulatory circuits and the control of skeletal myogenesis*, Curr Opin Cell Biol, 6, 432-442, 1994a.
- Lassar A. B., J. N. Buskin *et al.*, *MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer*, Cell, 58, 823-831, 1989.
- Lassar A. B., S. X. Skapek *et al.*, *Regulatory mechanisms that coordinate skeletal muscle differentiation and cell cycle withdrawal*, Curr Opin Cell Biol, 6, 788-794, 1994b.
- Latchman D., *Eukaryotic transcription factors*, Londres, Academic press, 1991.
- Li L., J. Zhou *et al.*, *FGF inactivates myogenic helix-loop-helix proteins through phosphorylation of a conserved protein kinase C site in their DNA- binding domains*, Cell, 71, 1181-1194, 1992.
- Lively T. N., H. A. Ferguson *et al.*, *c-Jun binds the N terminus of human TAF(II)250 to derepress RNA polymerase II transcription in vitro*, J Biol Chem, 276, 25582-25588, 2001.
- Lodish H., D. Baltimore *et al.*, *Biologie moléculaire de la cellule*, De Boeck Université, 1997.
- Lodish H., D. Baltimore *et al.*, *Molecular Cell Biology*, De Boeck Université, 1344, 1995.
- Lu J., R. Webb *et al.*, *MyoR: a muscle-restricted basic helix-loop-helix transcription factor that antagonizes the actions of MyoD*, Proc Natl Acad Sci U S A, 96, 552-557, 1999.
- Mal A., M. Sturniolo *et al.*, *A role for histone deacetylase HDAC1 in modulating the transcriptional activity of MyoD: inhibition of the myogenic program*, Embo J, 20, 1739-1753, 2001.
- Marie P., *Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste*, Médecine/sciences, 1252-1259, 2001.

- Markus M., Z. Du *et al.*, *Enhancer-specific modulation of E protein activity*, J Biol Chem, 277, 6469-6477, 2002.
- Marshall P., N. Chartrand *et al.*, *The mouse dystrophin enhancer is regulated by MyoD, E-box-binding factors, and by the serum response factor*, J Biol Chem, 276, 20719-20726, 2001.
- Mayr B. and M. Montminy, *Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB*, Nat Rev Mol Cell Biol, 2, 599-609, 2001.
- Mercie P., M. Seigneur *et al.*, [*Nuclear transcription factor kappa B (NF-kappa B)*], Rev Med Interne, 19, 945-947, 1998.
- Mitomo K., K. Nakayama *et al.*, *Two different cellular redox systems regulate the DNA-binding activity of the p50 subunit of NF-kappa B in vitro*, Gene, 145, 197-203, 1994.
- Molkenstein J. D. and E. N. Olson, *Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors*, Proc Natl Acad Sci U S A, 93, 9366-9373, 1996.
- Mullis K. B. and F. A. Faloona, *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*, Methods Enzymol, 155, 335-350, 1987.
- Munsterberg A. E., J. Kitajewski *et al.*, *Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite*, Genes Dev, 9, 2911-2922, 1995.
- Murre C., P. S. McCaw *et al.*, *Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence*, Cell, 58, 537-544, 1989.
- Narumi O., S. Mori *et al.*, *OUT, a novel basic helix-loop-helix transcription factor with an Id-like inhibitory activity*, J Biol Chem, 275, 3510-3521, 2000.
- Naya F. S. and E. Olson, *MEF2: a transcriptional target for signaling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation*, Curr Opin Cell Biol, 11, 683-688, 1999.
- Olson E. N., M. Perry *et al.*, *Regulation of muscle differentiation by the MEF2 family of MADS box transcription factors*, Dev Biol, 172, 2-14, 1995.
- Phizicky E. M. and S. Fields, *Protein-protein interactions: methods for detection and analysis*, Microbiol Rev, 59, 94-123, 1995.
- Pittenger M. F., A. M. Mackay *et al.*, *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*, Science, 284, 143-147, 1999.
- Poleskaya A., A. Duquet *et al.*, *CREB-binding protein/p300 activates MyoD by acetylation*, J Biol Chem, 275, 34359-34364, 2000.

- Puri P. L., M. L. Avantaggiati *et al.*, *p300 is required for MyoD-dependent cell cycle arrest and muscle-specific gene transcription*, *Embo J*, 16, 369-383, 1997a.
- Puri P. L., V. Sartorelli *et al.*, *Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation*, *Mol Cell*, 1, 35-45, 1997b.
- Renard P., I. Ernest *et al.*, *Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NF-kappaB*, *Nucleic Acids Res*, 29, E21, 2001.
- Robertt T., *Molecular Machines that Control Genes*, *Scientific American*, 55-61, 1995.
- Roeder R. G., *The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly*, *Trends Biochem Sci*, 16, 402-408, 1991.
- Rudnicki M. A., P. N. Schnegelsberg *et al.*, *MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle*, *Cell*, 75, 1351-1359, 1993.
- Sartorelli V., P. L. Puri *et al.*, *Acetylation of MyoD directed by PCAF is necessary for the execution of the muscle program*, *Mol Cell*, 4, 725-734, 1999.
- Seale P., A. Asakura *et al.*, *The potential of muscle stem cells*, *Dev Cell*, 1, 333-342, 2001.
- Semenza G. L., *HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia*, *J Appl Physiol*, 88, 1474-1480, 2000.
- Slack J., *Skinny dipping for stem cells*, *Nat Cell Biol*, 3, E205-206, 2001.
- Song A., Q. Wang *et al.*, *Phosphorylation of nuclear MyoD is required for its rapid degradation*, *Mol Cell Biol*, 18, 4994-4999, 1998.
- Spicer D. B., J. Rhee *et al.*, *Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist*, *Science*, 272, 1476-1480, 1996.
- Struhl K. and Z. Moqtaderi, *The TAFs in the HAT*, *Cell*, 94, 1-4, 1998.
- Tak P. P. and G. S. Firestein, *NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases*, *J Clin Invest*, 107, 7-11, 2001.
- Tamir Y. and E. Bengal, *Phosphoinositide 3-kinase induces the transcriptional activity of MEF2 proteins during muscle differentiation*, *J Biol Chem*, 275, 34424-34432, 2000.
- Vinals F., T. Lopez-Rovira *et al.*, *Inhibition of PI3K/p70 S6K and p38 MAPK cascades increases osteoblastic differentiation induced by BMP-2*, *FEBS Lett*, 510, 99-104, 2002.
- Wang J. S., D. Shum-Tim *et al.*, *Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages*, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 120, 999-1005, 2000.
- Watson J. D., *ADN Recombinant-2nd ed*, De Boeck Université, 164, 1994.

- Wei Q. and B. M. Paterson, *Regulation of MyoD function in the dividing myoblast*, FEBS Lett, 490, 171-178, 2001.
- Woodbury D., E. J. Schwarz *et al.*, *Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons*, J Neurosci Res, 61, 364-730, 2000.
- Xanthoudakis S. and T. Curran, *Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity*, Embo J, 11, 653-665, 1992.
- Yang X. J., V. V. Ogryzko *et al.*, *A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A*, Nature, 382, 319-324, 1996.
- Yoshida N., S. Yoshida *et al.*, *Cell heterogeneity upon myogenic differentiation: down-regulation of MyoD and Myf-5 generates 'reserve cells'*, J Cell Sci, 111, 769-779, 1998.
- Yun K. and B. Wold, *Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context*, Curr Opin Cell Biol, 8, 877-889, 1996.
- Zetser A., E. Gredinger *et al.*, *p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor*, J Biol Chem, 274, 5193-5200, 1999.