

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude du phénotype des souris knock-out pour le géne Maged1

Hérion, Vanessa

Award date: 2004

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.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX NAMUR

Faculté des Sciences

Etude du phénotype des souris « knock-out » pour le gène Maged1

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de licencié en Sciences biologiques Vanessa HERION Juin 2004

 Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
 B 5000
 NAMUR (Belgique)

 Tél. 081/724418 - Fax 081/724420

 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 : joëlle.jonet@fundp.ac.be

Etude du phénotype des souris « knock-out » pour le gène Maged1

HERION Vanessa

Résumé

Le génome humain contient 55 gènes *MAGE* et celui de souris 30. Ces gènes *MAGE* peuvent être classés en 13 sous-familles sur base de leur séquence et de leur localisation chromosomique. En fonction de leur profil d'expression, on distingue deux grands groupes de gènes *MAGE* : les *MAGE* de type I et ceux de type II. Les gènes de type I sont exprimés spécifiquement dans les cellules de la lignée germinale mâle. Certains de ces gènes de type I sont également exprimés dans des tumeurs cancéreuses de types histologiques variés et mènent à l'expression d'antigènes spécifiques des tumeurs. Les gènes *MAGE* de type II se différencient du premier groupe par leur expression plus ubiquiste. Jusqu'à ce jour, la fonction des gènes *MAGE* reste mal connue.

Au laboratoire, l'étude de la fonction des gènes *MAGE* est abordée par l'étude du phénotype de souris déficientes en *Maged1*, un *Mage* de type II. Des données récentes impliquent *Maged1* dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose. Le travail présenté ici compare des cellules issues de souris déficientes en *Maged1* et des cellules contrôles provenant de souris sauvages. Le rôle possible de *Maged1* dans le contrôle de la prolifération cellulaire a été étudié en observant la croissance et la sénescence de fibroblastes d'embryons de souris (MEFs) déficients en *Maged1*. Nous sommes arrivés à la conclusion que des MEFs déficients en *Maged1* prolifèrent de façon identique et entrent en sénescence en même temps que des MEFs sauvages. Par contre, nos observations suggèrent qu'une déficience en *Maged1* diminuerait la capacité des MEFs à s'immortaliser.

Un traitement à la doxorubicine, un agent pro-apoptotique, a montré que les MEFs déficients en *Maged1* sont moins sensibles à l'apoptose, ce qui soutient l'hypothèse du rôle pro-apoptotique qu'on attribue à *Maged1*. Enfin, nous avons obtenu des lignées établies de fibroblastes 3T3 dérivées de souris sauvages et déficientes en *Maged1*. Dans le but de tester l'implication de Maged1 dans la voie apoptotique du récepteur à neurotrophines p75 ^{NTR}, nos lignées 3T3 ont été transfectées par un vecteur d'expression de p75 ^{NTR} et des transfectants stables ont été obtenus. Une stimulation de p75 ^{NTR} par du Nerve Growth Factor (NGF) dans ces lignées devrait permettre d'évaluer le rôle de Maged1 dans la voie apoptotique de ce récepteur.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques Humaines Juin 2004 **Promoteur** : O. De Backer SECRETARIAT BIOLOGIE F.U.N.D.P. Rue de Bruxelles, 59 Je remercie O. De Backer d'avoir accepté d'être mon promoteur et de m'avoir suivie et conseillée tout au long de ce mémoire.

Merci à Mathieu pour tout ce qu'il m'a appris et pour le temps qu'il m'a consacré en tant que tuteur.

Merci à Christiane, Dominique et Catherine pour les petits conseils « techniques » et pour leur bonne humeur quotidienne.

Merci à Carlos pour son « humour » et pour ses coups de main spontanés.

Merci à Anne-Françoise, Ariane, Vanessa, Marie, Emilie et tous les autres pour les moments de détente autour d'un café, les entraides et les encouragements mutuels au cours de ces 6 derniers mois.

Je remercie également mes parents pour leur soutien moral.

Enfin, je tiens à remercier de tout cœur mon petit ami pour m'avoir tant soutenue et encouragée depuis 4 ans et particulièrement lors de ce mémoire.

Liste des abréviations

MAGE : melanoma antigen gene HLA : human leukocyte antigen MHD : mage homology domain IRD: interspersed repeat domain P (nbre): âge du souriceau (ex. : P0 = jour de la naissance)ARNm : acide désoxyribonucléique messager ES: embryonic stem NRAGE: neurotrophin receptor-interacting mage homolog Dlxin: Dlx interacting protein E (nbre): âge de l'embryon (ex.: E12 = 12 jours après la fécondation) IAP : inhibitor of apoptosis protein BIR: baculovirus IAP repeat ITA: inhibitor of T cell apoptosis XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis p75 ^{NTR}: p75 neurotrophin receptor TNF: tumor necrosis factor BDNF: brain-derived neurotrophic factor NT-3: neurotrophin-3 NT-4/5: neurotrophin-4/5 NGF: nerve growth factor Trk: récepteur tyrosine kinase NF-KB: nuclear factor-kappa B JNK: c-jun N-terminal kinase MBP: myelin basic protein TUNEL: in situ terminal-deoxy-transferase mediated dUTP nick end labeling Cdk: cyclin-dependent kinase Rb: retinoblastoma protein MEF: mouse embryonic fibroblast Maged1^{wt}: sauvage pour le gène Maged1 $Maged1^{\Delta 1}$: délété pour le gène Maged1PCR: polymerase chain reaction wt: wild type KO: knock-out P: passage DO: densité optique kDa: kilo Dalton ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire PBS: phosphate buffered saline DMEM: Dulbecco's modified eagle media FBS: fetal bovine serum O/N: overnight Kb: kilobase bp: base pair

HRP: horse radish peroxidase

Table des matières

Introductio	<u>on</u>	6
I La fami	ille des gènes MAGE	6
L1. Déco	uverte des gènes MAGE	
I.2. Les g	ènes <i>MAGE</i> de type I	8
L3. Les g	ènes <i>MAGE</i> de type II	9
II. Etude d	le la fonction des protéines MAGE	
II.1. Les s	souris knock-out	13
II.2. Les 1	protéines MAGED	13
II.2.1. I	Les partenaires d'interaction de MAGED1	14
1)	Dlx5 et Msx2	14
2)	Ror2	14
3)	Praja1	15
4)	UNC5H1	15
5)	IAPs	15
6)	Le récepteur à neurotrophines p75	15
II.2.2. N	MAGED1 et l'apoptose via p75 ^{NTR}	15
1)	Intérêt de l'apoptose dans un organisme	15
2)	Description et fonctions de p75 ^{NTR}	15
3)	Interaction de MAGED1 avec p75 ^{NTR}	17
4)	Modèle d'étude : apoptose des oligodendrocytes par le NGF	18
II.2.3. N	MAGED1 et le cycle cellulaire	19
1)	Vue générale du cycle cellulaire	19
2)	Régulation du cycle cellulaire	19
3)	NECDIN : une protéine MAGE de type II impliquée dans le cycle cellulaire	19
4)	MAGED1 dans le cycle cellulaire	21
5)	Etude de MAGED1 par l'utilisation de fibroblastes embryonnaires de souris	
(MEI	Fs)	22
III. Objecti	f du mémoire	23
Résultats,	discussion et perspectives	24
I. Etude d	de l'effet d'une déficience en Maged1 sur la prolifération et la sénescence de	
fibroblastes	s embryonnaires de souris	24
I.1. Expr	ession de Maged1 au cours du cycle cellulaire	24
I.2. Com	paraison de la croissance, de l'immortalisation de MEFs Maged1 ^{wt} et de MEFs	5
$Maged1^{\Delta}$	¹ et établissement de lignées de type 3T3	26
I.2.1. C	Cultures de MEFs Maged1 ^{wt} et de MEFs Maged1 ⁴¹	26
I.2.2. C	Culture mixte de MEFs Maged1 ^{wt} et Maged1 ⁴¹	29
I.2.3. C	Croissance jusqu'à confluence des MEFs $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta 1}$ au cours du	
passage	e 3	31
I.3. Com	paraison de la sénescence des MEFs $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta 1}$	33
I.4. Com	paraison des propriétés d'adhérence des MEFs $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta 1}$	34
II. Etude d	le l'effet d'une déficience en Maged1 sur l'apoptose	35
II.1. Con	nparaison de l'apoptose induite par le NGF via p75 ^{NIR} sur des oligodendrocy	tes
Maged1 ^w	" et Maged1 ⁴¹	35
II.2. Trai	nsfection de lignées établies de type 3T3 Maged1 ^{wt} et Maged1 ⁴¹ par p75 ^{NTR}	37

II.3. Comparaison de l'effet pro-apoptotique de la doxorubicine sur des MEFs <i>Maged1^{wt}</i> et <i>Maged1^{Δ1}</i>
III. Discussion et perspectives
Matériel et méthodes44
 I. Etude de l'effet d'une déficience en Maged1 sur la croissance et la sénescence
SPORT6-p75
Bibliographie

INTRODUCTION

I. La famille des gènes MAGE

I.1. Découverte des gènes MAGE

Le premier gène *MAGE* fut identifié, en 1991, pour sa capacité à diriger l'expression d'un antigène spécifique de tumeurs, par l'équipe du professeur Boon de l'Institut Ludwig de Bruxelles (van der Bruggen et al., 1991). Ce gène *MAGE1* (pour Melanoma Antigen Gene) est silencieux dans les tissus adultes normaux, à l'exception des cellules de la lignée germinale mâle. Il est cependant exprimé dans des tumeurs de différents types histologiques. Son expression dans les tumeurs peut conduire à l'apparition d'antigènes spécifiques présentés par les molécules HLA (Human Leukocyte Antigen) de classe I à la surface des cellules de la lignée germinale mâle n'expriment pas les molécules HLA, ces antigènes sont donc bien spécifiques de tumeurs et sont particulièrement intéressants pour l'immunothérapie anti-cancéreuse : une vaccination contre ces antigènes pourrait déclencher une réaction immunitaire aboutissant à l'élimination des cellules tumorales (figure 2).



Figure 1. Représentation schématique de l'expression du gène *MAGE1* et de l'antigène correspondant dans les cellules tumorales, somatiques et de la lignée germinale mâle.



Figure 2. Représentation schématique du principe de l'utilisation d'antigènes spécifiques de tumeurs dans l'immunothérapie anti-cancéreuse.

Très rapidement, on a remarqué que *MAGE1* (renommé *MAGEA1* par la suite) appartenait à une famille de gènes : la famille des gènes *MAGE*.

Le séquençage complet du génome humain et de souris a permis d'identifier 55 gènes *MAGE* chez l'homme et 30 chez la souris. Ces gènes ont été classés en sous-familles sur base de leur localisation chromosomique et de leur similarité de séquence. On compte 13 sous-familles de gènes *MAGE* chez l'homme et 9 chez la souris (table 1).

		Human			Mouse		
Subfamily	Gene name	Reference/Accession no.ª	Expression ^b	Gene name	Reference/Accession no.4	Expression ^b	
MAGE-A ^c	hMAGE-A1)	Т	mMage-al	1	ND	
Janob II	hMAGE-A2		Ť	mMage-a2		Т	
	hMAGE-A3		Т	mMage-a3		T	
	hMAGE-A4		T	mMage-a4	2 Ref. 14	T	
	hMAGE-AS		1 T	mMage-a5		ND	
	hMAGE-A0	Ref. 2	P	mMage-a0		P	
	hMAGE-A8		Ť	mMage-a8	J	Ť	
	hMAGE-A9		Ť	mMage-a9	AL021127.2(9458-10189)	P	
	hMAGE-A10		т		(200 (0102)		
	hMAGE-A11		T				
	hMAGE-A12	1171149	T				
	hMAGE-AIS	U/1148(11970-12608) NT 011534 1	P				
	hMAGE-A15	NT 025300 1	pd				
MAGE-B ^c	hMAGE-B1	111_04000011(68501-69500)	Ť	mMage-bl	1	Т	
in to b	hMAGE-B2	Paf 5	Ť	mMage-b2	Ref.15	Ť	
	hMAGE-B3	Kel. 5	T	mMage-b3		T	
	hMAGE-B4	{	T	mMage-b4	Ref. 16	Ţ	
	hMAGE-B5	Ref. 8	T	mMage-b5	AC025874.3(174095-173508)	ND	
	hMAGE-BO	AC005207.1	P	mMage-bo	AC025874.3 AC025874.3	ND	
	hMAGE-B	AC0052971 (117306-116890)	p	mMage-b8	AC025874 3	ND	
	hMAGE-B9	AC005297, L(121013, (20283)	P	mMage-b9	AC025874.3(164334 164849)	ND	
	hMAGE-B10	AC011693.5(134036-135079)	T	mMage-b10	AC025874.3(49446-49961)	ND	
	hMAGE-B11	AC011693.5(124613-125653)	P				
	hMAGE-B12	AC011693.5(116519-117561)	P				
	hMAGE-BIS	NT 025270 3	P ^d				
	hMAGE-B15	NT 011752-1 (927601-928600)	Pd				
	hMAGE-B16	NT_025279.3(1018827_1019786)	Ť				
	hMAGE-B17	NT_011766.3(835710-835102)	Т				
MAGE-C	hMAGE-CI	Ref. 7	Ţ				
	RMAGE-C2	Ref. 8	1 T				
	hMAGE-C3	AI 023279 Louis anone	Ť				
	hMAGE-C5	NT 025337.2	\mathbf{P}^{d}				
	hMAGE-C6	NT_025337.2(387877_388503)	P				
	hMAGE-C7	NT_025337.2(366380-366796)	P				
MAGE-D	hMAGE-DI	Ref. 20	N	mMage-d1	AF319975	N	
	hMAGE-D2	A P020027	N	mMage-a2	AF319970 AF310077	N.	
	hMAGE-D4	AF320908	N	manage-us	Arstisti		
MAGE-E	hMAGE-E1	AL096827(103046-100173)	N	mMage-el	AF319978	N	
	hMAGE-E2	NT_025273.3(1969507_1971078)	N	mMage-e2	AF319983	N	
	hMAGE-E3	NT_011954.3(589500-591000)	N				
MAGE-F	hMAGE-F1	AC016975.3(167853-166930)	N		15310070		
MAGE-G	RMAGE-01	AC001903.3(145505-144089)	N	mMage-g1	AF319979	N	
MAGE-H	hMAGE-HI	AF320912	N	mMage-g2	AF319981	N	
MAGE-I	hMAGE-11	NT_011638.3(1237956-1238326)	\mathbf{P}^{d}	managemi			
	hMAGE-12	NT_011638.3(46231-46830)	P ^d				
MAGE-J	hMAGE-JI	NT_011577(101579-101911)	Pa		1210084	т	
MAGE-K MAGE-12	hMAGE-KI	Ref 30 16586)	N	mMage-kl	Ar 519984 Ref 30	N	
NECDIN	hNECDIN	Ref 20	N	mNardin	Ref 28	N	

Table 1. Les différentes sous-familles des gènes MAGE humains et murins.

Les profils d'expression sont indiqués par : T, spécifiquement exprimé dans les testicules et/ou les tumeurs ; N, spécifiquement exprimé dans les tissus adultes normaux ; ND, profil d'expression nondéterminé ; P, pseudogène (Chomez et al., 2001).

En comparant les séquences des protéines encodées par tous les gènes *MAGE*, on a identifié une région d'environ 200 acides aminés appelée « le domaine MAGE » ou « MAGE homology domain » (MHD1). Il est localisé à l'extrémité COOH-terminale des protéines sauf dans les protéines MAGED où il occupe une position plus centrale (figure 3). Ce domaine est la seule région d'homologie présente chez tous les membres de la famille (Chomez et al.,2001). La séquence en acides aminés des protéines MAGE ne contient aucun domaine permettant de nous renseigner sur la fonction de ces protéines.



Figure 3. Représentations schématiques des protéines MAGEA1, B1, D2, E2 et H1. Les zones noires représentent le « domaine MAGE ». Le pourcentage d'acides aminés identiques est indiqué. Les régions NH_{2} - et COOH-terminales ne partagent pas d'homologie (Chomez et al., 2001).

En plus d'être classés en sous-familles, les gènes *MAGE* ont été classés en deux grandes catégories sur base de leur profil d'expression : les gènes *MAGE* de type I et de type II.

I.2. Les gènes MAGE de type I

Ils comprennent la majorité des gènes MAGE dont les sous-familles des gènes MAGEA, B et C. Ces trois groupes de gènes sont localisés sur le chromosome X dans les régions q28 (MAGEA), p21 (MAGEB) et q26-27 (MAGEC) (figure 4). On compte 15 gènes MAGEA chez l'homme et 9 chez la souris. Dix-sept gènes MAGEB ont été identifiés chez l'homme et 10 chez la souris, tandis que la sous-famille MAGEC dénombre 7 membres chez l'humain et aucun chez la souris (Chomez et al., 2001).

Ces gènes sont silencieux dans les tissus adultes normaux à l'exception des cellules de la lignée germinale mâle où ils sont exprimés dans certaines étapes du processus de spermatogenèse ce qui laisse penser que ces gènes pourraient jouer un rôle dans la spermatogenèse (Clotman et al., 2000). Les gènes *MAGE* de type I sont souvent exprimés dans les tumeurs. Ils sont donc d'un grand intérêt en immunothérapie anti-cancéreuse d'une part, parce qu'ils sont spécifiques des tumeurs, d'autre part, parce qu'ils sont exprimés dans un grand nombre de tumeurs. En injectant le peptide MAGEA3 chez des patients atteints de mélanome, un effet clinique significatif (régressions de métastases) a été observé chez certains patients (Marchand et al., 1999). Le rôle des protéines MAGE de type I reste inconnu mais leur spécificité tumorale suggère un rôle dans la transformation ou la progression tumorale.

Dans les tissus normaux, l'expression de ces gènes est réprimée par une méthylation de l'ADN. Dans les tumeurs, on observe fréquemment des phénomènes de déméthylation globale de l'ADN qui affectent le génome de manière aléatoire et qui, dans certains cas, touchent les gènes *MAGE* (De Smet et al., 1996).

Les gènes *MAGE* de type I sont caractérisés par une évolution rapide qui rend impossible l'établissement de relation d'orthologie entre les gènes humains et de souris.

La structure génomique de ces gènes est caractérisée par le fait qu'ils sont constitués de peu d'exons, globalement 3, et que toute la séquence codante est contenue dans le dernier exon. Enfin, les gènes MAGE de type I sont organisés en « chapelet » sur les chromosomes.



Figure 4. Localisations chromosomiques des sous-familles des gènes *MAGE* humains (Chomez et al., 2001).

I.3. Les gènes MAGE de type II

Ces gènes contiennent les sous-familles des gènes MAGED, E, F, G, H, L et le gène NECDIN. Chez l'homme, les gènes MAGED, E, H sont sur le chromosome X. Les gènes MAGEG, L et le gène NECDIN se situent dans la région q11-q13 du chromosome 15 et le gène MAGEF est localisé sur le chromosome 3 (figure 4).

Les gènes *MAGE* de type II se distinguent des gènes *MAGE* de type I par leur expression beaucoup plus large dans les tissus somatiques. *NECDIN* a été le premier membre de la famille des gènes *MAGE* à être identifié pour son expression ubiquiste. Ces gènes *MAGE* de type II n'encodent naturellement pas de peptides antigéniques.

Les gènes MAGED

La sous-famille de gènes *MAGED* comporte 4 gènes chez l'homme et 3 chez la souris. Chez l'homme, ils sont situés dans la région p11 du chromosome X. Les gènes *MAGED* possède des caractéristiques qui les rendent particulièrement attrayants.

Tout d'abord, les gènes *MAGED* présentent une structure génomique complètement différente de tous les autres membres de la famille MAGE: 13 exons dont 11 encodent la protéine (exons 2 à 12)(figure 5).

La particularité structurale de ces gènes fait apparaître qu'un ou plusieurs gènes *MAGED* ancestraux ont généré les autres membres des sous-familles *MAGE* par rétropositions et duplications.



Figure 5. A, comparaison des protéines MAGED1 et MAGEA1. Les zones noires représentent le domaine d'homologie. La position des acides aminés est indiquée.B, Structure exon-intron du gène MAGED1 et du gène MAGEA1. Les zones noires représentent les séquences codantes.

Les gènes *MAGED1*, *D2* et *D3* sont plus fortement conservés entre l'homme et la souris qu'ils ne le sont entre eux, ce qui indique qu'ils sont apparus avant la séparation phylogénique de l'homme et la souris. La conservation de ces trois gènes durant l'évolution suggère que les trois protéines exercent des fonctions distinctes.

Outre le domaine MHD_1 , les protéines MAGED contiennent une région moins conservée de 220 acides aminés dans leur partie N-terminale appelée le domaine MHD_2 . La protéine MAGED1 contient également un domaine IRD (interspersed repeat domain) qui sépare MHD_1 et MHD_2 et qui consiste en 25 « tandems repeats » de l'hexapeptide WQXPXX (figure 6). Ce motif inhabituel est bien conservé entre l'homme, le rat et la souris (Barker et al., 2002).



Figure 6. Structures des domaines de quelques membres de la famille MAGE; MHD₁ est indiqué en jaune, MHD₂ en vert et IRD en orange (Barker et al., 2002).

Le profil d'expression des gènes *Maged* de souris au cours de l'embryogenèse et du développement du cerveau a été étudié par hybridation in situ (Bertrand et al., 2004)(figure 7). L'expression de *Maged3* est essentiellement restreinte au système nerveux central et périphérique. La spécificité d'expression de *Maged3* pour le système nerveux augmente au cours du développement.

Le profil d'expression de *Maged2* est complémentaire à celui de *Maged3*. *Maged2* a été détecté dans la plupart des tissus d'origine mésodermique : langue, muscles intercostaux, muscles périvertébraux, diaphragme, couches musculaires de l'intestin et de l'estomac, structures cartilagineuses. Cependant, *Maged2* est faiblement détecté dans le cerveau au cours du développement. Une expression significative de *Maged2* a été observée dans le cerveau du nouveau-né mais elle disparaît à l'âge adulte.

Le profil d'expression de Maged1 recouvre celui de Maged2 et Maged3. Les transcrits de Maged1 sont largement détectés à travers le système nerveux central et périphérique mais également dans de nombreux tissus d'origine mésodermique. Dans le cerveau de souris aux stades P10 et P60 (10 et 60 jours après la naissance), les profils d'expression de Maged1 et Maged3 sont très semblables. Les deux gènes sont exprimés dans toutes les régions du cerveau avec une expression particulièrement élevée dans l'hippocampe, les noyaux hypothalamiques, le bulbe olfactif,... Contrairement à Maged3, Maged1 est exprimé préférentiellement dans les zones ventriculaires, sites à activité germinale importante. Ce qui suggère que Maged3 soit plutôt exprimé dans les neurones en cours de différenciation et postmitotiques. La quantité d'ARNm Maged1 augmente avec l'âge alors que la quantité de protéines diminue, ce qui signifie que Maged1 est régulé post-transcriptionnellement.



Figure 7. Profils d'expression des gènes *Maged1, d2 et d3* par hybridation in situ sur des embryons entiers de souris à différents stades du développement embryonnaire (Bertrand et al., 2004).

Chez l'homme, l'expression des gènes *MAGED* est également observée au cours de développement embryonnaire ainsi que dans les différentes structures du cerveau. Cependant, contrairement aux observations faites chez la souris, *MAGED1* est fortement exprimé dans le foie fœtal. De plus, *MAGED2* reste fortement exprimé dans le cerveau adulte.

Les gènes *MAGED* sont donc largement exprimés dans le cerveau ce qui suggère qu'ils pourraient jouer un rôle général dans la différenciation neuronale, le maintien ou la transmission des signaux plutôt qu'un rôle spécifique dans une région particulière du cerveau.

II. Etude de la fonction des protéines MAGE

Au laboratoire, deux approches sont mises en œuvre pour étudier la fonction des protéines MAGE :

- 1) étude du phénotype de souris et de cellules déficientes pour Maged1 et Maged2.
- 2) recherche de partenaires d'interaction par la technique du double-hybride.

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes intéressés plus particulièrement au phénotype de cellules déficientes en *Maged1*.

II.1. Les souris knock-out

La stratégie d'inactivation des gènes *Maged1* et *d2* a été réalisée grâce au système conditionnel Cre-LoxP. Ce système permet la délétion d'un segment génomique par recombinaison entre les deux sites LoxP qui l'entourent grâce à la recombinase Cre.

Pour créer l'allèle conditionnel *Maged1*, deux sites LoxP en orientation directe ont été insérés dans les introns 3 et 12 de cellules ES (embryonic stem) mâles. Les cellules ES contenant l'allèle conditionnel *Maged1* ont donné naissance à des souris chimériques. La mutation conditionnelle a alors été transmise à la descendance par croisement des chimères avec des femelles sauvages. On a obtenu des souris homozygotes pour la mutation par croisements successifs. Ces animaux ont finalement été croisés avec des souris transgéniques exprimant Cre de manière ubiquiste. Ces croisements ont alors donné naissance à des souris portant une délétion dans le gène *Maged1* (figure 8).



Figure 8. Représentation schématique de la délétion du gène *Maged1* par croisement entre une souris conditionnelle *Maged1* et une souris transgénique exprimant Cre.

II.2. Les protéines MAGED

La plupart des données sur les gènes *MAGED* concernent *MAGED1* (aussi appelé *NRAGE* (Neurotrophin Receptor-interacting mAGE homolog) ou *Dlxin-1* (Dlx interaction)).

L'étude de la fonction des protéines MAGE de type II se base principalement sur l'étude de MAGED1 et de NECDIN. Le gène *NECDIN* a été le premier membre de la famille des gènes *MAGE* à être fonctionnellement caractérisé et il a permis d'apporter des informations sur les protéines MAGE de type II. Les études réalisées sur MAGED1 et NECDIN suggèrent un rôle

important des protéines MAGE de type II dans la survie cellulaire, le cycle cellulaire et l'apoptose (Barker et al.,2002).

II.2.1. Les partenaires d'interaction de MAGED1

La technique du double-hybride dans la levure a permis l'identification de plusieurs partenaires interagissant avec MAGED1 qui sont impliqués dans le cycle cellulaire et l'apoptose.

1) Dlx5 et Msx2

Dlx5 et Msx2 sont des modulateurs transcriptionnels à homéodomaines qui jouent un rôle important dans le développement et la réparation des os.

MAGED1 se lie à Dlx5 par son motif répété (séquence WQXPXX) et à Msx2 par son domaine MHD₁. MAGED1 serait un régulateur transcriptionnel qui exercerait cette fonction en interagissant avec les facteurs de transcription Dlx/Msx (Masuda et al., 2000).

2) <u>Ror2</u>

Ror2 est un récepteur tyrosine kinase. Ror1 et Ror2 jouent un rôle dans le développement et en particulier dans celui du squelette et du cœur. Par des techniques de double-hybride et de co-immunoprécipitation, une association entre MAGED1 et Ror2 a été mise en évidence. Des analyses d'hybridation in situ sur des embryons de souris montrent qu'au stade E10.5, Maged1 et Ror2 présentent un profil d'expression qui se recouvre au niveau de la face et des membres en développement (figure 9).



Figure 9. Profils d'expression de Ror1, Ror2 et Maged1 lors du développement embryonnaire par hybridation in situ sur des embryons entiers de souris (E10.5) (Matsuda et al., 2003).

La région C-terminale de Ror2 est requise pour l'association au domaine MHD_1 de MAGED1.

Le domaine MHD_1 fait l'objet d'une compétition entre Ror2 et Msx2. L'association de MAGED1 à Msx2 est affectée par la présence de Ror2. En effet, Ror2 séquestre MAGED1 dans les compartiments membranaires ce qui empêcherait MAGED1 de colocaliser avec Msx2 dans le noyau cellulaire où il effectue sa fonction de modulateur transcriptionnel. Ror2 semble donc réguler la distribution subcellulaire de MAGED1 (Matsuda et al., 2003).

3) Praja1

Praja1 est une protéine RING finger qui régulerait la fonction transcriptionelle de Dlx5 en contrôlant la stabilité de MAGED1. Praja1 agit comme une ubiquitine ligase E3 qui reconnaîtrait MAGED1 et induirait sa dégradation par le protéasome. Praja1 inhiberait indirectement la transcription par Dlx5. Praja1 semblerait également induire la dégradation de Msx2 par le protéasome (Sasaki et al., 2002).

4) <u>UNC5H1</u>

UNC5H1 est un récepteur de la superfamille des immunoglobulines qui lient les nétrines. Les nétrines jouent un rôle dans l'orientation des axones et la migration cellulaire. MAGED1 peut se lier à la région juxtamembranaire de UNC5H1 qui consiste en une courte séquence PEST (séquence riche en proline, acide glutamique, sérine et thréonine) et conduire à l'apoptose (Williams et al., 2003).

5) <u>IAPs</u> (inhibitor of apoptosis proteins)

Les IAPs sont des protéines qui favorisent la survie cellulaire et qui sont caractérisées par un domaine BIR (séquence NH_2 terminale riche en cystéine) et par un domaine RING en doigt de zinc (région carboxyl terminale). MAGED1 se lierait au domaine RING des ITAs (inhibitor of T cell apoptosis) et des XIAPs (X-linked inhibitor of apoptosis) ce qui entraînerait un clivage accéléré de ces protéines et favoriserait de cette manière la mort cellulaire (Jordan et al., 2001).

6) <u>Le récepteur à neurotrophines p75</u> (p75 ^{NTR})

Voir plus loin.

II.2.2. MAGED1 et l'apoptose via p75 NTR

1) Intérêt de l'apoptose dans un organisme

L'apoptose est un phénomène important impliqué dans l'homéostasie des tissus. En effet l'homéostasie des tissus est maintenue par 4 fonctions : la différenciation, la sénescence, la prolifération et la mort cellulaire. La perte d'une de ces fonctions est à la base du développement d'une maladie. L'apoptose s'observe principalement au cours du développement (ex : le développement des doigts,...) et est très utile pour éliminer des cellules superflues (ex : élimination de cellules potentiellement cancéreuses, élimination des cellules du thymus lors des sélections positive et négative,...).

2) Description et fonctions de p75 NTR

p75^{NTR} est un récepteur qui lie les neurotrophines. Il est un des 25 membres de la superfamille des récepteurs TNF (tumor necrosis factor). Les neurotrophines sont des facteurs de croissance qui interviennent dans le développement, le maintien, la survie et la mort des cellules du système nerveux. Elles semblent impliquées dans des maladies neurologiques : Alzeihmer, Parkinson, épilepsie, cancers du système nerveux central.

Il existe 4 neurotrophines chez les mammifères: le BDNF (brain-derived neurotrophic factor), la NT-3 (neurotrophin-3), la NT-4/5 (neurotrophin-4/5) et le NGF (nerve growth factor). Elles sont synthétisées sous forme de précurseurs glycosylés puis clivées en forme active par des convertases (figure 10).



Figure 10. Représentation schématique des neurotrophines chez les mammifères (Roux et al., 2002).

Les neurotrophines exercent leurs effets en se liant à 2 types de récepteurs : ceux de la famille tyrosine kinase (TrkA, B, C) et p75 $^{\rm NTR}$.

Le NGF mature induit 2 effets distincts sur la cellule par liaison à ses récepteurs : la survie cellulaire par TrkA et l'apoptose par p75 ^{NTR}. Apparemment, le précurseur proNGF lie p75 ^{NTR} avec une plus grande affinité que la forme

Apparemment, le précurseur proNGF lie p75^{NTR} avec une plus grande affinité que la forme mature NGF et induit l'apoptose de neurones en culture (Beattie et al., 2002).

Les souris mutantes pour p75^{NTR} ont un phénotype complexe : taille inférieure à la normale, ataxie des membres postérieurs, perte de neurones sensoriels périphériques, perte sévère d'innervation sympathique, rupture de gros vaisseaux sanguins responsable d'une létalité périnatale partielle (von Schack et al., 2001).

Deux grandes fonctions moléculaires sont habituellement attribuées à p75 ^{NTR} :

a) d'une part, p75 ^{NTR} peut augmenter la fonction de TrkA favorisant de cette manière la survie et de la différenciation cellulaire.

La présence de p75 ^{NTR} semble conférer une plus grande réponse à une plus faible concentration en neurotrophines. On considère 2 mécanismes par lesquels p75 ^{NTR} peut augmenter la fonction de TrkA : soit p75 ^{NTR} agit comme un co-récepteur et lie le NGF pour le concentrer ou le présenter à TrkA dans sa conformation la plus favorable, soit p75 ^{NTR} participe à la formation de sites de liaison de haute affinité, ce qui diminue la concentration de NGF requise pour la transduction du signal par TrkA. p75 ^{NTR} et TrkA interagissent de manière physique mais on ne sait pas encore si cette interaction est directe ou si elle nécessite des facteurs complémentaires.

b) d'autre part, en absence de TrkA, p75^{NTR} peut entraîner l'apoptose par liaison du NGF. Le récepteur p75^{NTR} favorise l'apoptose en particulier lors du développement neuronal et après une lésion au niveau du système nerveux. p75^{NTR} est largement distribué dans les cellules qui manquent de récepteurs Trk et est capable de transmettre des signaux de façon autonome.

Dans les cellules où les 2 types de récepteurs sont exprimés, la survie favorisée par TrkA apparaît comme un signal dominant qui bloque l'apoptose par p75 ^{NTR}.

Dans certaines circonstances, p75 ^{NTR} peut également avoir un rôle dans la survie cellulaire en activant la voie de NF- κ B.

Le récepteur p75 ^{NTR} peut donc avoir un rôle pro- et anti-apoptotique (Roux et al., 2002 ; Dechant et al., 2002 ; Yoon et al., 1998).

Les voies de signalisation activées par p75^{NTR} qui mènent à l'apoptose ne sont pas bien connues. Il semble que l'activation du récepteur par le NGF entraîne l'activation des JNK (c-jun N-terminal kinases), des caspases et la sortie du cytochrome C de la mitochondrie vers le cytosol. L'activation des JNK mène à la phosphorylation du facteur de transcription c-jun dont le rôle consiste à activer la transcription de gènes cibles impliqués dans l'activation des caspases (Gu et al., 1999).

Les caspases (cysteinyl aspartate specific protease) sont une famille de protéases à cystéine qui reconnaissent l'aspartate de leur substrat. L'activation de la caspase 9 requiert la formation d'un complexe cytosolique, l'apoptosome, formé par la caspase 9 elle-même, l'Apaf-1 et le cytochrome C. Une fois la caspase 9 activée, elle active d'autres caspases. Apparemment l'activation de p75 ^{NTR} pourrait entraîner l'accumulation de facteurs proapoptotiques « BH3 - domain only » de la famille Bcl2 et permettre ainsi à deux autres protéines, Bax et Bak, de perturber l'intégrité de la membrane mitochondriale et de causer la libération de nombreuses protéines mitochondriales (dont le cytochrome C et Apaf-1) vers le cytosol (Roux et al., 2002).

3) Interaction de MAGED1 avec p75 NTR

L'équipe de P. Barker a mis en évidence un partenaire d'interaction de p75^{NTR} : MAGED1. MAGED1 peut se lier à p75^{NTR} et faciliter la mort cellulaire dépendant de p75^{NTR} (Salehi et al., 2000).

L'effet pro-apoptotique de MAGED1 a été observé lors d'une expérience réalisée par le groupe de P. Barker sur des cellules exprimant p75 ^{NTR}. Cette expérience consistait à surexprimer MAGED1 dans des cellules PC12 par un système inductible à la doxycycline. Des cellules PC12, exprimant un facteur de transcription régulé par la doxycycline, ont été infectées par un adénovirus contenant le gène *MAGED1*. En absence de doxycycline, *MAGED1* est très peu exprimé. Par contre, l'addition de doxycycline induit une forte expression de *MAGED1*. En présence de doxycycline, ils ont observé une diminution significative de viabilité parmi les cellules infectées par l'adénovirus contenant *MAGED1* (Salehi et al., 2002).

MAGED1 active une voie mitochondriale entraînant la mort cellulaire par libération du cytochrome C dans le cytosol, par activation des JNK et des caspases 3, 7 et 9. On observe donc une superposition entre le chemin apoptotique utilisé par p75^{NTR} et celui utilisé par MAGED1 ce qui suggère que ces deux protéines se trouvent sur la même voie de transduction du signal.

MAGED1 se lie à la région juxtamembranaire du domaine cytoplasmique de p75^{NTR} par MHD₁ et bloque l'association physique de p75^{NTR} avec TrkA ce qui semble vouloir indiquer que MAGED1 et TrkA entrent en compétition pour p75^{NTR}.

Outre MAGED1, deux autres protéines MAGE de type II interagissent avec p75^{NTR}: NECDIN et MAGEH1. NECDIN semble agir comme un adaptateur cytoplasmique qui recrute un complexe de signalisation vers p75^{NTR}. Des cellules PC12 transfectées par *NECDIN* ou *MAGEH1* accélèrent leur différenciation neuronale en réponse au NGF (Tcherpakov et al., 2002).

4) Modèle d'étude : apoptose des oligodendrocytes par le NGF

Casaccia-Bonnefil et ses collègues ont montré que le NGF peut induire la mort d'oligodendrocytes matures cultivés à partir de cortex cérébraux d'embryons de rats. Cet effet est très spécifique car le NGF n'a pas d'effet sur des précurseurs d'oligodendrocytes et sur des astrocytes. D'autres neurotrophines comme le BDNF et le NT-3 n'induisent pas la mort cellulaire (Casaccia-Bonnefil et al., 1996).

Après une lésion au niveau de la moelle épinière, de nombreux oligodendrocytes entrent en apoptose. Ces oligodendrocytes expriment de manière significative p75 ^{NTR} qui joue donc un rôle pro-apoptotique dans cette situation. En culture, des oligodendrocytes matures expriment p75 ^{NTR} mais pas TrkA et la liaison du NGF à p75 ^{NTR} mène alors à l'apoptose (Beattie et al., 2002 ; Yoon et al. 1998).

L'apoptose des oligodendrocytes résulte de l'activation des JNK et des caspases 1, 2 et 3 et d'une augmentation du céramide intracellulaire (Gu et al., 1999).

Harrington a montré que des oligodendrocytes matures de souris (positifs pour la MBP (myelin basic protein)) expriment p75^{NTR} et pas TrkA. Après traitement au NGF, il a observé une augmentation du nombre de cellules apoptotiques parmi les oligodendrocytes MBP⁺ dérivés de souris sauvages. Par contre, les oligodendrocytes issus de souris mutées pour p75^{NTR} sont insensibles à un traitement au NGF (figure 11). Ces données confirment le rôle apoptotique de p75^{NTR} dans les oligodendrocytes en culture (Harrington et al., 2002).



Figure 11. Les oligodendrocytes de souris mutées pour p75 ^{NTR} résistent à l'apoptose après un traitement au NGF.

A, les oligodendrocytes de souris expriment p75^{NTR} en culture (*rouge*). Les oligodendrocytes matures sont identifiés par un marquage de la MBP (*vert*).

B, les oligodendrocytes mutés pour p75^{NTR} résistent à l'apoptose après un traitement au NGF.

C, quantification des cellules (sauvages et mutées pour p75 ^{NTR}) TUNEL⁺ (en apoptose) parmi les cellules MBP^+ avant et après un traitement au NGF.

(Harrington et al., 2002).

II.2.3. MAGED1 et le cycle cellulaire

1) <u>Vue générale du cycle cellulaire</u>

Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases principales. Dans les cellules somatiques en division, l'ADN est répliqué pendant la phase S. Après une phase G_2 , les cellules commencent l'étape mitotique appelée phase M qui est divisée en plusieurs étapes : prophase, métaphase, anaphase, télophase et cytokinèse. Après la mitose, les cellules entrent en phase G_1 , période précédant une nouvelle réplication de l'ADN en phase S.

Les cellules post-mitotiques chez les organismes multicellulaires sont capables de « sortir » du cycle cellulaire et de rester quelques jours à toute une vie (c'est le cas des neurones) sans proliférer et entrent alors dans une phase appelée G_0 , phase de quiescence.

2) <u>Régulation du cycle cellulaire</u>

Les cellules de mammifères utilisent différentes cyclin-dependent kinases (cdks) et cyclines pour réguler le passage d'une étape à l'autre du cycle cellulaire. Les cdks sont composées d'une sous-unité catalytique qui peut s'associer avec différentes cyclines, considérées comme les sous-unités régulatrices de ces kinases. Le type de cycline associé à la cdk détermine les protéines qui seront phosphorylées par le complexe cdk-cycline.

De manière générale, les complexes responsables de la régulation du cycle cellulaire sont les suivants : cdk4-cycline D et cdk6-cycline D sont actifs de la moitié à la fin de la phase G_1 ; cdk2-cycline E en fin G_1 ; cdk2-cycline A en phase S ; cdk1-cycline A et cdk1-cycline B en G_2 et en anaphase de M.

L'activité des complexes cdk-cyclines est régulée par phosphorylation et déphosphorylation.

3) NECDIN : une protéine MAGE de type II impliquée dans le cycle cellulaire

La fonction des gènes MAGE a commencé à s'éclaircir avec l'analyse du syndrome de Prader-Willi, une maladie neurogénétique caractérisée par une variabilité importante de son expressivité et qui semble résulter d'un déficit hypothalamique. Les patients présentent des caractéristiques typiques : hypotonie infantile, obésité, hypogonadisme, détresse respiratoire à la naissance, retard mental, problèmes comportementaux caractéristiques,...

Le syndrome de Prader-Willi est causé par des mutations dans une région chromosomique caractérisée par un phénomène d'empreinte, un processus dans lequel des gènes sont exprimés différemment selon leur origine parentale (maternelle ou paternelle). On observe chez tous les patients un défaut génétique lié à la région 15 q11-q13 : délétion paternelle, disomie maternelle, mutation du centre de l'empreinte,...

NECDIN se situe dans la région q11-q13 du chromosome 15. Différentes souris knock-out pour *Necdin* ont été produites. Il semble que le fond génétique influence la pénétrance du phénotype. Certaines souris mutantes ne présentent aucun phénotype anormal, elles sont viables et fertiles (Tsai et al., 1999). Par contre, Gérard observe une détresse respiratoire postnatale menant à la mort vers l'âge de 30 jours chez ses souris C57/BL6 (Gérard et al., 1999). Muscatelli a mis en évidence une létalité postnatale dans un fond génétique C57B16/J accompagnée d'une réduction du nombre de neurones hypothalamiques produisant l'ocytocine et la LHRH (luteinizing hormone-releasing hormone). Muscatelli a constaté un parallélisme important en termes morphologiques, comportementaux et cognitifs entre les effets d'une mutation *Necdin* chez la souris et les caractéristiques du syndrome de Prader-Willi (Muscatelli et al., 2000).

Le rôle précis de NECDIN reste incertain mais il semblerait qu'il participe à l'arrêt du cycle cellulaire, à l'inhibition de l'apoptose et à la différenciation neuronale (Taniura et al., 1998, 1999). Il apparaît en outre que ce gène soit exprimé dans des neurones post-mitotiques, c'està-dire dans des neurones différenciés qui ont perdu leur capacité de réplication. La plupart des neurones du système nerveux central chez les mammifères entrent dans un état postmitotique lors de la période d'embryogenèse.

E2F1 et p53 sont deux partenaires de NECDIN impliqués dans la régulation du cycle cellulaire.

Les protéines E2F sont des facteurs de transcription qui se lient au promoteur de différents gènes impliqués dans la réplication de l'ADN et le contrôle du cycle cellulaire (c-myc, cdc-2 et E2F1 lui-même).

La famille des protéines E2F comprend 5 membres : E2F1, E2F2, E2F3, E2F4 et E2F5.

La protéine Rb (Retinoblastoma) est le produit d'un gène suppresseur de tumeurs et est capable de lier le domaine de transactivation des facteurs E2F.

E2F1, E2F2 et E2F3 se lient préférentiellement à Rb tandis que E2F4 et E2F5 se lient plutôt à p107 et p130 (deux protéines semblables à Rb).

La phosphorylation et la déphosphorylation de Rb régule l'activité de liaison aux protéines E2F. Rb hypophosphorylé prédomine en phase G_1 et se lie à E2F, réprimant son activité transcriptionnelle et prévenant ainsi l'entrée en phase S. En G_0 , ce sont plutôt les complexes p130/E2F qui prédominent et répriment la transcription par E2F. Les cdks4/6 et les cdks2 activées respectivement par les cyclines D et E induisent la phosphorylation de Rb (figure 12).



Figure 12. Régulation du cycle cellulaire par les facteurs E2F et la protéine Rb (Yoshikawa, 2000).

NECDIN est fonctionnellement similaire à Rb. NECDIN peut se lier à E2F1 et bloquer la transcription par ce facteur.

Dans les neurones post-mitotiques, NECDIN apparaît comme un suppresseur de croissance qui contribue au maintien de l'état post-mitotique des neurones.

D'autre part, NECDIN favorise la survie neuronale en bloquant p53, un facteur de transcription impliqué dans l'apoptose. En liant E2F1 et p53, NECDIN fonctionne comme un facteur anti-apoptotique dans les cellules post-mitotiques (Yoshikawa, 2000; Taniura et al., 1999, 1998).

4) MAGED1 dans le cycle cellulaire

MAGED1 est structurellement homologue à NECDIN. Il est possible que MAGED1 joue un rôle dans le cycle cellulaire via les mêmes mécanismes que ceux de NECDIN.

L'équipe de P. Barker a observé une relation entre MAGED1 et cycle cellulaire. Ils ont surexprimé *MAGED1* dans des cellules rénales d'embryons humains 293 et les ont incubées avec de la bromodéoxyuridine (BrdU). Ils ont observé une faible incorporation de BrdU parmi les cellules transfectées par rapport aux cellules contrôles. Ce qui suggère que MAGED1 faciliterait l'arrêt du cycle cellulaire, comme NECDIN (Salehi et al., 2000).

L'effet de MAGED1 à la fois sur l'apoptose et sur le cycle cellulaire suggère la possibilité que l'effet pro-apoptotique de p75^{NTR} puisse être secondaire à l'arrêt du cycle cellulaire. Il est donc possible que les signaux apoptotiques initiés par p75^{NTR} soient transmis par un complexe de molécules qui peuvent activer un mécanisme lié au cycle cellulaire. Ainsi des perturbations dans le cycle cellulaire pourraient être un important mécanisme d'initiation de la mort neuronale. Des données récentes indiquent que la mort des cellules rétiniennes par p75^{NTR} est associée à une élévation du niveau de cycline B2 et une activation de p53 (Frade, 2000) ce qui est en accord avec l'hypothèse que p75^{NTR} entraîne l'apoptose par une voie dépendante du cycle cellulaire qui implique MAGED1 (figure 13).



Figure 13. Les voies apoptotiques de p75 ^{NTR} en relation avec la régulation du cycle cellulaire (Frade, 2000).

Il semble aussi que, lorsqu'on surexprime MAGED1 dans des cellules HEK 293, le suppresseur de tumeur p53 soit phosphorylé et s'accumule. MAGED1 pourrait réguler l'activité de p53 par une modification post-transcriptionnelle et induire son activation. On sait que MAGED1 induit l'activation des caspases et des JNK mais on ne sait pas si l'activation de p53 par MAGED1 est liée à la voie des JNK (Wen et al., 2004).

5) Etude de MAGED1 par l'utilisation de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs)

L'utilisation de lignées cellulaires établies et de fibroblastes primaires dérivés d'embryons a joué un rôle important dans la caractérisation fonctionnelle de gènes déficients chez des souris. Les MEFs se sont révélés très utiles dans l'étude de gènes impliqués dans de grands mécanismes comme la croissance, la sénescence, la transformation, l'apoptose,...

Ces cellules sont aussi susceptibles d'être transfectées par des constructions plasmidiques. Lorsqu'elles sont mises en culture, certaines cellules d'un organisme subissent un nombre fini de générations avant d'entrer dans une étape de sénescence où elles ne se divisent plus. Contrairement à d'autres espèces cellulaires, les MEFs ont tendance à se développer spontanément en une lignée établie « immortalisée » après une période de sénescence (figure 14).

Todaro et Green furent les premiers à décrire ce phénomène en établissant le protocole « 3T3 ». Normalement, le potentiel mitotique des MEFs est de 8 à 10 mitoses. Grâce au protocole 3T3, les MEFs peuvent s'immortaliser et ce nombre de mitoses est alors largement dépassé.

Ce protocole permet donc d'établir des lignées cellulaires et de cultiver des fibroblastes primaires dérivés d'embryons (Todaro et al., 1963).



Time in Culture

Figure 14. Après une prolifération rapide dans les premières générations, la culture entre dans une période de « crise ». Une fois cette période passée, la culture « s'immortalise ».

III. Objectif du mémoire

L'objectif de ce mémoire est de contribuer à l'étude du phénotype de cellules provenant de souris déficientes pour le gène *Maged1*.

Mon travail a comporté deux grandes parties :

- 1) étude de l'effet d'une déficience en *Maged1* sur la croissance et la sénescence des cellules.
- 2) étude de l'effet d'une déficience en Maged1 sur l'apoptose des cellules.

L'étude de l'effet d'une déficience en *Maged1* s'est basée principalement sur la comparaison de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) sauvages et déficients en *Maged1*. Les approches ont été les suivantes :

- comparer la croissance, l'immortalisation de MEFs sauvages (*Maged1^{wt}*) et de MEFs déficients en *Maged1* (*Maged1^{Δ1}*) et établir de lignées stables.
- comparer la sénescence entre des MEFs Maged1^{wt} et des MEFs Maged1^{Δl}.
- tester l'implication de Maged1 dans l'apoptose induite par la liaison du NGF à p75^{NTR}.
- tester l'implication de Maged1 dans l'activation de la voie apoptotique mitochondriale en comparant l'effet d'un traitement à la doxorubicine, un agent pro-apoptotique, sur des MEFs $Maged1^{wt}$ et des MEFs $Maged1^{\Delta l}$.

RESULTATS, DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. <u>Etude de l'effet d'une déficience en *Maged1* sur la prolifération et la sénescence de fibroblastes embryonnaires de souris</u>

La fonction des protéines Mage de type II reste peu connue à ce jour. Les travaux réalisés sur Maged1 et Necdin suggèrent un rôle important de ces protéines dans le contrôle du cycle cellulaire (Barker et al., 2002). Ces travaux ayant été réalisés *in vitro*, une des approches mise en œuvre au laboratoire est l'étude du phénotype de cellules issues de souris déficientes en *Maged1*.

Au début de ce mémoire, un contrôle de l'expression de *Maged1* au cours du cycle cellulaire a été mis en évidence au laboratoire. A partir de cette observation, il paraissait intéressant de se demander si des cellules déficientes en *Maged1* sont affectées dans leur croissance ou dans leur sénescence par rapport à des cellules sauvages. Nous avons réalisé des comparaisons entre des MEFs sauvages (*Maged1^{wl}*) et des MEFs déficients en *Maged1* (*Maged1^{d1}*).

- Pour étudier l'implication de Maged1 dans le contrôle du cycle cellulaire, nous avons :
 - comparé la croissance de MEFs $Maged1^{wt}$ et de MEFs $Maged1^{\Delta 1}$ en cultures individuelles et en culture mixte.
 - comparé l'immortalisation de MEFs $Maged1^{wt}$ et de MEFs $Maged1^{\Delta 1}$.
 - établi des lignées de type 3T3 pour les 2 populations cellulaires.
 - comparé la sénescence entre des MEFs Maged1^{wt} et des MEFs Maged1^{Δ1}.

I.1. Expression de Maged1 au cours du cycle cellulaire

L'expression de Maged1 au cours du cycle cellulaire a été analysée dans des lignées cellulaires établies NIH 3T3 (fibroblastes de souris) qui ont été synchronisées en G_0 par une privation de sérum pendant 24h. Après un apport de sérum, les cellules ont alors été prélevées toutes les 4 heures. Le niveau de protéines Maged1 et le niveau d'ARNm *Maged1* ont été mesurés et rapportés à ceux de la β -actine (représentative de la quantité de protéines) respectivement dans un « Western blot » et dans un « Northern blot » (figures I.1. et I.2.). Pour vérifier la synchronisation des cellules, le niveau de la cycline A a été déterminé par un « Western blot » (figure I.1.). La cycline A présente un pic d'expression en phase G_2/M .



Figure I.1. Expression de la cycline A et de la protéine Maged1 au cours du temps après addition de sérum.

On observe sur la figure I.1. que l'expression de la cycline A varie au cours du temps avec un pic d'expression 16h après addition de sérum. La privation de sérum a donc bien permis de synchroniser les cellules. L'addition de sérum permet aux cellules de rentrer dans le cycle cellulaire (G_1).

L'expression de la protéine Maged1 varie au cours du cycle cellulaire. En G_0 , l'expression relative de Maged1 est d'environ 1,5 et atteint rapidement une valeur de 6 quatre heures après addition de sérum. Cette observation suggère une induction de Maged1 lorsque les cellules entrent dans le cycle cellulaire.



Figure I.2. Expression de l'ARNm *Maged1* et de la protéine Maged1 au cours du temps après addition de sérum.

Un « Northern blot » a ensuite été réalisé sur ces mêmes cellules afin de savoir si l'induction de Maged1 est due à une augmentation de la transcription. La figure I.2. nous montre que l'expression relative de l'ARNm *Maged1* ne varie quasi pas 4 h après addition de sérum alors que l'expression relative de la protéine augmente d'un facteur 4 (1,5 à 6). Maged1 est donc régulé post-transcriptionnellement. On peut supposer alors que l'induction de Maged1 est due soit à une augmentation de la traduction soit à une plus grande stabilité de la protéine.

L'induction de la protéine Maged1 au début du cycle cellulaire ainsi que les données de la littérature nous ont conduit à étudier l'effet d'une déficience en Maged1 sur la prolifération et sur la sénescence des cellules.

I.2. <u>Comparaison de la croissance, de l'immortalisation de MEFs Maged1^{wt} et de MEFs</u> <u>Maged1⁴¹ et établissement de lignées de type 3T3</u>

I.2.1. Cultures de MEFs Maged1^{wt} et de MEFs Maged1^{Δ1}

Les travaux de l'équipe de P. Barker ayant montré un rôle de Maged1 dans le contrôle du cycle cellulaire, il nous a parut utile de comparer la croissance de cellules mutées par rapport à des cellules sauvages.

On a comparé la prolifération au fil des passages, l'immortalisation après une période de sénescence et l'établissement de lignées immortalisées.

Le premier travail fut de dériver des MEFs $Maged1^{wt}$ et des MEFs $Maged1^{\Delta l}$. Les MEFs ont été dérivés d'embryons de souris C57/BL6 sauvages ou déficientes en Maged1.

Etant donné que le gène *Maged1* est situé sur le chromosome X, nous avons dérivé des MEFS à partir d'embryons issus d'un croisement entre une femelle hétérozygote $Maged1^{wt}/Maged1^{\Delta 1}$ et un mâle sauvage $Maged1^{wt}$. En effet, ce croisement donne théoriquement 50% d'embryons sauvages (25% de mâles et 25% de femelles), 25% d'embryons femelles hétérozygotes et 25% d'embryons mâles mutés.

Les embryons d'une femelle hétérozygote $Maged1^{wt}/Maged1^{\Delta 1}$ sont extraits de l'utérus au stade E13.5. Ils sont disséqués stérilement et séparément. La tête de chaque embryon est prélevée pour déterminer le génotype par PCR. La « carcasse » de chaque embryon est traitée à la trypsine de manière à obtenir une suspension cellulaire qui sert à ensemencer une boîte de culture de 75cm² (T75). Deux à trois jours après, la culture devient confluente et on considère cette étape comme le passage 0. Le génotype est déterminé par PCR en utilisant les amorces 76-93 (spécifiques de l'allèle $Maged1^{\Delta 1}$) et 92-172 (spécifiques de l'allèle $Maged1^{wt}$). Le sexe est également déterminé par amplification PCR du gène Zfy situé sur le chromosome Y. Après avoir génotypé les embryons, nous avons maintenu 2 cultures de MEFs : une culture provenant d'un embryon mâle sauvage et une autre provenant d'un mâle muté.

Le protocole 3T3 permet de cultiver des fibroblastes primaires dérivés d'embryons, d'obtenir une immortalisation des cellules et d'établir ainsi des lignées. Ce protocole est dit **3**T**3** car il consiste à récolter les cellules tous les **3** jours et à les ensemencer à la même densité à chaque passage, à savoir **3** x 10^5 cellules pour une surface de 20cm^2 (soit 1,5 x 10^4 cellules par cm²). Les 2 cultures ont été maintenues en triplicat en T75. A chaque passage, les cellules ont été ensemencées à la densité du protocole 3T3 (soit 1,125 x 10^6 cellules par T75). Jusqu'au passage 23, le nombre de cellules a été déterminé par comptage au microscope à contraste de phase (figure I.3.). Au terme de cette culture, on peut estimer que des lignées établies de type 3T3 ont été obtenues pour les deux populations cellulaires.



Figure I.3. Croissance des MEFs $Maged1^{wt}$ et des MEFs $Maged1^{\Delta l}$ pendant les 23 premiers passages. Chaque point est la moyenne de 3 valeurs. Les barres représentent les écart-types. Le trait rouge représente le nombre de cellules ensemencées par T75 à chaque passage (1,125 x 10⁶ cellules).

Lors des premiers passages (P0 à P4), nous avons observé des différences importantes de prolifération entre les 2 cultures. Ces différences pourraient être liées au génotype mais aussi à la technique (cultures individuelles). Au passage 5, les 2 cultures entrent dans une période de sénescence qui se prolongera jusqu'aux passages 7-8. Les cellules surmontent cette période de crise et « s'immortalisent » c'est à dire qu'elles recommencent à se diviser et prolifèrent alors de manière « infinie ». Les 2 cultures s'immortalisent avec un décalage : la culture sauvage vers le passage 10 et la culture mutée vers le passage 13. Après l'immortalisation, les courbes se rejoignent progressivement et, à partir du passage 20, on peut considérer que les 2 types cellulaires prolifèrent à la même vitesse (figure I.3.).

A l'aide de ces premiers résultats, nous avons calculé ensuite le nombre cumulatif de mitoses au cours des 23 premiers passages pour les 2 cultures (tableau I.1. et figure I.4).

Tableau I.1.Nombre cumulatif de mitoses au cours des 23 premiers passages des cultures deMEFs $Maged1^{wt}$ et de MEFs $Maged1^{\Delta l}$

	Maged1 ^{wt}	$Maged1^{\Delta 1}$	
P1	7	2,9	
P2	14,5	7,8	
P3	16,7	11,4	
P4	20	12,8	
P5 *	21,4	14,4	
P6 *	21,4	14,4	
P7 '	21,4	14,4	
P8	23	16,7	
P9	24,5	18,1	
P10 [*]	27,5	19,6	
P11	30,5	21,4	
P12	32,7	23,9	
P13 [*]	35,3	27,3	
P14	37,7	32,2	
P15	39,9	36,9	
P16	41,7	40,3	
P17	43,3	43,4	
P18	45,1	45,7	
P19	46,6	47,9	
P20	48,3	49,7	
P21	50,1	51,7	
P22	52,1	53,7	
P23	53.5	55.6	

* Passages correspondant à la phase de sénescence.
* Passage correspondant à la phase d'immortalisation des MEFs Maged1^{wl}.
* Passage correspondant à la phase d'immortalisation des MEFs Maged1^{Δl}.



Figure I.4. Nombre cumulatif de mitoses des MEFs $Maged1^{wt}$ et $^{Maged1\Delta 1}$ au cours des 23 premiers passages.

Le tableau I.1. et la figure I.4 semblent nous indiquer que nos 2 cultures sont entrées en phase de sénescence (P5-P6) après un nombre différent de mitoses : après environ 21 mitoses pour les MEFs $Maged1^{wt}$ et après environ 14 mitoses pour les MEFs $Maged1^{\Delta 1}$. Cette différence semble être une conséquence directe des différences de prolifération observées en début de culture. Il est probable que ces différences soient liées à la technique ou à des erreurs causées lors du traitement des cellules (comptage, trypsinisation,...) plutôt qu'au génotype. Il est évident que si le nombre de mitoses calculé en début de culture est erroné, les résultats qui en découlent le seront également.

C'est pourquoi, nous avons réalisé ensuite trois expériences pour vérifier ce que nous avons observé dans la figure I.3. :

- 1) une culture mixte de MEFs $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta 1}$
- 2) une comparaison de la croissance des MEFs *Maged1^{wt}* et *Maged1^{Δ1}* jusqu'à confluence à un passage précoce (P3)
- 3) une comparaison de la sénescence entre MEFs $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta l}$

I.2.2. Culture mixte de MEFs Maged1^{wt} et Maged1^{Δ1}

Même en les cultivant de la même manière, dans les mêmes milieux et simultanément, des cultures individuelles peuvent subir des différences en tout genre : temps de trypsinisation, variations de température, stress mécanique dû au pipetage,... Pour supprimer ces différences, nous avons réalisé une culture mixte des MEFs $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{d1}$ selon le protocole 3T3 comme les cultures individuelles.

A la fin du premier passage, les MEFs sauvages et mutés ont été récoltés et mélangés dans un rapport 50/50 (=P1) et le mélange a servi à ensemencer deux boîtes de cultures (T150) à la densité du protocole 3T3.

Nous avons déterminé la proportion des 2 types cellulaires au cours de la culture grâce à une analyse d'ADN en « Southern blot ». En effet, un site PagI situé dans l'exon 8 de l'allèle $Maged1^{wt}$ est absent dans l'allèle $Maged1^{d1}$. Par contre ce dernier contient un site PagI dans le site LoxP 3'. La restriction du locus Maged1 par les enzymes EcoRI et PagI (BspHI) donne donc des fragments de taille différente selon qu'il soit sauvage ou délété.

Les allèles $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta 1}$ ont été détectés après une double digestion EcoRI/PagI et une hybridation par une sonde spécifique de l'exon 3 (figure I.5.).



Figure I.5. Représentation schématique de l'allèle Maged1^{wt} et de l'allèle Maged1^{Δ1}. Après restriction par EcoRI et PagI, la sonde 114-96 s'hybride sur l'exon 3 et met en évidence un fragment sauvage de 3,7kb et un fragment muté de 1,9kb. Le triangle bleu sur l'allèle muté représente le site LoxP.

Les résultats du « Southern blot » sont illustrés dans la figure I.6.



(Maged $I^{\Delta l}$)

Figure I.6. Southern blot réalisé sur des échantillons de MEFs Maged1^{wt}/ Maged1^{Δ1} récoltés au cours de la culture mixte (P1 à P18). Les bandes de 3,7kb et de 1,9kb correspondent respectivement à l'allèle $Maged1^{wt}$ et l'allèle $Maged1^{\Delta 1}$.

Lors des 10 premiers passages, la proportion de MEFs sauvages et mutés ne diffère guère. En effet, une différence de 5% entre le temps de doublement des MEFs Maged1^{wt} et celui des MEFs Maged1⁴¹ aurait créé, après 10 passages (soit après 19,9 mitoses), une différence de (1,05)^{19,9} soit 2,64. Cela signifie que l'on aurait dû observer une différence d'intensité entre les signaux de l'ordre de 2,64. Or nous observons plutôt un rapport de 1/1 entre les bandes correspondant aux allèles $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{AT}$. Jusqu'au passage 10, le temps de doublement des 2 types cellulaires est donc identique. Les différences observables lors des premiers passages en cultures individuelles ne sont pas observables ici. Ces différences ne sont donc pas liées au génotype. Nous ne pouvons donc pas tirer de conclusions à partir des données du tableau I.1. étant donné que la différence de mitoses entre les 2 types de MEFs en début de culture n'est plus observée ici. La figure I.6. nous montre que lorsque les cultures n'entrent donc pas en sénescence après un nombre différent de mitoses comme nous montre le tableau I.1.

Au passage 11, une modification importante du rapport $Maged1^{wt}/Maged1^{\Delta 1}$ a été observée : les MEFs sauvages prolifèrent plus rapidement que les MEFs mutés. Cette différence se marque de plus en plus jusqu'à la disparition de l'allèle muté dans la population cellulaire. Cette période de la culture correspond à la phase d'immortalisation des MEFs $Maged1^{wt}$ qui est plus précoce par rapport aux MEFs $Maged1^{\Delta 1}$ (figure I.3).

Cette différence de prolifération s'explique probablement par un décalage temporel d'immortalisation.

Après ces 2 expériences (cultures individuelles et culture mixte), nous pouvons donc conclure que les cultures sauvage et déficiente en *Maged1* prolifèrent à la même vitesse aussi bien avant qu'après immortalisation des cellules, qu'elles entrent en sénescence après le même nombre de passages et qu'elles s'immortalisent avec un décalage. Sans cette expérience de culture mixte, nous aurions conclu à tort que les MEFs sauvages et mutés prolifèrent différemment en début de culture et que les cellules entrent en sénescence après un nombre différent de mitoses.

I.2.3. Croissance jusqu'à confluence des MEFs $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta 1}$ au cours du passage 3

Lors du passage 3, la croissance jusqu à confluence a été observée sur les deux populations de cellules sur une période de 8 jours. L'intérêt était double : évaluer la densité cellulaire lorsque les cellules sont à confluence et tester la vitesse à laquelle elles arrivent à confluence en début de culture. De cette manière, nous pouvons vérifier si les différences de prolifération observées en début de culture sont liées au génotype ou non.

Nous avons récolté les MEFs $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta l}$ en protocole 3T3 à la fin du passage 2 et nous les avons ensemencés à une densité de 1,4 x 10⁴ cellules par cm² (densité comparable à celle du protocole 3T3) en triplicat et sur 8 plaques de 12 puits (1 plaque par jour).

Chaque jour, les cellules ont été fixées et marquées au crystal violet. Ensuite, le colorant est extrait des cellules et la densité optique, mesurée à 595nm, est représentative du nombre de cellules. Pour que cette méthode soit valable, il fallait s'assurer que la densité optique soit proportionnelle au nombre de cellules. Un test de validité a été réalisé en semant des MEFs à différentes dilutions (0.5, 1, 2, 4, 8, 16 x 10^4 cellules) en duplicat et en les marquant au crystal violet quelques heures après (figure I.7.).



Figure I.7. Densité optique du crystal violet (\log_2) en fonction du nombre de cellules (\log_2). Chaque point est la moyenne de 2 valeurs. Les barres représentent les écarttypes.

Au delà de 2 x 10^4 cellules (1 x 10^4 cellules en log_2), la densité optique du crystal violet est proportionnelle au nombre de cellules. Etant donné que nous ensemençons les MEFs à une densité supérieure à 2 x 10^4 cellules, cette méthode peut être considérée comme valide et utilisée pour comparer la prolifération des MEFs *Maged1^{wt}* et *Maged1^{Δ1}* sur une période de 8 jours consécutifs. Le résultat de ce test de prolifération est illustré dans la figure I.8.



Figure I.8. Prolifération des MEFs $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta 1}$ sur 8 jours au passage 3. Chaque point est la moyenne de 3 valeurs. Les barres représentent les écart-types.

Au passage 3, nous observons d'une part que les MEFs $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta l}$ atteignent la même densité lorsqu'ils sont confluents et d'autre part qu'ils présentent un profil de

croissance similaire. Cela confirme les résultats observés en culture mixte (figure I.6.) : les MEFs $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta l}$ prolifèrent de la même manière en début de culture. Les différences observées lors de la première expérience (figure I.3.) sont donc bien liées à la technique et pas au génotype.

I.3. Comparaison de la sénescence des MEFs Maged1^{wt} et Maged1^{Δ1}

Etant donné que Maged1 participerait à l'arrêt de croissance (Salehi et al., 2000), il se pourrait qu'on observe une différence de sénescence réplicative entre MEFs $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta l}$. La sénescence est définie comme « le ralentissement de l'activité vitale chez des éléments cellulaires ou des organismes âgés ». Les cellules somatiques normales entrent dans un état irréversible d'arrêt de croissance après un nombre fini de divisions. Ce processus, appelé la sénescence réplicative est un mécanisme suppresseur de tumeurs. Il pourrait aussi être lié au vieillissement. Les cellules sénescentes sortent du cycle cellulaire, se maintiennent en phase G_0 et n'entrent plus en phase S après stimulation par des mitogènes physiologiques. On observe que la proportion de cellules sénescentes augmente avec le nombre de passages.

Les fibroblastes sénescents peuvent être détectés histochimiquement par une augmentation de leur activité β -galactosidase à pH 6.0 (Dimri et al., 1995). Ce marqueur n'est pas exprimé par les fibroblastes en présénescence et au repos. On peut détecter la β -galactosidase par le X-gal qui forme un précipité local bleu après avoir été clivé par l'enzyme.

La figure I.3. nous indique que les 2 cultures (sauvage et mutée) sont entrées en sénescence au même moment (P5). Pour confirmer cette observation, un marquage au X-gal à pH 6.0 a été réalisé sur des MEFs $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{41}$ lors des passages 3 à 8. Nous avons récolté les MEFs $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{41}$ à chaque passage et nous les avons ensemencés à la densité du protocole 3T3 (1,5 x 10⁴ cellules par cm²) en duplicat (2 puits par génotype). Nous avons maintenu les cellules pendant 6 jours dans un incubateur (37%, 5% CO₂) afin que les cellules sénescentes accumulent la β -galactosidase. Nous les avons ensuite fixées et incubées avec une solution de X-gal pendant 24h. Le nombre de cellules sénescentes par puit a été compté au microscope à contraste de phase et a ensuite été normalisé par rapport au nombre total de cellules par puit évalué par la méthode du crystal violet (figure I.9.).



Figure I.9. Sénescence des MEFs $Maged1^{wt}$ et des MEFs $Maged1^{A1}$ du passage 3 au passage 8. A chaque passage, le nombre de cellules bleues est rapporté au nombre total de cellules dans le puit (densité optique du crystal violet). Chaque point est la moyenne de 2 valeurs. Les barres représentent les écart-types.

La figure I.9. nous indique que le nombre de cellules β -gal positives dans les 2 populations de MEFs augmente avec le nombre de passages pour atteindre un maximum lors de la période de sénescence (P6 et P7). Au passage 8, ce nombre chute à des valeurs très faibles aussi bien pour les MEFs *Maged1^{wl}* que pour les MEFs *Maged1^{Al}*. Cette diminution brusque correspond à l'immortalisation. On observe donc que la fraction de cellules sénescentes augmente de la même manière dans les 2 types de cultures. Cela confirme donc l'observation faite à partir de la figure I.3.

I.4. Comparaison des propriétés d'adhérence des MEFs Maged1^{wt} et Maged1⁴¹

Après que le processus d'immortalisation ait eu lieu, les cultures de MEFs $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta l}$ se comportaient différemment lors de la trypsinisation des cellules. En effet, les MEFs $Maged1^{\Delta l}$ nécessitaient, pour les détacher de leur support, des temps d'incubation de la trypsine significativement plus longs (> 2 fois) par rapport aux MEFs $Maged1^{wt}$.

Afin de tester une éventuelle différence des propriétés d'adhérence entre les MEFs sauvages et mutés, nous avons réalisé une expérience préliminaire. Les 2 types de cellules ont été ensemencés sur des boîtes de Pétri de microbiologie (dont la surface n'est pas traitée pour la culture cellulaire) à faible densité $(3,8 \times 10^3 \text{ cellules par cm}^2)$.

Après 2 semaines d'incubation, nous avons fixé et marqué les cellules au crystal violet (figure I.10.).



Figure I.10. Photos de 2 boîtes de Pétri (non traitées pour la culture) où des **MEFs** *Maged1^{wt}* (à gauche) et des **MEFs** *Maged1^{Δ1}* (à droite) ont été semés à faible densité puis colorés au crystal violet après 2 semaines d'incubation.

Les photos ci-dessus nous suggèrent que les MEFs $Maged1^{\Delta l}$ possèdent une capacité d'adhésion supérieure aux MEFs sauvages.

Ces quelques observations sont évidemment trop peu nombreuses pour tirer des conclusions. Néanmoins elles attirent l'attention sur l'effet éventuel d'une déficience en *Maged1* sur la capacité d'adhérence des cellules.

II. <u>Etude de l'effet d'une déficience en Maged1 sur l'apoptose</u>

L'équipe de P. Barker a mis en évidence l'implication de Maged1 dans l'apoptose en surexprimant *Maged1* dans des cellules PC12 exprimant p75^{NTR}. Ils ont observé une diminution du nombre de cellules vivantes parmi des cellules transfectées par *Maged1* par rapport à des cellules sauvages (Salehi et al., 2002).

Il paraît évident que ces expériences après transfection sont basées sur un modèle artificiel (*in vitro*). En effet, des cellules qui surexpriment un gène ne constituent pas un modèle physiologique.

Au laboratoire, nous disposons d'un modèle *in vivo* avec lequel nous pouvons étudier l'effet d'une déficience en *Maged1*. En effet, nous pouvons comparer des cellules issues d'animaux déficients en *Maged1* à des cellules provenant d'animaux sauvages utilisées comme contrôle.

Lorsque Maged1 a été identifié comme partenaire de p75^{NTR} dans sa cascade apoptotique initiée par le NGF, nous avons tenté de développer au laboratoire un modèle dans lequel le NGF active la voie apoptotique de p75^{NTR}. Autrement dit un modèle dans lequel TrkA serait absent. Les oligodendrocytes matures en culture présentent ces caractéristiques. Une expérience de Harrington a montré que des oligodendrocytes matures déficients en p75^{NTR} sont plus résistants à l'apoptose induite par le NGF que des oligodendrocytes sauvages (Harrington et al., 2002).

Un des objectifs initiaux de ce mémoire était donc d'étudier l'implication de Maged1 dans l'apoptose induite par le NGF via p75^{NTR} en dérivant des oligodendrocytes provenant de souris $Maged1^{wt}$ et de souris $Maged1^{\Delta l}$ et en comparant l'effet d'une induction d'apoptose par le NGF.

II.1. <u>Comparaison de l'apoptose induite par le NGF via p75 ^{NTR} sur des</u> <u>oligodendrocytes $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta 1}$ </u>

Au cours de ce mémoire, nous avons tenté, avec l'aide du Professeur B. Rogister de l'Ulg, de dériver des oligodendrocytes à partir de cerveaux de souriceaux (P0).

L'expérience devait comporter 5 étapes :

- mise en culture de cellules progénitrices au départ de cortex de souriceaux
- transfert sur lamelles de verre
- différenciation en oligodendrocytes matures
- traitement au NGF
- détection des oligodendrocytes apoptotiques par immunohistochimie

Préalablement, nous devions naturellement nous assurer que les oligodendrocytes obtenus par cette technique expriment Maged1.

Nous avons reçu du Professeur B. Rogister un lysat d'oligodendrocytes différenciés de souriceaux dans lequel nous avons analysé par « Western blot » l'expression de Maged1, p75^{NTR} et de la myelin basic protein (MBP), un marqueur d'oligodendrocytes matures (figure II.1.).



Figure II.1. Western blot réalisé à partir d'un lysat d'oligodendrocytes matures de souriceaux. On détecte l'expression de Maged1, p75 ^{NTR} et de la MBP dans les oligodendrocytes. La présence de protéines dans nos extraits a été confirmée par un anticorps contrôle anti- β -actine. L'actine est une protéine présente en forte quantité dans tous les tissus. Les signaux pour Maged1, p75 ^{NTR} et MBP sont moins forts dans les oligodendrocytes que dans le cerveau à P10 mais le signal pour la β -actine montre qu'il y avait moins de protéines dans le lysat d'oligodendrocytes par rapport à celui du cerveau.

36

La technique de culture et de différenciation d'oligodendrocytes de l'Ulg devait donc nous permettre d'obtenir des oligodendrocytes matures qui expriment Maged1 et p75^{NTR}. La mise au point de ce modèle s'est malheureusement avérée problématique pour diverses raisons.

La première étape consistait à réaliser une culture primaire d'oligodendrocytes à partir de cortex cérébraux de nouveaux nés de souris et à les différencier en oligodendrocytes matures. L'expérience a été recommencée de nombreuses fois et, jusqu'à présent, nous ne sommes pas parvenus à obtenir une culture d'oligodendrocytes différenciés.

Les 2 problèmes principaux que nous avons rencontré étaient les suivants :

- 1) mort des cellules progénitrices.
- 2) problème d'adhérence des cellules lorsqu'on les transférait sur les lamelles de verre.

La multiplication des problèmes dans la mise au point de cette méthode, nous a conduit à imaginer un autre modèle qui pourrait tester l'implication de Maged1 dans l'apoptose par le NGF via p75^{NTR}.

II.2. Transfection de lignées établies de type 3T3 Maged1^{wt} et Maged1⁴¹ par p75 NTR

L'utilisation de lignées établies de fibroblastes de type 3T3 nous paraissait une solution alternative intéressante pour plusieurs raisons :

- 1) nous disposions de lignées établies de fibroblastes de type $3T3 Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta 1}$.
- 2) les lignées établies de fibroblastes permettent d'étudier l'apoptose.
- 3) ces cellules sont susceptibles d'être transfectées par des constructions plasmidiques.
- les lignées établies de fibroblastes de type 3T3 n'expriment pas TrkA (De Bernardi et al., 1996) ce qui permet de se trouver dans un modèle d'activation de la voie apoptotique de p75 ^{NTR} par le NGF.

Comme la littérature nous renseigne que les lignées de fibroblastes de type 3T3 n'expriment pas p75 ^{NTR} (Yaar et al., 2001 ; De Bernardi et al., 1996), nous avons décidé de transfecter nos lignées avec un vecteur d'expression de p75 ^{NTR}.

Les lignées établies de type 3T3 $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{A1}$ ont été ensemencées à une densité de 2 x 10⁴ cellules par cm² sur une plaque de 6 puits. Lorsque les cultures ont atteint 90 à 95 % de confluence, elles ont été transfectées par un vecteur d'expression dérivé de pCMV-SPORT6 (figure II.2.) contenant l'ADNc de p75 ^{NTR} (Mammalian Gene Collection, Invitrogen). Pour pouvoir sélectionner les cellules transfectées, nous avons cotransfecté un vecteur conférant la résistance à la puromycine. En parallèle, nous avons transfecté des lignées de type 3T3 $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{A1}$ par un vecteur contrôle pcDNA1/amp contenant le gène LacZ pour vérifier l'efficacité avec laquelle les lignées se laissaient transfecter et pour avoir un contrôle lors des expériences futures sur les cellules transfectées par p75 ^{NTR}.

Un marquage au X-gal a montré qu'environ 10% à 15% des cellules des 2 génotypes avaient été transfectées par le pcDNA1/amp- β -gal.

Afin de déterminer la concentration idéale en puromycine nécessaire pour sélectionner les cellules transfectées, nous avons traité au préalable les cellules avec différentes concentrations en puromycine. A une concentration de 1 μ g/ml, toutes les cellules étaient mortes après 2 jours. Après transfection, nous avons donc traité les cellules avec 1 μ g/ml de puromycine et ce milieu de sélection fut maintenu jusqu'à ce que les cellules d'un puit non transfecté soient toutes mortes.

La seconde partie du travail a été d'obtenir des clones stables $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta 1}$ transfectés par p75 ^{NTR}. Ces clones ont été obtenus de manière différente pour les cellules sauvages et mutées. En effet, très peu de cellules $Maged1^{wt}$ ont résisté au traitement à la

puromycine et les quelques survivantes ont généré des clones. Six clones *Maged1^{wt}* transfectés par p75 ^{NTR} ont été « piqués » à la pipette et amplifiés. Les cellules *Maged1^{Δ1}* transfectées étaient beaucoup trop nombreuses pour pouvoir « piquer » des clones. Nous avons donc obtenu des clones par « dilutions limites ». Le principe d'une dilution limite est de diluer fortement les cellules et de répartir la dilution sur des plaques de 96 puits de façon à obtenir des puits contenant au maximum une seule cellule qui, en se divisant, donnera un clone. Grâce à cette méthode, nous avons obtenu 30 clones *Maged1^{Δ1}* transfectés par p75 ^{NTR}. Avant de tester l'implication de Maged1 dans l'apoptose par le NGF via p75 ^{NTR}, nous avons analysé l'expression de p75 ^{NTR} dans les clones par « Western blot ».

Le « Western blot » a été réalisé à partir de lysats provenant des 6 clones $Maged1^{wt}$ et de 4 clones $Maged1^{d1}$ (figure II.3.).



Figure II.2. Carte du plasmide pCMV-SPORT6.



Figure II.3. Western blot réalisé sur des lysats de clones $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta 1}$ transfectés par pCMV-SPORT6-p75. A. Western blot sur 6 clones $Maged1^{wt}$ transfectés. Les cellules ont été comptées et le même nombre a été déposé par piste. B. Western blot sur 4 clones $Maged1^{\Delta 1}$ transfectés. La membrane B a ensuite été « strippée » et incubée avec un anticorps anti- β -actine.

Etonnement, nous avons découvert que nos lignées 3T3 non-transfectées par p75^{NTR} (contrôle LacZ) expriment p75^{NTR}.

L'expression de p75^{NTR} détectée par ce « Western blot » dans nos clones est donc au moins en partie endogène. Nous avons donc des clones qui expriment tous p75^{NTR} et pas TrkA (d'après les données de la littérature). Nous avons aussi obtenu des clones *Maged1^{wt}* et *Maged1^{Δ1}* qui surexpriment clairement p75^{NTR}: le clone *Maged1^{wt}* n°1 et le clone *Maged1^{Δ1}* n°1 présentent un signal d'une intensité supérieure aux autres. Au terme de ce mémoire, nous disposons finalement d'un modèle physiologique qui permettra de tester l'implication de Maged1 dans l'apoptose induite par le NGF via le récepteur à neurotrophines p75.

Nous envisageons prochainement de comparer l'effet d'une induction d'apoptose par le NGF sur les clones $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta l}$ qui expriment ou surexpriment (clone $Maged1^{wt}$ n°1 et clone $Maged1^{\Delta l}$ n°1) p75 ^{NTR}.

A.

Β.

II.3. <u>Comparaison de l'effet pro-apoptotique de la doxorubicine sur des MEFs Maged1^{wt}</u> <u>et Maged1⁴¹</u>

Maged1 pourrait être impliqué dans l'induction de l'apoptose via la mitochondrie (Salehi et al., 2002). Si c'est le cas, des cellules $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta 1}$ pourraient présenter des différences de sensibilité à l'apoptose induite par des drogues qui activent la voie mitochondriale.

La doxorubicine est une molécule appartenant à la famille des antracyclines capable d'interférer avec la mitochondrie et d'induire l'apoptose (Szewczyk et al., 2002). Bien que l'effet précis de la doxorubicine ne soit pas clair, on sait que cette drogue génère des radicaux libres, au niveau de la mitochondrie, qui vont activer la protéine pro-apoptotique Bax. Bax migre alors vers la mitochondrie et s'associe au pore MPT (mitochondrial permeability transition). Cette association entraîne la sortie du cytochrome C et de l'AIF (apoptosis-inducing factor) de la mitochondrie vers le cytosol. Ces deux protéines, en coopération avec Apaf-1, active la caspase 9 qui, à son tour, active d'autres caspases entraînant la mort cellulaire.

Nous avons traité à la doxorubicine 4 populations de MEFs issues chacune d'un embryon différent : 2 populations $Maged1^{wt}$ et 2 populations $Maged1^{d1}$.

L'expérience a été réalisée au passage 5 en testant 4 concentrations de doxorubicine.

Les cellules de ces 4 cultures ont été semées dans une plaque 96 puits (10^4 cellules par puit): 3 puits pour chaque concentration de doxorubicine. Le lendemain, nous avons traité les cellules avec 50µM, 17µM, 5,5µM, 1,8µM et 0µM (contrôle positif) de doxorubicine. Quinze heures plus tard, un test de viabilité cellulaire basé sur une méthode colorimétrique a permis de mesurer un pourcentage de survie cellulaire pour chaque concentration en doxorubicine et pour chaque culture.

Nous n'avons pas observé de différence entre les MEFs $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta l}$ (résultats non illustrés) sauf à la concentration de 5,5µM (figure II.4.).



Figure II.4. Pourcentage de survie cellulaire de 2 populations de MEFs $Maged1^{wt}$ et de 2 populations de MEFs $Maged1^{\Delta 1}$ après traitement à la doxorubicine (5,5µM). Les barres représentent l'E.S.M. (erreur standard sur la moyenne).

A cette concentration, on observe que les 2 cultures sauvages $Maged1^{wt}$ ont moins bien résisté au traitement par la doxorubicine que les cellules $Maged1^{\Delta l}$. Cette différence est statistiquement significative. Cette observation conforte l'hypothèse que Maged1 pourrait jouer un rôle dans la cascade apoptotique qui implique la voie mitochondriale.

III. Discussion et perspectives

L'équipe de P. Barker a montré une relation entre MAGED1 et cycle cellulaire. Ils ont surexprimé *MAGED1* dans des cellules rénales d'embryons humains 293 et les ont incubées avec de la bromodéoxyuridine (BrdU). Ils ont observé une diminution de l'incorporation de BrdU parmi les cellules transfectées. Cette observation a conduit les auteurs à suggérer que MAGED1 facilite l'arrêt du cycle cellulaire comme le fait NECDIN (Salehi et al., 2000).

Au laboratoire, une régulation de l'expression de Maged1 a été observée après avoir synchronisé des lignées de fibroblastes NIH 3T3 en G_0 par privation de sérum. En effet, Maged1 est induit lors de l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire suite à l'addition de sérum. Une analyse du niveau d'ARNm a révélé que l'induction de Maged1 n'était pas due à une augmentation de sa transcription. On peut dès lors émettre l'hypothèse que la protéine Maged1 est soit traduite davantage soit plus stable. Nous envisageons de tester cette seconde hypothèse en traitant des cellules bloquées en G_0 avec des inhibiteurs du protéasome.

Cette induction de Maged1 au début du cycle cellulaire semble paradoxale si on la rapporte aux observations de P. Barker qui suggèrent plutôt un rôle de suppresseur de croissance. Cependant, les résultats de P. Barker ont été obtenus par transfection de MAGED1 et en utilisant des lignées établies. Or la surexpression d'un gène après transfection entraîne souvent des niveaux de protéines peu physiologiques. Ensuite, les lignées établies possèdent des caractéristiques différentes des cellules *in vivo* (prolifération « infinie »,...).

Nous avons analysé l'effet d'une déficience en *Maged1* sur la croissance et sur la sénescence de cellules de souris. Le protocole 3T3 nous a permis d'obtenir d'abord des cultures primaires de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs), puis des lignées établies.

Nous n'avons observé aucune différence significative entre le temps de doublement des MEFs $Maged1^{wt}$ et celui des MEFs $Maged1^{\Delta l}$ aussi bien avant qu'après l'immortalisation. Nous avons pu aussi conclure que les deux types cellulaires sont entrés en sénescence après un nombre identique de passages. Nous avons cependant observé que les MEFs $Maged1^{\Delta l}$ se sont immortalisés avec un retard significatif par rapport aux MEFs $Maged1^{wt}$. Ces observations suggèrent qu'une déficience en Maged1 diminue la capacité des MEFs à surmonter la « crise » liée à la sénescence réplicative. Nous avons également évalué la proportion de cellules sénescentes grâce à un test β -galactosidase et avons observé que la fraction de cellules sénescentes augmentait de manière semblable au fil des passages dans les MEFs sauvages et déficients en Maged1. Pour valider ces résultats, il est évident que nos expériences doivent être répétées. Néanmoins le fait qu'une déficience en Maged1 au début du cycle cellulaire vont plutôt dans le sens d'un rôle pro-prolifératif de Maged1.

Au cours de ce mémoire, une observation préliminaire a suggéré que les MEFs déficients en *Maged1* adhéraient mieux à une surface de plastique lisse que les MEFs sauvages. Si une différence d'adhérence s'avérait, nous pourrions envisager de comparer l'expression de protéines impliquées dans l'adhérence des MEFs (fibronectine, intégrines de type β 1,...) dans les MEFs sauvages et mutés.

L'équipe de P. Barker a découvert l'implication de Maged1 dans le signal pro-apoptotique de p75 ^{NTR} (Salehi et al., 2000). Ils ont mis en évidence l'implication de Maged1 dans l'apoptose en surexprimant *Maged1* dans des cellules PC12 exprimant p75 ^{NTR}. Ils ont alors observé que les cellules transfectées par *Maged1* entraient plus en apoptose (Salehi et al., 2002). Comme Maged1 est exprimé dans de très nombreux types cellulaires qui n'expriment pas p75 ^{NTR}, on peut facilement imaginer que Maged1 intervienne dans le contrôle de l'apoptose

indépendamment de p75^{NTR}. Ce rôle pourrait se réaliser via une interaction avec les IAPs, des protéines qui inhibent le signal apoptotique passant par la mitochondrie (Jordan et al., 2001). Si cette hypothèse est exacte, on peut penser que des cellules déficientes en *Maged1* soient moins sensibles à des agents activant l'apoptose par la voie mitochondriale. Au cours de ce mémoire, nous avons pu montrer que des MEFs déficients en *Maged1* sont moins sensibles à l'apoptose induite par la doxorubicine. L'implication de Maged1 dans l'apoptose pourrait également être testée en soumettant une culture mixte *Maged1^{wt}* / *Maged1^{Δ1}* à un stress pro-apoptotique et en suivant le rapport des 2 génotypes dans la culture par une analyse d'ADN en « Southern blot ».

Un des objectifs initiaux de ce mémoire était de tester l'implication de Maged1 dans l'apoptose par le NGF via p75^{NTR} à l'aide d'un modèle physiologique. Ce modèle devait être des oligodendrocytes matures dérivés de souriceaux *Maged1^{wt}* et *Maged1^{Δ1}*. Puisque la culture et la différenciation des oligodendrocytes ont échoué au laboratoire, nous avons imaginé un modèle alternatif : des lignées établies de fibroblastes embryonnaires 3T3 transfectées par p75^{NTR}. En effet, la littérature nous renseignait que ni p75^{NTR} ni TrkA n'est exprimé dans les 3T3. De façon inattendue, nous avons découvert que nos lignées non-transfectées exprimaient p75^{NTR}. Nous envisageons de poursuivre en étudiant l'induction de l'apoptose par le NGF dans des clones de 3T3 *Maged1^{wt}* et *Maged1^{Δ1}* qui expriment ou surexpriment p75^{NTR}.

En conclusion, au cours de ce travail, nous n'avons pas pu mettre en évidence une différence de croissance ou de sénescence entre des fibroblastes embryonnaires de souris sauvages et déficients en *Maged1*. Il semblerait cependant qu'une déficience en *Maged1* diminuerait la capacité des MEFs sénescents à s'immortaliser.

L'observation d'une différence de capacité d'adhérence ouvre un champ de nouvelles expériences qui pourraient nous aider à en apprendre davantage sur Maged1.

Le rôle pro-apoptotique de Maged1 via la mitochondrie a pu être confirmé dans une expérience de traitement de MEFs à la doxorubicine. L'induction de l'apoptose par le NGF dans un modèle cellulaire *Maged1^{wt}* et *Maged1^{d1}* exprimant p75 ^{NTR} et pas TrkA devrait nous permettre d'aborder le rôle de Maged1 dans la cascade apoptotique initiée par p75 ^{NTR}.

Enfin, nous avons pu obtenir un couple de lignées établies de fibroblastes 3T3, l'une déficiente en Maged1 l'autre sauvage. Ces lignées seront d'une grande utilité pour poursuivre l'étude du rôle de Maged1 au niveau cellulaire.

MATERIEL ET METHODES

I. <u>Etude de l'effet d'une déficience en *Maged1* sur la croissance et la sénescence</u>

I.1. <u>Culture de fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs)</u> Maged1^{wt} et Maged1^{Δ1}

I.1.1. <u>Cultures primaires</u>

Les cultures de MEFs $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta 1}$ ont été isolées à partir d'embryons de souris issus d'une même portée au 13^{eme} jour et demi de la gestation (E13.5). Ce jour est déterminé en fonction du bouchon vaginal observé 12 h après le coït (E0.5).

La femelle est sacrifiée par dislocation cervicale et passée à l'alcool pour limiter les contaminations. Pour dériver les MEFs, nous avons suivi le protocole suivant :

- Sous hotte stérile, prélever l'utérus contenant les embryons. Déposer l'utérus dans une boîte de Pétri, contenant du PBS stérile à 4°C.
- Isoler chaque embryon dans un puit d'une plaque de 12 puits contenant du PBS stérile.
- Disséquer les embryons un par un en enlevant les tissus mous (foie, cœur et autres viscères) de manière à ce qu'il ne reste plus que la carcasse.
- Couper les têtes qui serviront au génotypage des embryons (voir plus loin).
- Laver 2x les carcasses avec 1ml de PBS. Remplacer le PBS par 1ml de trypsine/EDTA (Gibco).
- Couper en petits morceaux les carcasses avec des ciseaux (passer les ciseaux à l'éthanol puis à la flamme entre chaque embryon pour éviter de contaminer les cultures entre elles!) puis pipeter plusieurs fois à la micropipette de 1ml pour dissocier les cellules le plus possible. Incuber 15' à 37°C. Repipeter et réincuber 15' à 37°C.
- Neutraliser la trypsine avec 1ml de DMEM/10% FBS.
- Filtrer chaque suspension cellulaire (filtres Falcon de 70μm). Laver les filtres avec 10ml de DMEM/10% FBS. Centrifuger 5' à 1000rpm. Eliminer le surnageant et resuspendre le culot cellulaire dans du DMEM/10% FBS contenant 100 unités par ml de Pénicilline/Streptomycine (Gibco).
- Ensemencer une T75 (75cm²) par embryon et incuber à 37°C, 5% CO₂.
- Après 24h, changer le milieu pour enlever les débris. Les cultures deviennent confluentes après 2 à 3 jours. On considère cette étape comme le passage 0.

Après génotypage des embryons, nous avons maintenu les cultures provenant d'embryons mâles sauvages et mutés.

Matériel

DMEM : Dulbecco's modified eagle media (Gibco). FBS: Fetal Bovine Serum (Gibco). PBS : dissoudre 1 tablette de PBS (Sigma) dans 200ml d'H₂O distillée puis autoclaver.

I.1.2. Obtention de cultures établies - protocole 3T3

Le protocole 3T3 consiste à passer les cellules tous les 3 jours et à les ensemencer à une densité de $1,5 \ge 10^4$ cellules par cm². Ce protocole permet d'obtenir des cultures établies au départ de cultures primaires :

- A la fin du passage 0, laver 1x les MEFs au PBS, trypsiniser et neutraliser avec du DMEM/10% FBS/Péni/Strepto.
- Centrifuger 5' à 1000rpm et resuspendre dans un volume adéquat de DMEM/10% FBS/Péni/Strepto.

- Prélever 50µl de la suspension cellulaire dans un eppendorf et ajouter 50µl de bleu trypan qui marque les cellules mortes. Compter les cellules vivantes à l'aide d'un hémocytomètre.
- Ensemencer les cellules à une densité de 1,5 x 10⁴ cellules par cm² dans 3 T75 par génotype. Au passage suivant, trypsiniser, compter puis « pooler » les cellules des 3 T75. Réensemencer 3 nouvelles T75. Recommencer tous les 3 jours.

I.1.3. <u>Culture mixte de MEFs Maged1^{wt}/Maged1⁴¹ en protocole 3T3 et suivi du rapport des</u> génotypes par une analyse de l'ADN en « Southern blot »

a) Culture mixte

Nous avons ensemencé une suspension cellulaire composée de 50% de MEFs $Maged1^{wt}$ (P1) et de 50% de MEFs $Maged1^{\Delta 1}$ (P1) dans 2 T150 (162cm²) à la densité de 1,5 x 10⁴ cellules par cm² (protocole 3T3). Nous avons maintenu ces cellules en culture en suivant le protocole 3T3 (décrit plus haut). A chaque passage, le surplus de cellules a été centrifugé et le culot cellulaire a été lysé dans 500µl de tampon de lyse (+ protéinase K à 100µg/ml) dans un bain à 56°C toute la nuit.

Un échantillon de la suspension cellulaire de départ, contenant le même nombre de cellules que celui ensemencé dans les 2 T150, a été récolté, centrifugé et lysé comme décrit ci-dessus. Il représente le point de départ (T_0) pour le suivi de la culture mixte par Southern blot.

b) Southern blot

1. Echantillons d'ADN

A partir des lysats cellulaires obtenus lors des passages de la culture mixte $Maged1^{wt}/Maged1^{d1}$, nous avons récupéré l'ADN de la façon suivante :

- Extraire l'ADN avec 1 volume de phénol-CIAA. Agiter vigoureusement. Centrifuger 5' à 13000rpm. Récupérer la phase aqueuse.
- Ajouter 500µl de chloroforme. Agiter vigoureusement. Centrifuger 5' à 13000rpm. Récupérer la phase aqueuse.
- Précipiter l'ADN avec 1 volume d'isopropanol. Prélever l'ADN précipité à l'aide d'un « tips » et le transférer dans un eppendorf propre. Laver l'ADN à l'éthanol 70% et resuspendre dans 200µl de tampon TE. Laisser l'ADN se redissoudre à température ambiante puis garder à -20°C.

2. Digestion par EcoRI et PagI (BspHI)

Traiter tous les échantillons à la RNAse (20µg/ml) pendant 10' à 37°C.

Déposer 1µl de chaque échantillon sur un gel d'agarose 1% afin d'évaluer la quantité d'ADN présente dans tous les échantillons. Digérer un volume de chaque échantillon correspondant à 20µg d'ADN.

Digestion (400µl au total) : ADN	x μl
Tampon 10X (Fermentas)	40 µl
EcoRI	5 µl
PagI	5 µl
H_2O	jusqu'à 400 µl

Digérer pendant 1h à 37°C.

Mettre 10µl sur un gel d'agarose 1% pour vérifier que tout est bien digéré.

Extraire les ADN avec un volume de phénol-CIAA. Agiter vigoureusement. Centrifuger 5' à 13000rpm. Récupérer la phase aqueuse et la précipiter en ajoutant $1/10^{\text{ème}}$ du volume d'acétate de sodium 3M (pH 5.2) et 2 volumes et demi d'éthanol absolut. Placer 20' sur glace. Centrifuger 15' à 13000rpm. Aspirer délicatement le surnageant. Resuspendre le culot dans 20µl de tampon TE. Garder à -20°C.

3. Electrophorèse

Déposer 1µl de chaque échantillon sur un gel d'agarose 1% pour vérifier que l'ADN est bien redissout.

Déposer les 19 µl de chaque échantillon et le marqueur de poids moléculaire 1kb (Invitrogen) sur un grand gel d'agarose 1% (250ml) et faire migrer à 40 Volts O/N.

Prendre une photo du gel avec une latte graduée à côté du marqueur de poids moléculaire.

4. Transfert alcalin sur membrane

Préparer 4 litres de NaOH 0,4N.

Dénaturer le gel dans du NaOH 0,4N pendant 30' sur un plateau agitateur.

Pré-humidifier la membrane en nylon Hybond N^+ (Amersham BIOSCIENCES) dans de l'eau distillée pendant quelques secondes.

Equilibrer la membrane dans du NaOH 0,4N pendant 10' à 15'.

Réaliser un montage de transfert :

- déposer un support entouré de papier Whatman dans une bassine remplie de NaOH 0,4N.
- humidifier le papier Whatman avec du NaOH 0,4N et enlever les bulles en faisant rouler une pipette sur le papier.
- déposer le gel sur le papier Whatman et faire rouler une pipette sur le gel pour enlever les bulles.
- déposer la membrane sur le gel et enlever les bulles.
- déposer 2 papiers Whatman, pré-humidifiés dans du NaOH, sur la membrane et enlever les bulles.
- recouvrir le tout avec du papier film et découper le papier film autour du montage gelmembrane-papiers Whatman.
- placer une pile de serviettes ou de papiers absorbants et un poids sur le montage.

Laisser transférer par capillarité O/N.

Après transfert, noter les puits sur la membrane et laver 2x la membrane dans un excès de SSC 2X.

Fixer la membrane aux U.V. : 1,2 x $10^5 \mu$ W-sec/cm² ou 0,12 Joules/cm² (1 Joule = $10^6 \mu$ W-sec) ou la cuire 2h à 80°C.

5. <u>Hybridation avec sonde marquée au ³²P</u>

Réhumidifier la membrane 30" dans du SSC 2X.

Préhybrider la membrane dans une solution d'hybridation pendant quelques heures à 65°C. Marquer la sonde (kit RadPrime DNA Labeling System de chez Invitrogen) : - 1µl d'ADN (sonde Maged1 114-96 (voir résultats p.30) 100ng/µl)

- 19 μl d'H₂O

Dénaturer 5' dans de l'H₂O bouillante.

- 20 µl de Random primers Buffer 2,5X
- 1 μl dATP 0,5mM
- 1 μl dGTP 0,5mM
- 1 μl dTTP 0,5mM
- $5 \,\mu l \, dCTP^{32}$ (Amersham)
- 1µl de Klenow

A 37°C 10'.

- 5 µl de Stop Buffer

Déposer la sonde sur une colonne MiniQuick Spin RNA Columns (Roche) pour éliminer les ³²P non incorporés. Centrifuger 4' à 2800rpm.

Ajouter 150 µl d'ADN de sperme de saumon (2mg/ml) et 700 µl d'H₂O à la sonde. Dénaturer 5' dans de l'H₂O bouillante.

Hybrider à 65°C O/N.

Laver 2x 30' au SSC 2X /SDS 1% et 2x 30' au SSC 0,2X/SDS 0,1%.

Déposer la membrane sur un papier Whatman humidifié avec du SSC 2X et la sceller dans du papier film.

Placer un écran Cyclone « Storage Phosphor Screen » MP (Packard) sur la membrane pendant 24h à l'abri de la lumière. Scanner cet écran à l'aide du Cyclone « Storage Phosphor Screen » (Packard). Adapter le temps d'exposition si nécessaire.

Matériel

Tampon de lyse : 100mM Tris HCl pH 8, 1mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS.

CIAA : chloroforme/alcool isoamylique.

Tampon TE : 10mM Tris, 1mM EDTA.

Tampon 10X (Fermentas) : 50mM Tris HCl pH7.5, 10mM MgCl₂, 100mM NaCl, 0.1mg/ml BSA.

SSC: pour 1 litre de SSC 20X : 175.3g NaCl, 88.2g citrate de sodium, ajuster à pH7 avec du NaOH 10N. Solution d'hybridation : 8.46ml d'H₂O distillée, 1mg de dextran sulfate, 1ml de SDS 10%, chauffer 30' à 65° C puis ajouter 0.58mg de NaCl et chauffer encore 15'.

SDS = sodium dodécyl sulfate.

I.1.4. <u>Test de prolifération cellulaire par un marquage au crystal violet</u> (Dannenberg et al., 2000)

Nous avons réalisé un test pour comparer la prolifération des MEFs $Maged1^{wt}$ et des MEFs $Maged1^{\Delta 1}$ sur une période de 8 jours.

Lors d'un passage, ensemencer 6 puits (3 par génotype) par plaque de 12 puits à une densité de 2,5 x 10^4 cellules par puit (compter une plaque par jour).

Chaque jour, fixer et colorer une plaque de la façon suivante :

- Laver 1x les cellules au PBS et fixer 5' au formaldéhyde 4%.
- Colorer les cellules au crystal violet (Sigma) 0,1% pendant 30'.
- Laver 2x à l'H₂O distillée et laisser sécher à l'air libre.

Après 8 jours, ajouter 1ml d'acide acétique 10% dans chaque puit et prélever 100µl pour mesurer la DO à 595nm.

I.1.5. <u>Détection de l'activité β-galactosidase des MEFs sénescents</u> (Dimri et al., 1995)

A chaque passage, ensemencer les MEFs $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta 1}$ à une densité de 1,5 x 10⁴ cellules par cm² (protocole 3T3) en duplicat sur une plaque de 12 puits.

Incuber les cellules 6 jours dans un incubateur à 37°C, 5% CO₂.

Laver 1x au PBS. Fixer 3 à 5' dans du formaldéhyde 3%. Laver 2x au PBS.

Incuber O/N à 37°C dans la solution de marquage suivante : 1mg/ml de X-gal, 40mM de tampon acide citrique mis à pH 6.0 avec Na₃PO₄, 5mM de K₃FeCN₆, 5mM de K₄FeCN₆, 150mM de NaCl et 2mM de MgCl₂.

Post-fixer 5' dans du formaldéhyde 3% et garder les cellules dans du PBS contenant 0,1% de glutaraldéhyde et 0,02% d'azide de sodium.

Compter le nombre de cellules bleues par puit au microscope à contraste de phase puis marquer chaque puit au crystal violet (voir ci-dessus) pour rapporter le nombre de cellules bleues au nombre total de cellules dans le puit.

Matériel

PBS 10X pH7.4 : pour 1 litre : 2g KH₂PO₄, 11.5g Na₂HPO₄.2H₂O, 80g NaCl, 2g KCl. X-gal : 25mg dans 1,25ml de diméthylformamide (= 250mM).

I.2. Génotypage des souris par PCR

1. Extraction d'ADN à partir de têtes d'embryons et queues de souris (E13.5)

Ajouter 200µl de tampon de lyse 1X par échantillon. Incuber 5' à 95-100°C. Centrifuger quelques secondes. Ajouter 10µl de protéinase K ($100\mu g/ml$). Mélanger et centrifuger quelques secondes. Incuber O/N à 56°C. Inactiver la protéinase K à 95°C pendant 5'. Centrifuger 10' à 13 000rpm. Utiliser 1µl d'ADN par PCR de 25µl.

2. <u>PCR</u>



La figure 1 illustre l'emplacement des amorces sur les allèles Maged1 sauvage et muté.



Figure 1. Représentation schématique de l'emplacement des paires d'amorces 76-93 et 92-172 sur les allèles $Maged1^{wt}$ et $Maged1^{\Delta l}$. Les amorces 76-93 sont trop éloignées pour pouvoir amplifier un fragment d'ADN sur l'allèle sauvage. Dans l'allèle muté, les exons 3 et 13 sont rapprochés et une amplification PCR peut avoir lieu. Les amorces 92-172 amplifient un fragment d'ADN situé dans l'exon 6 présent dans l'allèle sauvage mais absent dans l'allèle délété.

Les figures 2 et 3 illustrent les PCR Maged1 et la PCR sexe.



Amorces Zfy 11-12

Amorces 76-93

Figure 2. Résultats de PCR sur l'ADN de têtes d'embryons issus du croisement entre une femelle +/- et un mâle sauvage (gel d'agarose 1%, marqueur de poids moléculaire 1kb (Invitrogen)). A. PCR sexe. Les amorces Zfy 11 et 12 amplifient un fragment d'ADN de 200bp situé sur le chromosome Y. Les embryons 1 et 4 sont des mâles. Les embryons 2 et 3 sont des femelles.

B. Les amorces 76-93 amplifient un fragment d'ADN de 1kb sur l'allèle muté *Maged1* mais n'amplifient pas l'allèle sauvage. L'embryon 4 est muté.



Amorces 92-172

Figure 3. Résultat de PCR sur têtes d'embryons issus du croisement entre une femelle +/- et un mâle sauvage (gel d'agarose 1%, marqueur de poids moléculaire 1kb). Les amorces 92-172 amplifient un fragment de 300bp sur l'allèle sauvage *Maged1* mais n'amplifient pas l'allèle muté. Les embryons 1, 2 et 3 sont sauvages. Les embryons 2 et 3 sont donc des femelles sauvages. L'embryon 1 est un mâle sauvage. L'embryon 4 n'a pas l'allèle sauvage, c'est un mâle hémizygote.

Matériel

1kb → 500bp →

Tampon de lyse 10X (pour 50ml): 100mM Tris HCl pH 8, 500mM KCl, 10% Tween-20 ou 1% Triton X-100. Taq polymérase et tampon 10X : Biotools.

Oligos Maged1:

- oligo 76 (exon 13): 5'-CATGCCACTCTCTCAGTCAACAGG- 3'
- oligo 93 (exon3): 5'-GAC-CAG-CGC-AGG-TAT-CTC- 3 '
- oligo 92 (exon 6): 5'-CAG-TGA-TCT-GGC-CAA-ACC- 3'
- oligo 172 (exon6): 5'-GGTGAATTCATTATCTCAGATTAGGTGAGGGTCG-3'

Oligos détermination du sexe :

oligo Zfy 11 : 5'-GTA-GGA-AGA-ATC-TTT-CTC-ATG-CTG-G-3'
 oligo Zfy 12 : 5'-CTT-TTG-AGT-GCT-GAC-GGG-TGA-CGG-3'

II. Etude de l'effet d'une déficience en Maged1 sur l'apoptose

II.1. Mise en culture et différenciation d'oligodendrocytes

- Préparer le gradient de Percoll : 9ml de Percoll (Amersham) , 1ml de PBS 10X, 10ml de PBS HEPES 25mM. Centrifuger 30' à 25000g (12200rpm pour rotor JA-20).
- Prélever les cortex cérébraux de 10 à 15 souriceaux (P0-P3) et éliminer les méninges dans 5ml de PBS glucose 0,45% (1,5ml de PBS glucose 30% dans 100ml) en utilisant des instruments stériles.
- Laver 2x les cortex avec du PBS HEPES puis resuspendre dans 8ml avec du PBS HEPES.
- Homogénéiser en pipetant doucement avec une pipette de 5ml puis à l'aide d'une seringue avec des aiguilles de 22G et 27G pour obtenir une suspension cellulaire.
- Passer la suspension sur un filtre de 70μm (Falcon) et déposer la suspension résiduelle sur le gradient.
- Centrifuger 15' à 25000g (122000rpm pour JA-20) en ôtant le frein de la centrifugeuse.
- Eliminer la partie supérieure du gradient y compris les débris et prélever +/- 9ml de la partie centrale au dessus des hématies (figure 4).



Figure 4. Représentation schématique des fractions après centrifugation du gradient de Percoll. On trouve les cellules progénitrices gliales dans la 3^{ème} fraction, au dessus des hématies.

- Amener le volume à 35ml avec du PBS HEPES et centrifuger à 1200rpm pendant 10'.
- Eliminer le surnageant (on ne voit pas de culot) et resuspendre délicatement dans 14ml de DMEM. Centrifuger à 1000rpm pendant 10'.
- Préparer le milieu complet : DMEM + supplément N_1 (ou N_2) + 30% de milieu conditionné par un neuroblastome B104 (centrifugé 5' à 1000rpm avant utilisation) + biotine 10ng/ml.

- Eliminer le surnageant et resuspendre dans 1ml de milieu complet puis ajouter 4ml de milieu complet et ensemenser une T25.
- Incuber pendant 24h à 37° C, 5% CO₂ en agitant de temps en temps.
- Agiter la culture, reprendre le surnageant et le transférer dans une nouvelle T25. Au bout de 3 jours, les sphères apparaissent.
- Transférer le surnageant sur une lamelle en verre à 4 puits (Nalge Nunc International) coatée à la poly-ornithine (0,1mg/ml 45', rincer 2x à l'eau, 1x au PBS, laisser le PBS jusqu'à l'ajout des sphères). Cultiver les sphères pendant 3 jours dans du milieu complet. Les cellules sortent des sphères.
- Au bout de 3 jours, remplacer le milieu complet par du DMEM + 0,5% de FBS + supplément N_1 (ou N_2) + biotine 10ng/ml. Les oligodendrocytes se différencient entre 3 et 7 jours.

Matériel

 $PBS\ 10X: dissoudre\ 1\ tablette\ de\ PBS\ (Sigma)\ dans\ 20ml\ d'H_2O\ distillée\ puis\ filtrer\ (filtres\ Millex\ de\ 0,22\mu m).$ Milieu B104: milieu conditionné par un neuroblastome de rat B104:

- pour cultiver le neuroblastome: DMEM + FBS 10%.

- pour conditionner le milieu: semer à densité faible (600 000 cellules/ boîte de Pétri 10cm), laver 2x au PBS après 24h, incuber 3 jours dans DMEM + N_2 , récupérer le surnageant après 3 jours, le centrifuger 5' à 1000rpm, filtrer (0,22µm), aliquoter et garder à -20°C.

II.2. Western blot

1. Echantillons protéiques

Pour les cellules (MEFs) : centrifuger les suspensions cellulaires 5' à 1000rpm. Aspirer le surnageant. Garder le culot sur glace. Lyser le culot dans du tampon pour protéines 2X (100 μ l pour 10⁶ cellules). Diminuer la viscosité du lysat en le passant dans une seringue avec une aiguille de 27G puis de 30G. Garder à -70°C.

Pour les organes : disséquer les organes sur glace, peser et homogénéiser avec un dounce dans 10 volumes de tampon pour protéines 2X. Centrifuger 25' à 12000rpm à 4°C. Aliquoter et garder à -70°C.

2. Migration sur gel de polyacrylamide SDS-Page

Dénaturer 15 µl de chaque lysat pendant 2' à 100°C. Refroidir sur glace. Centrifuger 30''. Charger 10µl de lysat par piste et 10µl de marqueur de poids moléculaire Dual Color (BIO-RAD) sur un gel d'acrylamide SDS-Page 8%. Faire migrer 1h à 150 Volts.

3. Transfert

Tremper une membrane PVDF (Hybond-P de Amersham BIOSCIENCES) dans du méthanol pendant 1'. Rincer abondamment la membrane dans l'eau puis la tremper dans la solution ANODE I.

Enlever délicatement la première plaque de verre.

Placer la membrane sur le gel et passer une pipette sur la membrane pour éviter les bulles.

Tremper 3 papiers Whatman de la taille de la membrane (8,5cm/6cm) dans la solution ANODE I et les placer sur la membrane. Passer une pipette sur le montage.

Tremper 3 papiers Whatman dans la solution ANODE II et les déposer sur les 3 papiers Whatman précédents. Passer une pipette sur le montage.

Retourner le montage et enlever délicatement la deuxième plaque de verre sur laquelle se trouve le gel.

Tremper 3 papiers Whatman dans la solution CATHODE et les placer sur le gel. Passer une pipette sur ces 3 papiers. Déposer le montage avec les papiers imbibés de solution CATHODE vers le haut dans l'appareil de transfert (la cathode se trouve dans le couvercle de l'appareil). Laisser transférer 45'.

Incuber la membrane dans 25ml de solution de blocage pendant 1h à température ambiante. Incuber la membrane avec l'anticorps primaire dilué dans 10ml de solution de blocage.

Incuber O/N à 4°C sur plateau agitateur.

Laver 3 x 5' au TBS-Tween.

Incuber la membrane avec l'anticorps secondaire dilué dans 10ml de solution de blocage.

Incuber 1h à température ambiante sur plateau agitateur.

Laver 3 x 5' au TBS-Tween et 1 x 10' au TBS 1X.

Incuber la membrane dans 4ml de substrat chemiluminescent pendant 5'. Exposer 30'' (Hyperfilm ECL (Amersham)) puis développer. Si nécessaire, adapter le temps d'exposition.

Pour incuber éventuellement la membrane avec un second anticorps primaire, enlever d'abord le premier signal sur la membrane (« stripping ») en procédant de la façon suivante :

- laver 4 x 5' la membrane au PBS-T.
- incuber 30' à 50°C dans la solution de tampon de « stripping ».
- laver 6 x 5' au PBS-T.
- incuber ensuite la membrane dans 25ml de solution de blocage pendant 1h à température ambiante puis incuber avec l'anticorps primaire comme décrit ci-dessus.

Matériel

Tampon pour protéines 2X (pour 10ml): 2.5ml de Tris HCl (pH6.8), 4ml de SDS 10%, 0.5ml de Bromophénol Blue 0.1%, 2ml de glycérol, 0.5ml de 2-mercaptoéthanol, 0.5ml d'H₂O distillée.

Gel de 8% (pour 10ml) : 2ml d'acrylamide 40% (BIO-RAD), 5.35ml d' H_2O , 2.5ml de Tris 1.5M (pH 8.8), 0.1ml de SDS 10%, 0.1ml d'APS 10% et 0.008ml de TEMED.

« Stacking » gel (pour 3ml) : 0.3ml d'acrylamide 40%, 1.9ml d' H_2O , 0.75ml de Tris 1M (pH 6.8), 0.03ml de SDS 10%, 0.03ml d'APS 10% et 0.003ml de TEMED.

Solution ANODE I : 30mM Tris Base (3.63g/l), 10% méthanol.

Solution ANODE II : 300mM Tris Base (36.3g/l), 10% méthanol.

Solution CATHODE : 25mM Tris Base (3.03g/l), 40mM aminohexane acid (5.25g/l), 10% méthanol, 0.01% SDS (1ml de 10%).

Solution de blocage : 5% de lait en poudre (Gloria) dans du TBS-T.

TBS : pour 1 litre de TBS 10X : 24.2g de Tris Base, 80g de NaCl, ajuster à pH 7.6 avec de l'HCl.

TBS-T : 1% de Tween 20 (Sigma) dans TBS 1X.

Anticorps primaires :

- AC anti-NRAGE/MAGED1 polyclonal de lapin dil 1/1000 dans solution de blocage.

- AC anti-human p75 polyclonal de lapin (Promega) dil 1/1000 dans solution de blocage.

- AC anti-MBP polyclonal de chèvre (Santa Cruz Biotechnology) dil 1/1000 dans solution de blocage.

- AC anti- β -actine monoclonal de souris (Sigma A-5316) dil 1/1000 dans solution de blocage. Anticorps secondaires :

Anticorps secondaires :

- HRP-AC anti-lapin de chèvre (Dako) dil 1/5000 dans solution de blocage.

- HRP-AC anti-chèvre de lapin (Dako) dil 1/3500 dans solution de blocage.

- HRP-AC anti-souris de chèvre (Dako) dil 1/3500 dans solution de blocage.

Substrat chemiluminescent : SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE).

PBS-T: 0,1% de Tween 20 dans PBS 1X.

Tampon de « stripping »: 62.5mM Tris HCl (pH6.8), 2% SDS, 100mM 2-mercaptoéthanol.

II.3. Transfection des lignées établies de type 3T3 Maged 1^{wt} et Maged $1^{\Delta 1}$ par pCMV-SPORT6-p75

Les lignées établies de type 3T3 ont été transfectées avec :

- 1) pCMV-SPORT6-p75 (Invitrogen) et pGK-puromycine (marqueur de sélection)
- 2) pcDNA1/amp-βgal et pGK-puromycine : contrôle de transfection.

Un jour avant la transfection, ensemencer chacune des 2 cultures (lignées établies de type 3T3 *Maged1^{wt}* et *Maged1^{Δ1}*) à une densité de 2 x 10^5 cellules par puit sur une plaque de 6 puits dans du DMEM/10% FBS sans antibiotique et attendre que la culture atteigne 90 à 95% de confluence pour transfecter. Prévoir un puit non transfecté qui servira comme contrôle pour la sélection à la puromycine et 2 puits transfectés par pcDNA1/amp-ßgal et pGKpuromycine (un pour faire un marquage au X-gal (contrôle de transfection) et un qui servira comme contrôle négatif (non transfecté par p75^{NTR})). Préparer les complexes ADN-lipofectamineTM 2000 (Invitrogen) dans un rapport 4/10 :

- diluer 4µg de pCMV-SPORT6-p75 ou pcDNA1/amp-βgal + 0,5µg de pGKpuromycine dans 250µl d'optiMEM + GlutaMAX (Gibco) et incuber 5' à température ambiante.
- diluer 10µg de lipofectamine (10µl) dans 250µl d'optiMEM + GlutaMAX et incuber 5' à température ambiante.
- combiner les dilutions ADN-lipofectamine et incuber 20' à température ambiante pour permettre la formation des complexes.

Ajouter 500µl dans chaque puit contenant 2ml de milieu.

Incuber les cellules à 37°C, 5% CO₂. Changer le milieu après 24h.

Deux jours après la transfection, réaliser un marquage au X-gal sur un des deux puits contenant les cellules transfectées par pcDNA1/amp-Bgal-pGK puromycine :

- laver les cellules 1x au PBS.
- _ fixer 5' les cellules dans la solution de fixation (B).
- laver 3 x 5' les cellules avec 10ml de solution de lavage (C).
- remplacer la solution de lavage (C) par la solution de marquage (D) et incuber à 37°C jusqu'à ce que les cellules transfectées deviennent bleues.
- laver 3 x 10' avec 10ml de solution de lavage (C).

Matériel

Solution A : 100mM de tampon phosphate de potassium pH7.4.

Solution B : 0.2% de glutaraldéhyde dans la solution A, contenant 5mM EGTA et 2mM de MgCl₂.

Solution C: 0.01% de déoxycholate de sodium et 0.02% de Nonidet P-40 dans la solution A, contenant 5mM EGTA et 2mM de MgCl₂.

Solution D : 0.5mg/ml de X-gal, 10mM de K₃FeCN₆ et 10mM de K₄FeCN₆ dans la solution C.

Trois jours après la transfection, traiter les cultures avec 1µg/ml de puromycine. Cette concentration a été déterminée préalablement par un test sur des cellules non transfectées traitées avec 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.5 et 2 µg/ml.

Changer régulièrement le milieu et maintenir un milieu de sélection jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de cellules vivantes dans le puit contrôle.

Les transfectants stables ont ensuite été clonés par dilution limite. Les cellules ont été fortement diluées de façon à pouvoir ensemencer des plaques de 96 puits à une densité de : 3, 1.8, 1.2, 0.8, 0.5 et 0.3 cellules par puit (1 plaque par dilution). Incuber à 37°C jusqu'à l'apparition de clones (minimum 1 semaine). Trypsiniser, récolter et amplifier les clones qui ont recouvert les puits.

II.4. Induction d'apoptose par la doxorubicine sur des MEFs Maged1^{wt} et Maged1⁴¹

Nous avons induit l'apoptose sur les MEFs sauvages et mutés en utilisant 4 concentrations différentes en doxorubicine : 50μ M, 17μ M, $5,5\mu$ M, $1,8\mu$ M. Plutôt que de mesurer un taux de mort cellulaire, nous avons mesuré un taux de survie à l'aide du kit CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega). Le principe de cette méthode consiste en la conversion d'un sel de tétrazolium (MTS) en du formazan, soluble dans le milieu de culture, par les enzymes déshydrogénases des cellules vivantes. La quantité de formazan produit est proportionnelle au nombre de cellules vivantes et son absorbance peut être mesurée à 490nm.

Premièrement, ensemencer 5 puits pour chaque culture de MEFs (1 puit pour chaque concentration en doxorubicine et 1 puit non traité (contrôle positif)) à une densité de 10^4 cellules par puit sur une plaque de 96 puits. Réaliser chaque expérience en triplicat.

Etant donné que la doxorubicine absorbe à 490nm, prévoir un « blanc » pour chaque concentration en doxorubicine (duplicat) ainsi qu'un « blanc » sans doxorubicine (DO à soustraire du contrôle positif).

Le lendemain, traiter les cellules avec les 4 concentrations de doxorubicine. Quinzaine heures plus tard, réaliser le test colorimétrique :

- mélanger 100µl de solution PMS (electron coupling reagent) dans 2ml de solution MTS.
- déposer 20µl du mélange MTS/PMS dans chaque puit contenant 100µl de milieu.
- incuber 1 à 4h à 37°C, 5% de CO₂.
- ajouter 25µl de SDS 10% dans chaque puit pour stopper la réaction et mesurer la densité optique à 490nm.

Calculer toutes les moyennes (moyenne pour chaque culture et pour chaque concentration en doxorubicine, moyenne des « blancs »,...).

Le taux de survie cellulaire par puit a été calculé de la façon suivante :

Pourcentage de survie cellulaire : $DO (x \mu M) - blanc (x \mu M) x 100$ DO (0 μ M) - blanc (0 μ M)

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Barker, P.A. & Salehi, A. The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis and neurogenetic disease. *J Neurosci Res* 67(6), 705-712 (2002).
- Beattie, M.S., Harrington, A.W., Lee, R., Kim, J.Y., Boyce, S.L., Longo, F.M., Bresnahan, J.C., Hempstead, B.L. & Yoon, S.O. ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron* 36, 375-386 (2002).
- Bertrand, M., Huijbers, I., Chomez, P. & De Backer, O. Comparative expression analysis of the MAGED genes during embryogenesis and brain development. *Developmental Dynamics* 230, 325-334 (2004).
- Casaccia-Bonnefil, P., Carter, B.D., Dobrowsky, R.T. & Chao, M.V. Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* 383, 716-719 (1996).
- Chomez, P., De Backer, O., Bertrand, M., De Plaen, E., Boon, T. & Lucas, S. An overview of MAGE gene family with the identification of all human members of the family.
 - Cancer Res 61(14), 5544-5551 (2001).
- Clotman, F., De Backer, O., De Plaen, E., Boon, T. & Picard, J. Cell- and stage- specific expression of Mage genes during mouse spermatogenesis. *Mamm Genome* 11, 696-699 (2000).
- Dannenberg, J.H., van Rossum, A., Schuijff, L. & te Riele, H. Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G₁ control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions. *Genes Dev* 14(23), 3051-3064 (2000).
- De Bernardi, M.A., Rabin, S.J., Colangelo, A.M., Brooker, G. & Mocchetti, I. TrkA mediates the nerve growth factor-induced intracellular calcium accumulation. *J Biol Chem* 271 (11), 6092-6098 (1996).
- Dechant, G. & Barde, Y.A. The neurotrophin receptor p75: novel functions and implications for diseases of nervous system. *Nat Neurosci* 5(11), 1131-1136 (2002).
- De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F. & Boon, T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation.

Proc Natl Acad Sci USA 93(14), 7149-7153 (1996).

- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M. & Campisi, J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 9363-9367 (1995).
- Frade, J.M.
 NRAGE and the cycling side of the neurotrophin receptor p75. *Trends Neurosci* 23(12), 591-592 (2000)
- Gerard, M., Hernandez, L., Wevrick, R. & Stewart, C.L. Disruption of the mouse necdin gene results in early post-natal lethality. *Nat Genet* 23(2), 199-202 (1999).

- Gu, C., Casaccia-Bonnefil, P., Srinivasan, A. & Chao, M.V. Oligodendrocyte apoptosis mediated by caspase activation. *J Neurosci* 19(8), 3043-3049 (1999).
- Harrington, A.W., Kim, J.Y. & Yoon, S.O. Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis.

J Neurosci **22**(1), 156-166 (2002).

- 16. Jordan, B.W., Dinev, D., LeMellay, V., Troppmair, J., Götz, R., Wixler, L., Sendtner, M., Ludwig, S. & Rapp, U.R. Neurotrophin receptor-interacting mage homologue is an inducible inhibitor of apoptosis protein-interacting protein that augments cell death. *J Biol Chem* 276(43), 39985-89 (2001).
- Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., Tessier, M.H., Rankin, E., Parmiani, G., Arienti, F., Humblet, Y., Bourlond, A., Vanwijck, R., Lienard, D., Beauduin, M., Dietrich, P.Y., Russo, V., Kerger, J., Masucci, G., Jäger, E., De Greve, J., Atzpodien, J., Brasseur, F., Coulie, P.G., van der Bruggen, P. & Boon, T.

Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* **80**, 219-230 (1998).

- Masuda, Y., Sasaki, A., Shibuya, H., Ueno, N., Ikeda, K. & Watanabe, K. Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptional function. *J Biol Chem* 276(7), 5331-5338 (2001).
- Matsuda, T., Suzuki, H., Oishi, I., Kani, S., Kuroda, Y., Komori, T., Sasaki, A., Watanabe, K. & Minami, Y. The receptor tyrosine kinase Ror2 associates with the melanoma-associated antigen (MAGE) family protein Dlxin-1 and regulates its intracellular distribution. *J Biol Chem* 278(31), 29057-64 (2003).
- 20. Muscatelli, F., Abrous, D.N., Massacrier, A., Boccaccio, I., Le Moal, M., Cau, P. & Cremer, H.

Disruption of the mouse Necdin gene results in hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet* **9**(20), 3101-3110 (2000).

- 21. Roux, P.P. & Barker, P.A. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Progress in Neurobiology* 67, 202-233 (2002).
- 22. Salehi, A.H., Roux, P.P., Kubu, C.J., Zeindler, C., Bhakar, A., Tannis, L.L., Verdi, J.M. & Barker, P.A. NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron* 27(2), 279-288 (2000).
- Salehi, A.H., Xanthoudakis, S. & Barker, P.A. NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 277(50), 48043-50 (2002).
- 24. Sasaki, A., Masuda, Y., Iwai, K., Ikeda, K. & Watanabe, K. A RING finger protein Praja1 regulates Dlx5-dependent transcription through its ubiquitin ligase activity for the Dlx/Msx-interacting MAGE/Necdin family protein, Dlxin-1.

J Biol Chem 277(25), 22541-46 (2002).

- Szewczyk, A. & Wojtczak, L. Mitochondrial as a pharmacological target. *Pharmacological Reviews* 54, 101-127 (2002).
- 26. Taniura, H., Taniguchi, N., Hara, M. & Yoshikawa, K. Necdin, a postmitotic neuron-specific growth suppressor, interacts with viral transforming proteins and cellular transcription factor E2F1. *J Biol Chem* 273(2), 720-728 (1998).
- 27. Taniura, H., Matsumoto, K. & Yoshikawa, K.
 Physical and functional interactions of neuronal growth suppressor Necdin with p53. *J Biol Chem* 274(23), 16242-48 (1999).

 Tcherpakov, M., Bronfman, F.C., Conticello, S.G., Vaskovsky, A., Levy, Z., Niinobe, M., Yoshikawa, K. Arenas, E. & Fainzilber, M. The p75 neurotrophin receptor interacts with multiple MAGE proteins. *J Biol Chem* 277(51), 49101-4 (2002).

- 29. Todaro, G.J. & Green, H.
 Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 17, 299-313 (1963)
 20. Tei, T.F., Angeler, A.J.
- Tsai, T.F., Amstrong, D. & Beaudet, A.L. Necdin-deficient mice do not show lethality or the obesity and infertility of Prader-Willi syndrome. *Nat Genet* 22(1), 15-6 (1999).
- 31. van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. & Boon, T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma.

Science 254(5038), 1643-1647 (1991).

32. von Schack, D., Casademunt, E., Schweigreiter, R., Meyer, M., Bibel, M. & Dechant, G.

Complete ablation of the neurotrophin receptor p75^{NTR} causes defects both in the nervous and the vascular system.

Nat Neurosci 4(10), 977-978 (2001).

33. Wen, C.J., Xue, B., Qin, W.X., Yu, M., Zhang, M.Y., Zhao, D.H., Gao, X., Gu, J.R. & Li, C.J.

hNRAGE, a human neurotrophin receptor interacting MAGE homologue, regulates p53 transcriptional activity and inhibits cell proliferation. *FEBS Letters* **564**, 171-176 (2004).

34. Williams, M.E., Strickland, P., Watanabe, K. & Hinck, L. UNC5H1 induces apoptosis via its juxtamembrane region through an interaction with NRAGE.

J Biol Chem 278(19), 17483-90 (2003).

35. Yaar, M., Zhai, S., Fine, R.E., Eisenhauer, P.B., Arble, B.L., Stewart, K.B. & Gilchrest, B.A. Amyloid β binds trimers as well as monomers of the 75-kDa neurotrophin receptor

and activates receptor signaling.

J Biol Chem 277(10), 7720-7725 (2002).

36. Yoon, S.O., Casaccia-Bonnefil, P., Carter, B. & Chao, M.V. Competitive signaling between TrkA and p75 nerve growth factor receptors determines cell survival. *J Neurosci* 18(9), 3273-3281 (1998).

37. Yoshikawa, K.

Cell cycle regulators in neural stem cells and postmitotic neurons. *Neurosci Res* **37**, 1-14 (2000).