



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Contribution à l'étude du contrôle transcriptionnel de l'expression de Maged2 au cours de la différenciation des myoblastes murins C2C12

Vluggen, Christelle

Award date:
2009

[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

**Contribution à l'étude du contrôle transcriptionnel de l'expression de Maged2 au cours
de la différenciation des myoblastes murins C2C12**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en Biochimie et Biologie moléculaire et cellulaire**
Christelle Vluggen
Août 2009

Je tiens à remercier tout particulièrement :

Monsieur Olivier De Backer, mon promoteur pour son accueil au sein du laboratoire et le suivi de l'élaboration de ce mémoire.

Marie Delimoy, ma tutrice, pour son suivi tout au long de l'année dans les manipulations autant que dans la rédaction de ce mémoire et sa gentillesse.

Toute l'équipe du laboratoire pour leur aide et leur bonne humeur.

Mes parents et mes plus proches amis qui m'ont soutenue et aidée tout au long de l'année.

Introduction	6
1. Les gènes MAGE	6
1.1. La découverte des gènes MAGE	6
1.2. Classification des gènes MAGE	6
1.2.1. Classification générale	6
1.2.2. Type I	8
1.2.3. Type II	8
1.2.3.1. NECDIN	9
1.2.3.2. Les gènes MAGED	10
1.2.3.2.1. MAGED1	10
1.2.3.2.2. MAGED2	11
2. La Myogénèse	15
2.1. Les cellules musculaires	15
2.2. La régénération musculaire	15
3. Étude de la régulation de la transcription chez les eucaryotes	16
3.1. La région promotrice chez les eucaryotes	16
3.2. Les facteurs de transcription	16
3.3. Etude de la régulation transcriptionnelle de Maged2	17
Matériel et Méthodes	19
1. Détermination des départs de transcriptions par 5' RACE (GeneRacer TM Kit invitrogen)	19
1.1. Préparation d'ARN	19
1.2. Déphosphorylation des ARN « tronqués »	19
1.3. « Dé-cappage » de la cape 5' des ARN entiers	20
1.4. Ligation du GeneRacer oligo à l'ARN « dé-cappé »	20
1.5. Rétrotranscription de l'ARNm en ADNc	20
1.6. Amplification des extrémités 5' par PCR	20
1.7. Clonage de l'ADNc dans PCR4-TOPO	21
1.8. Analyse des séquences	21
2. Analyse in silico de la séquence promotrice de Maged2	22
2.1. Ensembl	22
2.2. TransFact	22
3. Clonage des séquences promotrices de Maged2 dans pGL3-basic	22
3.1. Amplification par PCR des séquences promotrices de Maged2	22
3.2. Vérification du produit amplifié par électrophorèse en gel d'agarose	23
3.3. Restriction des inserts et des vecteurs	23
3.4. Ligation des produits PCR restreints par SacI et KpnI dans pGL3-basic	23
3.5. Transformations d'E.coli par choc électrique	24
3.6. Isolation de clones d'intérêts	24
4. Réalisation et Clonage dans pGL3-basic des séquences promotrices de Maged2 mutées pour les sites de liaison des facteurs de transcription YY1 et E47	25
5. Culture cellulaire	26
5.1. Culture des C2C12 et NIH 3T3	26
5.2. Initiation de la différenciation des myoblastes C2C12	26
5.3. Expression des plasmides pGL3 dans les C2C12 et les NIH3T3	26
5.3.1. Préparation d'ADN (colonne)	26
5.3.2. Ensemencement des cellules	27
5.3.3. Transfections transitoires	27
6. Test Luciférase	28
6.1. Transfection des plasmides	28
6.2. Lyse des cellules	28
6.3. Mesure de l'activité luciférase	28

7. PCR quantitative en temps réel	29
7.1. Préparation d'ARN	29
7.2. Retrotranscription des ARNm en ADNc	29
7.3. PCR quantitative	29
8. Oligonucléotides utilisés :	30
Résultats et Discussions	31
1. Détermination des sites d'initiation de la transcription de <i>Maged2</i> dans les C2C12 en différenciation	31
2. Analyse <i>in silico</i> du promoteur de <i>Maged2</i>	31
3. Activité transcriptionnelle de la région promotrice de <i>Maged2</i> lors de la différenciation des C2C12	34
3.1. Expression de l'ARNm de <i>Maged2</i> au cours de la différenciation des C2C12	34
3.2. Étude de la régulation de l'activité transcriptionnelle du promoteur de <i>Maged2</i> grâce à un système rapporteur	35
Figure 18: Activité Luciférase relative du promoteur de <i>Maged2</i> et de pGL3-basic au cours de 48 heures de différenciation des C2C12. Les valeurs sont normalisées par rapport à la valeur obtenue pour le promoteur de <i>Maged2</i> dans les C2C12 en prolifération.	38
4. Cartographie fonctionnelle de la région promotrice de <i>Maged2</i>	39
3. Effet de la surexpression des facteurs de transcription Myogénine, MyoD et Mef2 sur l'activité du promoteur de <i>Maged2</i>	41
4. Etude de l'importance des sites des liaisons potentiels d'E47 et YY1 par mutagenèse dirigée.	43
Conclusions et Perspectives	46
Conclusions et Perspectives	46
Bibliographie:	47

Contribution à l'étude du contrôle transcriptionnel de l'expression de Maged2 au cours de la différenciation des myoblastes murins C2C12

VLUGGEN Christelle

Résumé

Maged2 appartient à la famille des protéines Mage. Ces protéines sont impliquées dans le contrôle de la prolifération, de la survie et de la différenciation cellulaire. Les fonctions moléculaires des protéines MAGE restent encore mal connues. Certaines interagissent avec des récepteurs membranaires de la famille du récepteur TNF et sont impliquées dans le signal apoptotique émanant de ces récepteurs. Ces protéines peuvent aussi servir d'adaptateur assurant la liaison entre différentes protéines impliquées dans le contrôle de la transcription.

Des travaux précédents du laboratoire ont montré que la protéine Maged2 était induite *in vivo* dans le muscle squelettique en régénération et *in vitro* lors de la différenciation des myoblastes murins de la lignée C2C12 et de cultures primaires de myoblastes. Le travail présenté ici a consisté à jeter les bases de l'étude du contrôle transcriptionnel de l'expression de Maged2 au cours de la différenciation myogénique. Des expériences de RT-PCR quantitative ont permis de montrer que la quantité d'ARNm Maged2 augmente d'un facteur 4 deux jours après l'initiation de la différenciation des C2C12 par privation du sérum. En utilisant une méthode de 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), nous avons identifié 3 sites d'initiation de la transcription de Maged2 dans les C2C12. Ces 3 sites, qui déterminent autant d'exons 1 alternatifs, sont dépourvus de boîte TATA mais sont associés à des régions riches en CpG. Une analyse *in silico* de la région promotrice de Maged2 a permis d'identifier la présence de nombreux sites de liaison potentiels pour des facteurs de transcription myogéniques dans la région promotrice de Maged2. Nous avons débuté l'étude fonctionnelle de cette région en clonant différents fragments en amont du gène rapporteur *Luciférase*. Des expériences de transfection ont permis de mesurer la capacité de ces fragments à initier la transcription dans les C2C12 en prolifération et en différenciation. Ceci nous a permis d'identifier des régions importantes pour le contrôle transcriptionnel de Maged2. Nous avons aussi montré, grâce à des expériences de transfection, que l'activité transcriptionnelle de ces fragments pouvait être activée par les facteurs de transcription myogéniques Myogénine, MyoD et Mef2. Enfin, nous avons entrepris d'étudier l'importance de plusieurs sites de liaison potentiels par mutagenèse dirigée des fragments clonés en amont du gène Luciférase.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Août 2009

Promoteur: O. De Backer

Introduction

Depuis plusieurs années le laboratoire de génétique des mammifères de l'URPHYM (O. De Backer) étudie les fonctions des protéines Mage, des protéines aux fonctions peu connues. Le travail de ce mémoire s'inscrit dans le cadre de l'étude de la région promotrice du gène *Maged2* et de sa régulation transcriptionnelle au cours de la différenciation myogénique *in vitro*.

1. Les gènes *MAGE*

1.1. La découverte des gènes *MAGE*

Le premier gène *MAGE* fut découvert en 1991, dans le cadre des recherches en immunothérapie anti-tumorale dirigées par le professeur Boon de l'Institut Ludwig de Recherches sur le Cancer (Bruxelles). L'équipe mit en évidence la présence d'antigènes à la surface de cellules de mélanomes. Ces antigènes, reconnus par des lymphocytes T cytolytiques, sont des peptides formés suite à la dégradation de protéines cytoplasmiques par le protéasome et présentés à la surface des cellules par les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC-I) (Rotzschke et al., 1990). L'équipe du Dr Boon a identifié le gène dont ces peptides antigéniques étaient issus et l'appelèrent *MAGE-I* (Melanoma AntiGEN), aujourd'hui appelé *MAGEA1* (Van der Bruggen et al., 1991). Ce gène ne présentait aucune homologie avec les séquences contenues dans les banques de données publiques de l'époque. Des expériences d'hybridation en Southern Blot avec une sonde *MAGEA1* permit de mettre en évidence l'existence de 11 gènes apparentés à *MAGEA1*. Ces gènes sont exprimés dans des tumeurs de différents types histologiques mais pas dans les tissus adultes sains, à l'exception des cellules germinales mâles et dans le placenta. L'expression de ces gènes dans les cellules de la lignée germinale mâle ne conduit pas cependant à l'expression d'antigènes tumoraux car ces cellules n'expriment pas les molécules MHC nécessaires à la présentation des antigènes à la surface des cellules. Les antigènes *MAGE* sont donc spécifiques des tumeurs, ce qui les rend particulièrement intéressants en immunothérapie anticancéreuse. A l'heure actuelle, des vaccins dirigés contre les antigènes *MAGEA* sont en dernière phase d'expérimentation clinique (phase III) (Atanackovic et al., 2007, Vincent, B. et D. Lejeune, 2007).

Des expériences d'hybridation en Southern Blot d'ADN génomique murin avec une sonde *MageA1* ont permis de mettre en évidence la présence de gènes *Mage* dans le génome de la souris. Par la suite, le séquençage des génomes humain et murin permit de dénombrer au total 55 gènes *Mage* chez l'homme et 31 chez la souris.

1.2. Classification des gènes *MAGE*

1.2.1. Classification générale

Ces gènes sont classés en sous-familles sur base de leur localisation chromosomique et de leur similarité de séquence. Il existe 13 sous familles de gènes *MAGE* chez l'homme (*MAGE-A, -B, -C, -D, -E, -F, -G, -H, -I, -J, -K, -L* et *NECDIN*) et 11 sous-familles chez la souris (Chomez et al., 2001) (Figure 1).

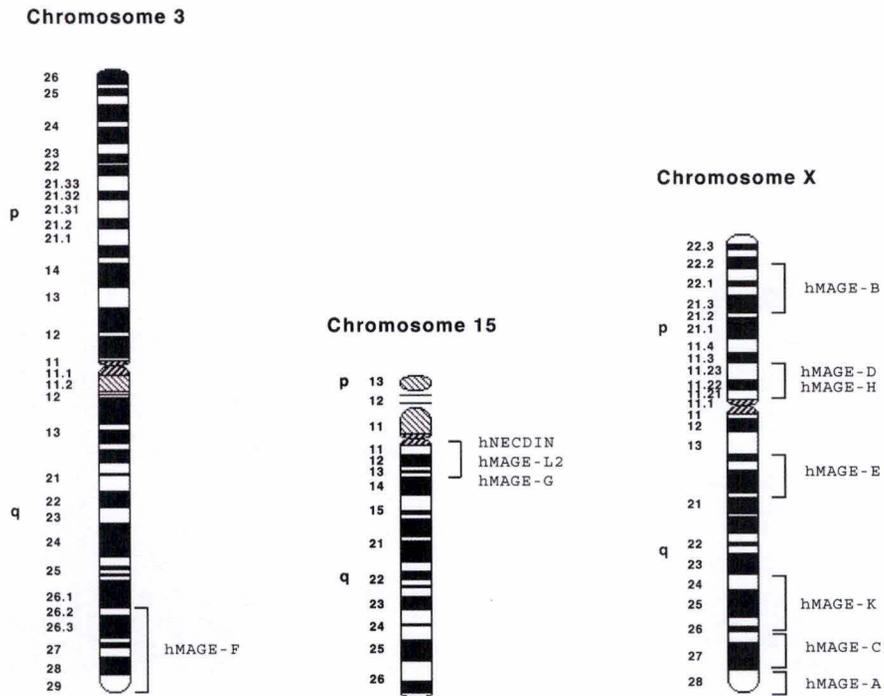


Figure 1. Localisation chromosomique des sous-familles MAGE chez l'homme (d'après Chomez et al., 2001).

Les protéines MAGE ont en commun une séquence conservée d'environ 200 acides aminés. Cette séquence est appelée « MAGE Homology Domain » (MHD) et est, en général, localisée du côté carboxy-terminal des protéines MAGE (Figure 2).

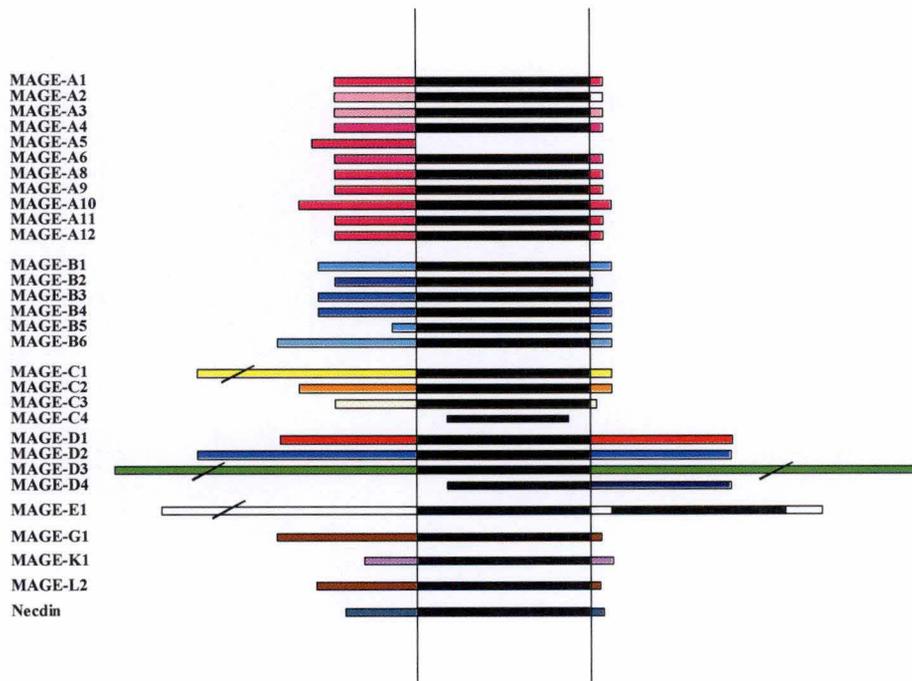


Figure 2 : Représentation schématique des protéines MAGE. Le « MAGE Homology Domain » (MHD) est représenté en noir.

En fonction de leur profil d'expression, les gènes *MAGE* ont été classés en deux catégories : les gènes *MAGE* de type I et de type II (Chomez et al., 2001).

1.2.2. Type I

Les gènes *MAGE* de type I sont localisés sur le chromosome X. Ils comprennent 3 sous-familles. La sous-famille *MAGEA* qui comporte 15 gènes dans la région Xq28, la sous-famille *MAGEB* comptant 17 gènes dans la région Xp21 et la sous-famille *MAGEC*, 7 gènes dans la région Xq26-27.

Les gènes *MAGE* des sous-familles A et B sont présents chez la souris et chez l'homme alors que les gènes *MAGEC* n'existent que chez l'homme.

Les gènes *MAGE* de type I sont peu conservés (tableau 1), aucune relation d'orthologie ne peut être établie entre les gènes humains et murins. La plupart des événements de duplication et de rétroposition qui ont généré ces gènes sont probablement ultérieurs à la séparation phylogénique de l'homme et de la souris. Les gènes de type I humains et murins ont néanmoins un profil d'expression semblable : ils sont silencieux chez l'adulte, à l'exception des cellules germinales mâles et dans certains cas, du placenta. *MAGEA1* et *-A4* sont exprimés dans les spermatogonies, cellules préméiotiques, tandis que *Mageb1*, *-b2* et *-b3* sont exprimés dans les spermatozoïdes, les cellules haploïdes qui se différencient en spermatozoïdes (Clotman et al., 2000).

Homme /souris	a1	a2	a3	b3
A1	57 (39)			
A2		54 (39)		
A3			42 (39)	
B3				61 (43)

Tableau1 : Similarité de séquence entre les régions codantes et les séquences d'acides d'aminés de quelques membres des sous-familles *MAGEA* et *-B* humaine et murine. Les nombres indiquent les pourcentages d'identité des séquences nucléotidiques ; les nombres entre parenthèses représentent le pourcentage d'identité des acides aminés des protéines.

L'expression des *MAGE* de type I dans les tumeurs est liée à la déméthylation des îlots CpG de leurs régions promotrices (De Smet et al., 1996 et Wischnewsky et al., 2007)

1.2.3. Type II

Les gènes *MAGE* de type II comptent les sous-familles *MAGED*, *-E*, *-F*, *-G*, *-H*, *-I*, *-J*, *-K*, *-L* et *NECDIN* chez l'homme. Contrairement aux gènes de type I, ces gènes sont exprimés dans de nombreux tissus somatiques au cours du développement et chez l'adulte. Les gènes *MAGED*, *-E*, *-H*, *-I*, *-J* et *-K* sont situés sur le chromosome X, les gènes *MAGEG*, *-L* et *NECDIN* sont dans la région q11-q13 du chromosome 15 et le gène *MAGEF* est situé sur le chromosome 3 (Figure 1).

Les fonctions des protéines *MAGE* de type II restent mal connues. Les *Mage* de type II les mieux caractérisés sont *Necdin* et *Maged1*.

1.2.3.1. NECDIN

NECDIN (Neurally differentiated Embryonal Carcinoma-Derived proteIN) est un gène *MAGE* composé d'un seul exon situé dans la région q11-13 du chromosome 15 et qui code une protéine nucléaire de 325 acides aminés conservés entre l'homme et la souris.

Necdin est soumise à l'empreinte parentale chez les mammifères de telle façon que seul l'allèle paternel est exprimé (Mac Donald et al., 1997). Les micro-délétions dans cette région sont la cause de 70% des cas du syndrome de Prader-Willi (PWS) (Jay et al., 1997). Le PWS est caractérisé par un retard mental parfois sévère, des troubles respiratoires, une hypotonie néonatale majeure, une hyperphagie entraînant une obésité morbide et des troubles variables du comportement.

Différents groupes ont généré des souris *knock-out* pour *Necdin*. Dans le fond génétique C57/Bl6/J la déficience en *Necdin* entraîne une mortalité post natale due à des troubles respiratoires. Les souris qui survivent souffrent d'hypotonie et de retard de croissance. Ces souris ont un déficit en neurones produisant l'ocytocine et la LHRH dans l'hypothalamus. De plus, ces souris ont un phénotype comportemental rappelant celui des patients atteints du syndrome de Prader-Willi, notamment une meilleure mémorisation spatiale (Muscatelli et al., 2000 et Zanella et al., 2008). Les souris déficientes en *Necdin* montrent aussi une plus grande résistance à la douleur induite par la chaleur, phénomène également observé chez les patients atteints de PWS (Kuwako et al., 2005).

La protéine *Necdin* est exprimée dans les neurones post-mitotiques du système nerveux périphérique et central (Taniura *et al.*, 1998 et Uetsuki et al., 1996).

Necdin est un facteur de survie cellulaire. Les souris mutées pour *Necdin* montrent une augmentation d'apoptose dans les neurones sensitifs des ganglions rachidiens (Andrieu et al., 2006). La survie de ces neurones dépend, entre autre, du signal NGF (Nerve Growth Factor). La liaison de NGF au récepteur TrKA favorise la survie des neurones et l'association entre TrKA et p75NTR permet d'augmenter la sensibilité de la réponse au NGF. *Necdin* permettrait d'augmenter la durée de ce signal (Kuwako *et al.*, 2005).

En cas de dommage à l'ADN, p53 est acétylé et initie l'apoptose (Gu and Roeder, 1997). Dans les neurones post-mitotiques, *Necdin* formerait un complexe stable avec p53 et sirt1, une histone déacétylase qui diminue l'activité de p53. Ce complexe empêcherait l'acétylation de p53 et protégerait les neurones de l'apoptose en cas de dommages à l'ADN (Hasegawa et Yoshikawa, 2008).

Necdin interagit aussi avec E2F1, un facteur de transcription qui permet l'expression de gènes nécessaires à l'entrée en phase S du cycle cellulaire. *Necdin* réprimerait E2F1 de la même manière que Rb (protéine du rétinoblastome) (Taniura et al., 1998). En phase G1, Rb est hypo-phosphorylé et séquestre E2F1. Cela empêche la cellule d'entrer en phase S. Lorsque la cellule est prête à passer en phase S, Rb se fait hyper-phosphoryler. Cet état de phosphorylation ne lui permet plus d'interagir avec E2F1. E2F1 ainsi « relâché » active la transcription des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN et dans le contrôle de la croissance cellulaire. De la même façon, *Necdin* séquestrerait E2F1, ce qui permettrait de maintenir l'état postmitotique des neurones différenciés (Taniura et al., 1998 et 1999)

Necdin interviendrait aussi dans la différenciation myogénique. *Necdin* augmenterait l'expression de la myogénine et accélérerait la différenciation des myoblastes en myotubes. *Necdin* protégerait ainsi les myoblastes de l'apoptose au cours de la myogenèse (Deponti et al 2007). *Necdin* faciliterait la différenciation myogénique via son interaction avec EID-1. Au niveau des promoteurs des gènes activés par MyoD, EID-1 s'associe avec MyoD et inhibe l'activation des gènes dont la transcription est dépendante de MyoD. *Necdin* séquestrerait EID-1 permettant ainsi l'activité transcriptionnelle de MyoD (Bush et Wevrick, 2008).

1.2.3.2. Les gènes *MAGED*

Les gènes de la sous-famille *MAGED* se distinguent des autres gènes *MAGE* par 2 caractéristiques. Premièrement, l'ORF (Open Reading Frame) de ces gènes est constituée de plusieurs exons alors que l'ORF des autres gènes *MAGE* est située dans un seul exon 5'terminal (Figure 4). Le génome de vertébrés non mammaliens, comme le *Danio rerio* ou le *Tetraodon nigroviridis*, ne possède qu'un seul gène *Mage* dont l'ORF est codée par plusieurs exons homologues à ceux des gènes *MAGED* (Figure 4). Ceci indique que les gènes *MAGED* sont les gènes originels à partir desquels tous les autres gènes *MAGE* ont été générés par rétropositions et duplications.

Deuxièmement, les gènes *MAGED* sont très bien conservés chez les mammifères. La protéine *MAGED1* de l'homme est très proche de la protéine *Maged1* murine : elles ont 85% d'acides aminés identiques. Il en est de même pour les protéines *Maged2*. Les duplications qui ont permis l'expansion de la sous-famille des *Maged* sont donc probablement antérieures à la séparation phylogénique entre l'homme et la souris. La forte homologie entre les orthologues *Maged* humains et murins reflète une pression de sélection importante sur ces gènes au cours de l'évolution des mammifères.



Figure 4 : Comparaison des séquences génomiques du gène *MAGED2* et *MAGEA1*. Les traits représentent les introns ; les carrés, les exons ; les boîtes noires les exons codants (Lucas et al., 1999).

1.2.3.2.1. *MAGED1*

Le gène *MAGED1* (aussi appelé *NRAGE* et *Dlxin-1*) est situé sur le chromosome X dans la région p11.23 et code pour une protéine de 778 acides aminés. Chez l'homme, *MAGED1* est exprimé dans de nombreux tissus adultes et embryonnaires (Bertrand et al., 2004).

Pour étudier *Maged1*, notre laboratoire a généré une lignée de souris déficientes en *Maged1*. Ces souris sont viables, mais les mâles sont très peu fertiles. Les femelles présentent un dysfonctionnement de la glande mammaire et un déficit d'expression de différents neuropeptides (l'ocytocine, la vasopressine et la CRH (Corticotropin-releasing hormone)). Les souris déficientes en *Maged1* ont un poids et une masse grasse plus élevés que les souris sauvages (C. Dombret, communication personnelle). Les souris *knock-out* pour *Maged1* montrent aussi une déficience de l'apoptose de certains neurones et un retard de la phase catagène du cycle pileux, phase caractérisée par une apoptose massive des follicules pileux (Bertrand et al., 2008).

Maged1 a un rôle pro-apoptotique. Il interagit avec le récepteur de guidance axonale *UNC5H1* (Williams et al., 2003). *Maged1* lie aussi le récepteur aux neutrophines *p75NTR* exprimé dans les neurones. Lorsque NGF (Neural Growth Factor) lie *p75NTR*, *Maged1* est recruté et interagit avec le récepteur. Il s'en suit le déclenchement d'une voie de signalisation

qui, par l'activation des JUN kinases, induit l'activation des caspases (Salehi et al., 2000 et 2002).

Maged1 peut également moduler la stabilité de la protéine de survie XIAP et favoriser sa dégradation. Dans les cellules progénitrices neuronales, il a été montré que Maged1 interviendrait dans l'induction de l'apoptose induite par la voie p38 MAP kinase. Maged1 faciliterait la formation du complexe TAK1-TAB1-XIAP qui active la voie de la p38MAPK et mène à la mort cellulaire dépendante des caspases (Kendall et al., 2005).

La multiplicité des voies signalétiques impliquant Maged1 suggère que ce dernier aurait un rôle de protéine adaptatrice dans des voies de signalisation proapoptotiques.

Différentes études *in vitro* ont montré que Maged1 aurait un rôle dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, la surexpression de Maged1 dans différents types cellulaires (HEK293, U2OS, MEFs et HepG2) arrête le cycle cellulaire en G1/S et G2/M (Wen et al., 2004). Dans les fibroblastes d'embryons de souris (MEFs), l'arrêt du cycle induit par la surexpression de Maged1 serait dépendant de p53 (Chuan-Jun Wen et al., 2004).

Des expériences menées dans notre laboratoire ont montré que les MEFs déficients en *Maged1*, échappent en partie au blocage en phase S du cycle cellulaire après un traitement génotoxique. Il a aussi été observé que le niveau protéique de Maged1 diminuait en phase G1/S (P. Basavarajiah, communication personnelle). Ces informations et le fait que la surexpression de Maged1 provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase S suggèrent que la dégradation de Maged1 serait une étape nécessaire à la progression du cycle cellulaire.

Enfin, Maged1 serait un régulateur transcriptionnel via son interaction avec des facteurs de transcription. En effet, Maged1 module l'activité des facteurs de transcription à homéodomaines Dlx5 et Msx2. Ces facteurs ont un rôle crucial dans le développement et la réparation des os. (Kuwajima et al., 2004 et Sasaki et al., 2002)

1.2.3.2.2. *MAGED2*

Actuellement, peu de données au sujet de Maged2 sont disponibles dans les publications. Maged2 serait surexprimé dans certaines tumeurs (adénocarcinomes, tumeurs carcinoïdes malignes de l'appendice et tumeurs carcinoïdes gastro-intestinale) (Kidd et al., 2006 et Modlin et al., 2006).

MAGED2 interagit avec p53

Suite à des expériences de co-immunoprécipitation dans des cellules transfectées de manière transitoire avec une version étiquetée de MAGED2 et plusieurs formes de la protéine p53 (p53 WT et différentes formes de p53 mutées au niveau du domaine de liaison à l'ADN), l'équipe de H. McLeod suggère que MAGED2 interagirait avec p53. La surexpression de MAGED2 induirait une diminution de 30 à 40% de l'activité transcriptionnelle de p53 dans des cellules de neuroblastome où p53 n'est pas muté mais ne perturberait pas la stabilité de la protéine. La même équipe a montré par immunochimie sur des échantillons de tissus tumoraux (plus de 3000 échantillons de 8 types tumoraux différents) que le profil d'expression de Maged2 correspondait au profil d'expression de p53 : les tissus tumoraux qui ont une forte expression de p53 nucléaire présentent aussi une forte expression de MAGED2 nucléaire et les tissus tumoraux qui présentent une forte expression de p53 cytosolique

montrent également une forte expression de MAGED2 cytosolique (Papageorgio et al. 2007). Maged2 interagit avec G α s

Notre laboratoire a montré par tests double-hybride et par co-immunoprécipitation que Maged2 interagissait avec G α s, la sous-unité stimulatrice des protéines G trimériques. L'interaction se ferait entre le côté carboxy-terminal de Maged2 et le domaine Goloco de la protéine G α s, (T.Nguyen, communication personnelle). La signification de cette interaction n'est pas encore connue.

Les souris déficientes *Maged2*

Dans le but d'étudier les fonctions de *Maged2*, des souris déficientes ont été obtenues au laboratoire dans le fond génétique C57BL/6. Les souris déficientes en *Maged2* meurent dans les quelques heures qui suivent la naissance. Ces souriceaux présentent une anémie sévère (Figure 5). Celle-ci semble être due à des hémorragies abdominales qui apparaissent en fin du développement embryonnaire (E18,5) et pourraient être causées par un déficit de la fonction des cellules musculaires lisses. En effet, des souris dans lesquelles *Maged2* a été délété, spécifiquement dans les cellules musculaires lisses (grâce au système cre-lox) présentent un phénotype semblable à celui des souris déficientes en *Maged2* de manière constitutive (C. Dombret, communication personnelle).

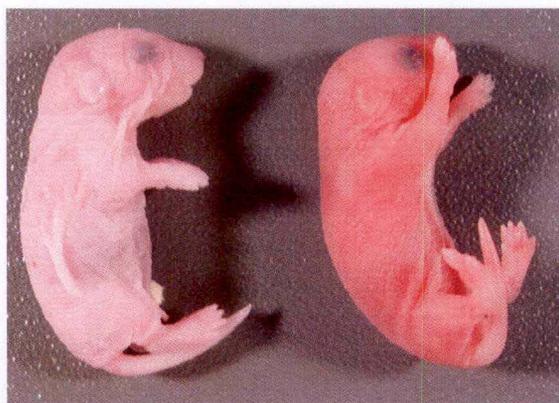


Figure 5 : Souriceaux nouveau-nés (P0). A gauche un P0 déficient en *Maged2* et à droite son frère WT

Maged2 est régulé au cours du cycle cellulaire

Il a été montré récemment que Maged2 est régulé au cours du cycle cellulaire. La séquence protéique de Maged2 contient des sites consensus de liaison des cyclines et des sites de phosphorylation par les CDK. De plus, des sites de liaison de facteurs de transcription impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (AP1, Myb, E2F) ont été identifiés dans la région promotrice de Maged2. Il a été montré par Western Blot que la quantité de Maged2 diminuait fortement dans des fibroblastes NIH3T3 bloqués en début de phase S suite à un traitement à l'aphidicoline et durant les premières heures du cycle cellulaire. Il se pourrait que le niveau protéique de Maged2 soit régulé par les cyclines et les kinases dépendantes de cyclines. On observe, en effet, une diminution du niveau de la protéine suite à la surexpression des cyclines A et E dans des cellules NIH3T3 (M. Delimoy, communication personnelle).

Maged2 est régulé au cours de la différenciation myogénique.

Des informations issues de la base de données Geoprofiles (GEO profiles <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>), indiquent que l'expression de l'ARN messager de

MAGED2 augmenterait dans les muscles squelettiques des patients atteints de la dystrophie de Duchenne (DMD) (Figure6). Le niveau d'expression de *Maged2* est également plus élevé dans les muscles squelettiques des souris déficientes en dystrophine (les souris MDX), le modèle animal de la DMD, que dans les muscles de souris sauvages (Figure7). La DMD est causée par une déficience en dystrophine souvent due à des délétions d'un ou plusieurs exons dans le gène de la dystrophine (Hoffman et al., 1988). La dystrophine fait partie du complexe dystrophine-glycoprotéine composé de protéines intracellulaires, transmembranaires et extracellulaires qui forment une connexion entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette (Ibrahimov-beskrovnava et al. 1992, Suzuki et al., 1994). L'absence de dystrophine fragilise le sarcolemme aux stress mécaniques induits par les contractions musculaires, ce qui provoque la nécrose des myofibres. Cela mène à la régénération des myofibres à partir des cellules satellites (cellules souches musculaires). Cette activation permanente des cellules satellites mène à leur déplétion et le tissu musculaire est progressivement remplacé par du tissu fibreux et graisseux.

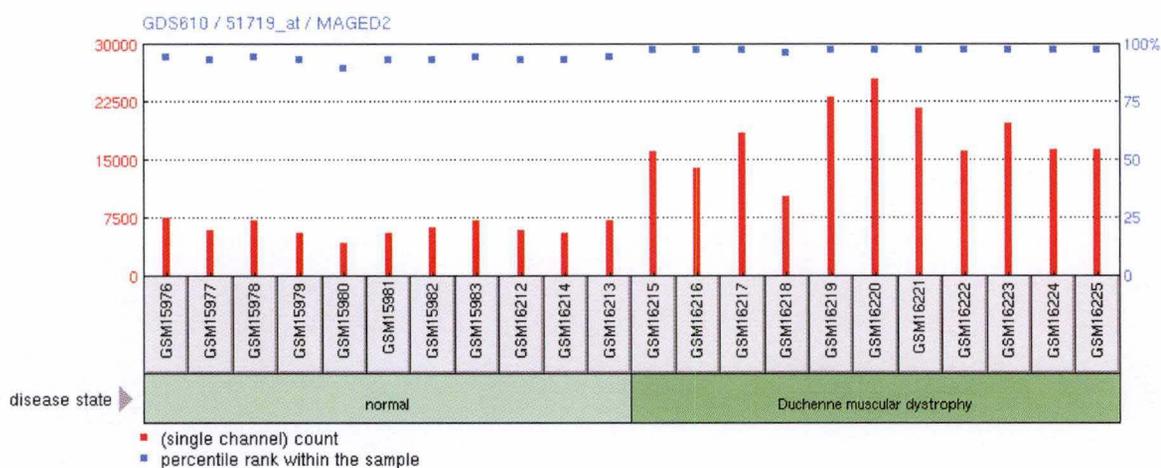


Figure 6 : Taux d'expression relatif du transcript de *MAGED2* dans des muscles squelettiques de patients normaux et de patients atteints de DMD (GEOprofiles)

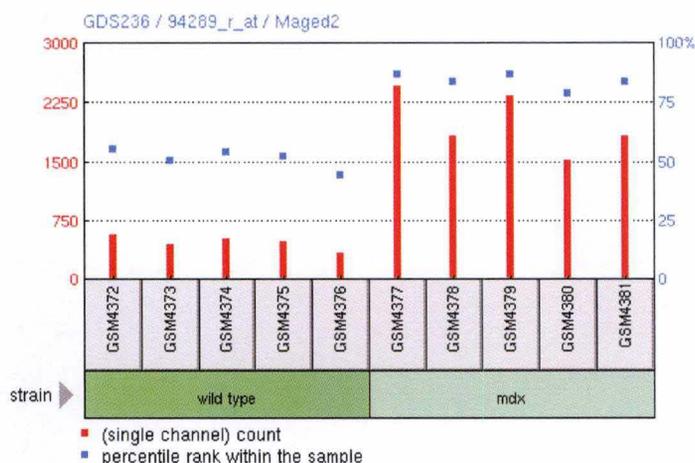


Figure 7 : Taux d'expression relatif du transcript de *Maged2* dans des muscles squelettiques de souris MDX et de souris Wild Type (GEOprofiles)

Au laboratoire, Tuan Nguyen et Marie Delimoy ont injecté de la cardiotoxine dans le muscle de souris adultes afin de provoquer la nécrose des fibres musculaires. L'expression de *Maged2* lors de la dégénérescence et de la régénération des fibres musculaires a été suivie en

Western-Blot. Les résultats ont montré que Maged2 n'était pas exprimé dans les muscles de souris adultes avant l'injection. La protéine est, par contre, induite sous une forme courte (+/- 55kD) 2 jours après l'injection et sous sa forme longue (+/- 95kD) 5 jours après l'injection (Figure8). On peut donc en déduire que la protéine Maged2 est induite lors de la régénération musculaire.

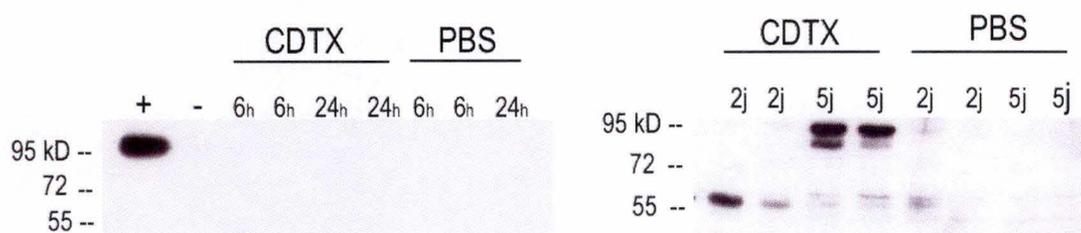


Figure8 : Analyse par Western Blot de l'expression de Maged2 dans le tibialis antérieur de souris après injection de cardiotoxine ou de PBS. Les muscles ont été prélevés 6 heures, 24 heures, 2 jours et 5 jours après l'injection. Maged2 n'est pas détectable à 6 heures ni à 24 heures, une forme courte (+/-55kd) de Maged2 apparaît 2 jours après l'injection et la forme longue (+/-90kd) apparaît 5 jours après l'injection de cardiotoxine. Le contrôle positif (+) est réalisé à partir du lysat d'embryon de souris sauvage (-). Le contrôle négatif réalisé à partir de lysat d'embryon de souris déficientes en Maged2. Le contrôle de charge a été réalisé au Rouge Ponceau (non présenté ici)

Afin de préciser dans quelle phase de la régénération musculaire Maged2 est induit (phase d'activation des cellules satellites, phase de prolifération, de différenciation..), l'expression de Maged2 a été étudiée dans des cellules C2C12 en prolifération et en différenciation. Ces cellules constituent un modèle cellulaire d'étude de la différenciation myogénique. Les C2C12 sont des myoblastes immortalisés qui se différencient en myocytes et myotubes suite au retrait du sérum de leur milieu de culture. Les cellules arrêtent alors de proliférer, expriment les protéines spécifiques de la différenciation myogénique et fusionnent.

Le profil d'expression de Maged2 lors de la différenciation des C2C12 a été étudié par Western Blot. Lorsque les cellules prolifèrent (au temps 0), Maged2 n'est pas détecté. Son expression augmente suite au retrait du sérum de la culture et se maintient pendant plusieurs jours (Figure 9). Maged2 est donc induit lors de la différenciation des C2C12.

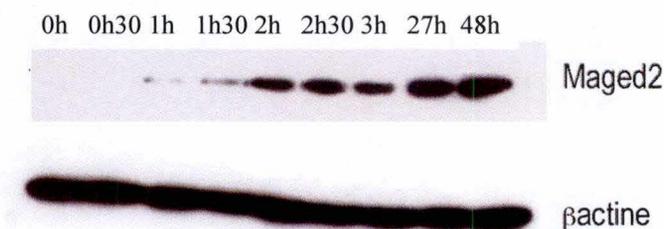


Figure9 : Analyse par Western Blot de l'expression de Maged2 réalisé sur des lysats de C2C12 en différenciation.

2. La Myogénèse

2.1. Les cellules musculaires

Chez les vertébrés, les muscles dérivent du mésoderme paraxial qui va progressivement se segmenter en somites. La partie ventrale des somites donnera le sclérotome. La partie dorsale donnera le dermomyotome qui se différenciera en tissu dermique et en muscles squelettiques (Christ et Ordahl, 1995).

Sous l'influence des facteurs Pax3 les cellules précurseurs du dermomyotome vont migrer vers la région dorso-médiane des somites. Ces facteurs Pax induiront la transcription de deux facteurs de transcription spécifiques de la différenciation myogénique (les MRFs) MyoD et Myf5 (Amthor et al., 1998). Il est à noter que les souris déficientes en *MyoD* ou en *Myf5* ne présentent que de faibles troubles de différenciation. Par contre, le double mutant *MyoD/Myf5* présente une absence de tissu musculaire squelettique et meurt peu de temps après la naissance. Ceci indique que les rôles de MyoD et Myf5 sont, en partie, redondants dans la myogénèse (Cornelison et al., 2000 et Rudnicki et al., 1993).

MyoD et Myf5 induisent la détermination des cellules progénitrices en myoblastes. Différentes voies de signalisation régulent ensuite l'expression de MyoD et Myf5. Par exemple, Shh (Sonic hedgehog) est activateur de leur transcription (Borycki et al., 1999) et les facteurs Wnt sont impliqués dans l'activation de Pax3, Myf5 et MyoD (Chen et al., 2005).

Dans un second temps, MyoD et Myf5 sont réprimés par des facteurs de la famille des FGF (Fibroblast Growth Factor) et des BMP (Bone Morphogenic Protein) afin de permettre la prolifération des myoblastes et d'en augmenter le nombre (Olson et al., 1992, Amthor et al., 1998 et Edom-Vovard et al., 2001). Il est à noter que Shh (Sonic hedgehog) joue un double rôle dans la myogénèse : dans un premier temps, il active les MRF afin de déclencher la détermination des cellules progénitrices en myoblastes et ensuite il active l'expression de BMP. Shh participe donc à l'initiation de la différenciation et à l'initiation de la croissance des myoblastes (Bren-Mattison et Olwin, 2002). Une fois le nombre de myoblastes ayant suffisamment augmenté, les cellules entrent dans un « second programme de différenciation » : la différenciation des myoblastes en myotubes. Les cellules expriment alors les MRF tardifs, MRF4 et la myogénine, suite à la stimulation par l'IGF-1 (Insulin-like growth factor-I) (Florini et al., 1991 et voir revue : Velloso, 2008). Enfin, les myoblastes vont fusionner et former des fibres contractiles multi nucléés.

Une autre vague de différenciation myogénique apparaît à E16,5 (chez la souris). c'est la différenciation des cellules satellites. Ces cellules mononucléées résident entre la lame basale et la membrane plasmique de la fibre musculaire. Les cellules satellites jouent un rôle dans la croissance musculaire et la régénération des muscles adultes (Mauro, 1961)

2.2. La régénération musculaire

La destruction ou l'endommagement du tissu musculaire squelettique déclenche une réponse inflammatoire, suivie de la régénération des myofibres (Bischoff et Heintz, 1994). Les cellules satellites dites « quiescentes » sont réactivées lors d'un traumatisme mécanique ou chimique et prolifèrent sous l'effet de différents facteurs de croissance comme l'HGF (Hepatocyte growth Factor), le LIF (Leukemia inhibitory Factor), l'Il-6 (Interleukine-6), le FGF-2 (Fibroblast Growth Factor 2), le FGF-6, l'IGF-I (Insulin Growth Factor), l'IGF-II. Ces facteurs sont produits par les macrophages au cours de la réaction inflammatoire (Anderson & Wosniak, 2004 et Merly, Lescaudron et al. 1999). Les cellules satellites sont marquées par une expression de Pax7 plus importante que celle de Pax3 (Seale et al., 2000). Une partie de

ces cellules servent à réalimenter le réservoir de cellules satellites, alors que la majorité se différencient et fusionnent pour former des myotubes (Anderson et al., 1998). Les activités de régénération reprennent pratiquement les mêmes voies de régulation que celles de la myogénèse fœtale décrite ci-dessus (Holterman et Rudnicki, 2005).

3. Étude de la régulation de la transcription chez les eucaryotes

3.1. La région promotrice chez les eucaryotes

La région promotrice des gènes participe à la régulation de la transcription et donc influence la quantité d'ARNm. Chez les eucaryotes, les facteurs d'initiation de la transcription sont reconnus par l'ARN polymérase II. La séquence de la région promotrice contient un ou plusieurs sites d'initiation de la transcription. Les sites d'initiation les plus courants sont formés, soit par la/les boîtes TATA situées de 25 à 35 paires de bases avant le site de départ de la transcription, soit par « l'initiateur » de séquence consensus 5' Y-Y-A⁺-N-T/A-Y-Y-Y 3' (où A⁺ est la base où commence la transcription) ou encore par une région riche en CpG, régulée par le facteur de transcription SP1.

La région promotrice peut s'étendre sur quelques kilobases en amont du départ de transcription.

La région promotrice lie de façon directe ou indirecte un grand nombre de facteurs de transcription liant eux-même des co-facteurs assurant ainsi la régulation complexe de l'expression transcriptionnelle.

3.2. Les facteurs de transcription

Les facteurs de transcription peuvent être activateurs ou répresseurs de la transcription. Ils lient en cis des séquences consensus conservées de l'ADN et interagissent avec un grand nombre de cofacteurs. Les cofacteurs sont classés en 5 classes. La classe I compte les facteurs liant la machinerie de transcription. Les facteurs de la classe II ont la propriété de s'associer avec les facteurs de transcription qui lient l'ADN. Les cofacteurs de classe III forment de grandes molécules composées de nombreuses sous-unités en interaction avec la machinerie de transcription. Les classes IV et V incluent les cofacteurs qui remodelent la chromatine comme les histones acétylase (classe IV) et les facteurs qui hydrolysent l'ATP dans des réactions catalytiques (Lemon and Tjian, 2000).

Certains facteurs de transcription sont ubiquistes, d'autres sont spécifiques de types ou fonctions cellulaires.

Les facteurs de transcription sont classés selon leur mode de liaison à l'ADN. Il en existe 4 classes :

-La famille hélice-tour-hélice lie l'ADN grâce à son domaine homéobox d'environ 60 acides aminés (Figure 10 a).

-La famille des protéines à doigts de zinc, dont la séquence contient des éléments répétés en forme de doigts, a la propriété de lier un ion zinc (figure 10b). Un exemple de cette famille est le facteur de transcription SP1. SP1 est un facteur de transcription ubiquiste à doigts de zinc liant les îlots CpG et possédant 2 domaines de transactivation capable de lier directement les TBP (TATA Binding Protéines) (Torigoe et al., 2003), et TAF4 (TBP Associated Factor 4) (Rojo-Niersbach et al., 1999). SP1 peut aussi former des homooligomères (Mastrangelo et al.,

1991) et est capable d'interagir avec le facteur de transcription NF-Y (Nuclear Factor Y) (Roder et al., 1999).

-Les facteurs à glissière à leucine sont constitués d'un domaine riche en leucine et se fixent à l'ADN en dimérisant. Ils possèdent deux régions fonctionnelles. La région à la base du dimère est constituée par deux hélices alpha maintenues face à face par une zone riche en leucine induisant des interactions de type hydrophobe. L'autre région de la protéine, riche en charges positives, se fixe sur les groupes phosphates (négatifs) de l'ADN (Figure 10 c).

-Les facteurs à motifs hélice-boucle-hélice (HLH) (Helix-Loop-Helix) dimérisent lorsqu'ils sont liés à l'ADN. Les HLH ont un motif de 40-50 acides aminés comportant deux hélices alpha séparées par une région de longueur variable en forme de boucle (Figure 10 d). La famille HLH comprend la sous-famille des facteurs basiques hélice-boucle-hélice (bHLH) à laquelle appartiennent les 4 facteurs de régulation myogénique (Myogenic Regulatory Factor, MRF) des vertébrés soit MyoD, Myf-5, la Myogénine et MRF4. Les bHLH reconnaissent le site consensus de liaison à l'ADN CANNTG nommé E-box.

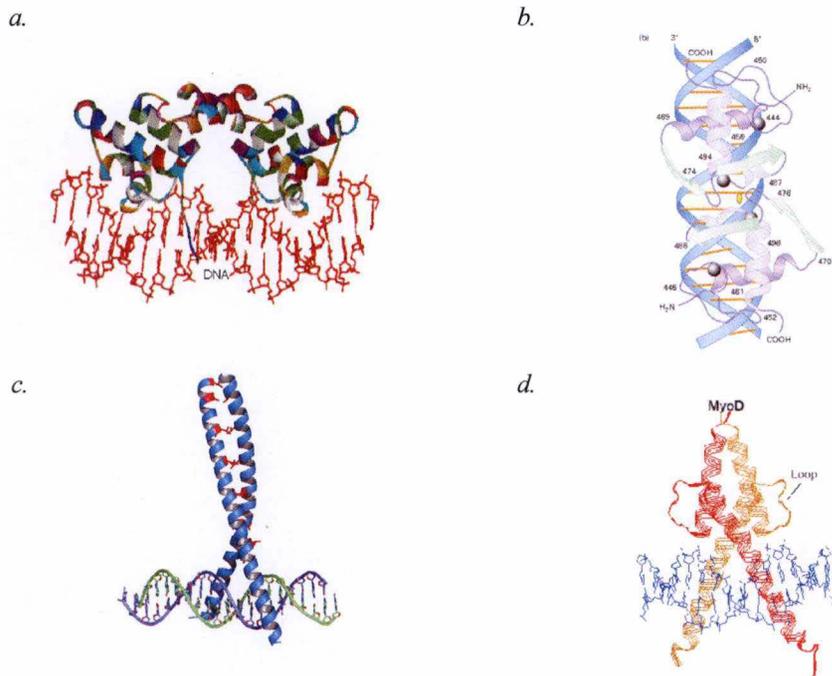


Figure 10 : Représentation des différentes classes de facteurs de transcription. a. Interaction entre un modèle de facteur de transcription de type hélice-tour-hélice et une séquence d'ADN (molecular biology). b. Liaison des doigts de zinc à l'ADN et positionnement des ions zinc (molecular cell biology, 2000 ch 10.5). c. Représentation de la liaison à l'ADN d'un domaine à glissière leucine (PiMol). d. Représentation de la liaison à l'ADN d'un facteur de transcription HLH (molecular biology)

3.3. Etude de la régulation transcriptionnelle de *Maged2*

Afin d'étudier le promoteur de *Maged2* nous avons choisi la technique des tests luciféras.

La luciférase est une enzyme capable de transformer son substrat, la luciférine, en oxyluciférine au cours d'une réaction qui libère un photon. La partie codante de la luciférase

est clonée en aval du promoteur d'intérêt et est ainsi sous contrôle de ce dernier. Des cellules sont transfectées avec cette construction, soumises aux différentes conditions expérimentales et lysées en vue de récolter les protéines. L'activité luciférase est proportionnelle à l'activité du promoteur et peut être quantifiée précisément par mesure de la luminescence. Ce système couramment utilisé est quantitatif mais est néanmoins très artificiel. En effet, ici le promoteur est extrait de son microenvironnement cellulaire et ne subit donc pas les régulations par les cofacteurs transcriptionnels de classe IV et V qui remodelent la chromatine.

Matériel et Méthodes

1. Détermination des dépôts de transcriptions par 5' RACE (GeneRacerTM Kit invitrogen)

1.1. Préparation d'ARN

L'ARN est préparé à partir de C2C12 différenciées pendant 2 jours. L'extraction d'ARN est réalisée par colonne RNeasy Midi kit Quiagen. L'extraction se déroule à température ambiante, le plus rapidement possible dans un environnement RNase free.

- Laver les cellules 1X au PBS
- Lysér les cellules avec 600µl de tampon RLT
- Racler les cellules
- Collecter les cellules dans un eppendorf RNase free
- Vortexer 15sec
- Homogénéiser la suspension 5 fois dans une aiguille 20G
- Additionner un volume d'éthanol 70%
- Placer le lysat sur la colonne centrifuger 5 min à 5000g, jeter la phase liquide
- Ajouter 4ml de buffer RW1 centrifuger 5 min à 5000g, jeter la phase liquide
- Ajouter 2.5ml de buffer RPE centrifuger 5 min à 5000g, jeter la phase liquide
- Eluer avec 30µl d'eau RNase free
- L'ARN obtenu est dosé au spectrophotomètre (260nm).

1.2. Déphosphorylation des ARN « tronqués »

- Dans un eppendorf stérile et RNase free, faire le mix suivant :
 - ARN: 1,8µg
 - 10X CIP Buffer: 1µl
 - RNaseOutTM (40 U/µl): 1 µl
 - CIP (10 U/µl): 1µl
 - Volume total 10µl
- Mixer en pipettant et vortexer`
- Incuber 1h à 50°C
- Garder sur glace
- Précipitation de l'ARN par Phénol-chloroforme
 - Ajouter 90µl d'eau DEPC et 100µl de phénol chloroforme
 - Vortexer vigoureusement
 - Centrifuger à vitesse maximal durant 5min à RT (room temperature)
 - Transférer la phase aqueuse dans un nouvel eppendorf
 - Ajouter 2µl de glycogène, 10µl de sodium acetate (3M, pH5.2), mixer
 - Ajouter 220µl d'éthanol 95%, vortexer
 - O/N (over night) à -20°C
 - Centrifuge à vitesse maximal 2 min à 4°C
 - Sécher le précipité
 - Resuspendre dans 7µl d'eau DEPC

1.3. « Dé-cappage » de la cape 5' des ARN entiers

- Dans un eppendorf stérile, préparer le mix suivant :
 - Dephosphorylated RNA 7 μ l
 - 10X TAP Buffer 1 μ l
 - RNaseOut™ (40 U/ μ l) 1 μ l
 - TAP (0.5 U/ μ l) 1 μ l
 - Total Volume 10 μ l
- Vortexer doucement
- Incuber 1h à 37°C
- Garder sur glace
- Précipitation de l'ARN au phénol chloroforme (voir point 1.2)

1.4. Ligation du GeneRacer oligo à l'ARN « dé-cappé »

- Dans l'eppendorf contenant 25 μ g d'oligonucléotide GeneRacer RNA oligo lyophilisé, ajouter 7 μ l d'ARN déphosphorylé et pipeter plusieurs fois pour resuspendre l'oligonucléotide
- Incuber 5min à 65°C
- Placer sur glace 2 min
- Ajouter les réactifs suivants et mélanger en pipettant :
 - Tampon ligase 10x 1 μ l
 - ATP 10mM 1 μ l
 - RNaseOut™ (40 U/ μ l) 1 μ l
 - T4 RNA ligase (5 U/ μ l) 1 μ l
 - Volume final 10 μ l
- Incuber 1h 37°
- Précipitation de l'ARN (Voir point 1.2)

1.5. Rétrotranscription de l'ARNm en ADNc

- Ajouter aux 10 μ l d'ARN dé-cappés précédemment obtenus :
 - 1 μ l du primer de séquence «5'- ttttggtcggggttaggcattgtc-3' » situé 300pb en aval de l'ATG
 - 1 μ l de dNTP (25mM)
- Incuber 5 min à 65°C
- Mettre sur glace 2min
- Ajouter au 12 μ l ce mix :
 - RT 5x buffer 4 μ l
 - surperscriptIII 0.5 μ l
 - Eau sterile 2 μ l
 - RNaseOut (40U/ μ l) 1 μ l
 - Volume total 20 μ l
- Mélanger et incuber 1h à 45°C
- Incuber 15 min à 85°C pour inactiver la retro-transcriptase

1.6. Amplification des extrémités 5' par PCR

- Préparer le mix PCR suivant :
 - Reverse GSP (10 μ M) 1.5 μ l
 - GeneRacer 5'Primer (10 μ M) 4.5 μ l
 - cDNA 1 μ l
 - Tampon (10X) 5 μ l

- cDNA 1µl
 - Tampon (10X) 5µl
 - dNTP (2mM) 7.5µl
 - Platinum *PFX* DNA (2.5U/µl) 0.5µl
 - MgSO₄ (50mM) 1µl
 - Volume total 50µl
- Purification sur gel de l'ADN :
 - Exciser le fragment de gel d'agarose contenant la bande d'ADN d'intérêt à l'aide d'un scalpel et mettre dans un tube de 1,5mL
 - Dans un tube eppendorf, ajouter un volume de « membrane binding solution » (guanidine isocyanate) équivalent au poids du gel à purifier
 - Vortexer et incuber 10 min à 55°C
 - Vortexer à nouveau
 - Placer une mini colonne dans un tube collecteur
 - Transférer le gel dissout sur une minicolonne SV et incuber une minute à température ambiante
 - Centrifuger 1 minute la minicolonne à 13 000 rpm
 - Vider le tube collecteur
 - Laver la colonne au moyen de 700µL de « membrane wash solution » dilué avec de l'éthanol 95%
 - Centrifuger une minute à 10 000 rpm
 - Vider le tube collecteur
 - Relaver la membrane par 500µL de « membrane wash solution »
 - Centrifuger 5 min à 10 000 rpm
 - Vider le tube collecteur
 - Centrifuger une minute la colonne
 - Ajouter 20µL de nucléase free water à la colonne
 - Laisser une minute à température ambiante puis centrifuger une minute à 10 000 rpm

1.7. Clonage de l'ADNc dans PCR4-TOPO

Le clonage est réalisé par électroporation (voir point 3.5)

Mix :

- 4µl de produit PRC ADNc
- 1µl de PCR4-TOPO (Invitrogen)

1.8. Analyse des séquences

- Les séquences obtenues sont alignées sur la séquence de Maged2 à l'aide du programme BLAST (NCBI)

2.2. *TransFact*

Permet l'étude de facteurs de transcription grâce à son programme Match 11.2 sur une séquence donnée. Nous avons choisi pour notre recherche une base de calcul ne tenant compte que des facteurs connus pour être impliqués dans les tissus musculaires minimisant les faux positifs (<http://www.biobase-international.com>)

3. Clonage des séquences promotrices de *Maged2* dans pGL3-basic

3.1. *Amplification par PCR des séquences promotrices de Maged2*

- La région promotrice de *Maged2* a été amplifiée par PCR. La matrice d'ADN utilisée est un cosmide contenant la séquence de *maged2* de souris sur un fond génétique C57/BL6/J.

La polymérase utilisée est une polymérase « haute fidélité » PFU (Fermentas)

- Dans un eppendorf stérile sur glace, préparer le mix suivant :
 - 5µl tampon 10X
 - 5µl dNTP (10µM)
 - 2.5µl amorce sens (10µM)
 - 2.5µl amorce anti-sens (10µM)
 - 0.5µl PFU (25U/µl) (haute fidélité, Fermentas)
 - ADN 50ng
 - Volume final 50µl

	Promoteur <i>maged2</i>	Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3
Amorce sens	primer PGL3 luc	mD2prom3_K pnI	mD2prom4_KpnI	mD2prom5_K pnI
Amorce anti-sens	reverse primer PGL3 luc	reverse primer PGL3 luc	reverse primer PGL3 luc	reverse primer PGL3 luc
Programme	2' à 95°C			
	20 X	45'' à 95°C 30'' à 59°C		
Élongation à 73°C 20X	5'	5'	5'	5'
Élongation finale à 73°C	7'			

3.2. *Vérification du produit amplifié par électrophorèse en gel d'agarose*

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN dans un champ électrique en fonction de leur poids moléculaire. Le pourcentage d'agarose est inversement proportionnel au poids moléculaire (PM) des fragments à séparer. Du Bromure d'Ethidium (BrEth), un agent intercalant et fluorescent est ajouté à l'agarose permettant la visualisation de l'ADN aux UV. Le PM des fragments est estimé par co-migration des fragments d'ADN avec des marqueurs de Poids Moléculaire connu.

Préparation du gel :

- Le gel d'agarose à 0.8% est coulé dans la cuve à électrophorèse contenant un peigne
- Laisser le gel se solidifier
- Retirer le peigne

Dépôt des échantillons :

- 8µl de TE
- 2µl de produits PCR
- 2µl de bleu ADN 6x

Migration des échantillons :

- Remplir la cuve de TAE 1x de façon à immerger le gel
- Faire migrer l'ADN par électrophorèse

3.3. Restriction des inserts et des vecteurs

Les fragments de promoteurs amplifiés par PCR et le vecteur pGL3-basic sont digérés par les enzymes de restriction KpnI et SacI.

- Sur glace, préparer le mix suivant :
 - ADN 5µg
 - Tampon J de fermentas 2µl
 - KpnI (10U/µl) 0.5µl
 - SacI (10U/µl) 0.5µl
 - BSA 0.2µl
 - Vol total : 20µl
- Incuber 3h à 37°C
- Purification des produits de restriction par phénol-chloroforme (Voir point 1.2)

3.4. Ligation des produits PCR restreints par SacI et KpnI dans pGL3-basic

- Dans un eppendorf, réaliser le mélange suivant en ajoutant le vecteur pGL3-basic (entre 50 et 150 ng) et l'insert (promoteur maged2, fragment 1, fragment 2 ou fragment3) dans un rapport moléculaire (1:3) :
 - 2µL de tampon T4 DNA ligase 10x (NEB)
 - 1µL de DNA T4 ligase (NEB)
 - Porter à 20µL avec de l'eau
 - pGL3-Basic et insert en rapport 1 :3
- Incuber O/N à 14°
- Purification par phénol chloroforme (voir point 1.2)
- Resuspendre dans 15µl d'eau

3.5. Transformations d'E.coli par choc électrique

- Sortir les bactéries DH5alpha du congélateur à -80°
- Ajouter 1µl du produit de ligation
- Mélanger doucement

- Mettre les bactéries dans une cuvette à électroporation préalablement refroidie dans la glace
- Provoquer un choc électrique court, 5msec à 2300V
- Ajouter 500ml de LB
- Transférer le tout dans un Ependorff
- Incuber 1h à 37°C
- Etaler 2, 20µl et 200µl de la suspension contenant les bactéries sur des boites de LB-Agar contenant 100 mg/ml d'ampicilline
- Incuber O/N à 37°C

3.6. Isolation de clones d'intérêts

3.6.1. Par PCR

- Reprendre plusieurs colonies dans 30µl d'eau stérile
- Vortexer
- Réaliser le mix PCR suivant pour un volume total de 25µl:
 - Buffer 10x 2.5µl
 - dNTP (2mM) 2.5µl
 - Bactéries diluées 1µl
 - GoTaq polymérase (promega) 0.125µl
 - Ajouter 2.5µl de chaque amorce comme indiqué dans le tableau :

		Promoteur maged2	Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3
Amorce sens		mD2prom5 KpnI			
Amorce anti-sens		reverse primer PGL3 luc			
Programme	1X	3' à 95°C			
	20X	30'' à 95°C 30'' à 59°C			
Élongation à 72°C		1'			
Elongation finale à 72°C		7'			

- Analyser les produits PCR par électrophorèse sur gel (voir point 3.2)

3.6.2. Par restriction:

- Inoculer les bactéries positives en PCR dans 5ml de LB contenant 100 mg/ml d'ampicilline.
- Incuber O/N à 37°C
- Centrifuger 10 min à 2500 rpm afin de culoter les bactéries
- Décantier et resuspendre les bactéries dans 300 µl de GTE+RNase
- Vortexer et laisser 10 min à RT
- Ajouter 450 mL de NaOH/SDS qui lyse les bactéries
- Retourner plusieurs fois le tube et laisser 10 min à 4°C
- Ajouter 360µL de KAc/HA qui précipite l'ADN chromosomique et mélanger
- Centrifuger 10 min à 13 000 rpm pour éliminer le précipité

- Incuber O/N à 37°C
 - Centrifuger 10 min à 2500 rpm afin de culoter les bactéries
 - Décanter et resuspendre les bactéries dans 300 µl de GTE+RNase
 - Vortexer et laisser 10 min à RT
 - Ajouter 450 µL de NaOH/SDS qui lyse les bactéries
 - Retourner plusieurs fois le tube et laisser 10 min à 4°C
 - Ajouter 360µL de KAc/HA qui précipite l'ADN chromosomique et mélanger
 - Centrifuger 10 min à 13 000 rpm pour éliminer le précipité
 - Reprendre le surnageant et y ajouter un volume de phénol-CiAA
 - Vortexer et centrifuger 15 min à 13000 rpm
 - Reprendre la phase aqueuse et y ajouter 1 volume de chloroforme
 - Vortexer et centrifuger 15 min à 13000 rpm
 - Reprendre la phase aqueuse
 - Ajouter 2.5 volumes d'éthanol 100% et laisser 20min à température ambiante
 - Centrifuger 15 min à 13000 rpm et décanter
 - Ajouter 200 µL d'éthanol 70% pour rincer le culot
 - Décanter et laisser sécher le culot
 - Reprendre le culot dans 100µl d'eau MilliQ
- Restriction par l'enzyme KpnI et SacI (voir point 3.3)

4. Réalisation et Clonage dans pGL3-basic des séquences promotrices de Maged2 mutées pour les sites de liaison des facteurs de transcription YY1 et E47

- La mutagenèse est réalisée en 3 PCR distinctes avec la PFU
- Mix PCR :
 - 5µl tampon 10X
 - 5µl dNTP (10µM)
 - 2.5µl amorce 1 (10µM)
 - 2.5µl amorce (10µM)
 - 0.5µl PFU (haute fidélité, Fermentas)
 - ADN 50ng
 - Volume final 50µl
- PCR réalisées :

		PCR1 E47	PCR1 YY1	PCR2 E47	PCR2 YY1
Amorce sens		mD2prom4_KpnI	mD2prom4_K pnI	mD2d4_E47_S	mD2d4_YY1_ S
Amorce anti-sens		vmD2d4_E47_A S	mD2d4_YY1_ AS	reverse primer PGL3 luc	reverse primer PGL3 luc
Programme	25 X	2' à 95°C 45'' à 95°C 30'' à 59°C			

Amorce sens		mD2prom4_KpnI		mD2prom4_KpnI	
Amorce anti-sens		reverse primer PGL3 luc		reverse primer PGL3 luc	
Programme		2' à 95°C			
	25 X	45'' à 95°C 30'' à 59°C			
Élongation à 73°C 25X		3'	3'	3'	3'
Elongation finale à 73°C		7'			

- Purification sur gel voir point 1.6
- Restriction par KpnI et SacI voir point 3.3
- Ligation dans le plasmide pGL3-basic voir point 3.4
- Transformation voir point 3.5
- Isolation par sélection et purification sur gel voir point 3.2

5. Culture cellulaire

5.1. Culture des C2C12 et NIH 3T3

Les C2C12 et les NIH 3T3 sont cultivées du milieu DMEM + 10% FBS (Fetal Serum Bovin) + antibiotiques pénicilline/streptovidine

5.2. Initiation de la différenciation des myoblastes C2C12

Les myoblastes murins C2C12 non confluent se différencient *in vitro* en myotubes par le remplacement du milieu DMEM + 10% FBS par un milieu pauvre en sérum (1% de sérum de cheval).

5.3. Expression des plasmides pGL3 dans les C2C12 et les NIH3T3

5.3.1. Préparation d'ADN (colonne)

- Pour une colonne NucleoBond MIDI :
 - Culoter les bactéries par centrifugation à 2500 rpm durant 15 min.
 - Lyse des bactéries grâce au buffer S1 (4ml) + RNase
 - Addition du buffer S2 (4ml), incubé à RT 2 à 3 min
 - Ajouter le buffer S3 (4ml) froid, incubé sur glace 5 min
 - Verser sur la colonne laisser passer le liquide, l'ADN se lie à la colonne
 - Ajouter 10ml de buffer N3 de lavage.
 - Elution de l'ADN se réalise avec le buffer N5 (5 ml)
 - Centrifuger à 15000g durant 30min à 4°C
 - Ajouter 2 ml d'éthanol 70% et centrifuger 10 min à 15000g à RT
 - Laisser sécher l'ADN qui est resuspendu dans de l'eau MilQ

- Ajouter 10ml de buffer N3 de lavage.
- Elution de l'ADN se réalise avec le buffer N5 (5 ml)
- Centrifuger à 15000g durant 30min à 4°C
- Ajouter 2 ml d'éthanol 70% et centrifuger 10 min à 15000g à RT
- Laisser sécher l'ADN qui est resuspendu dans de l'eau MilQ

5.3.2. *Ensemencement des cellules*

Pour les C2C12 : toujours avant que les cellules ne soient confluentes

- Rincer les cellules 1 fois avec 10 ml de PBS
- Retirer le PBS
- Ajouter 2ml de trypsine pendant 5 à 10 min à 37°C
- Compter les cellules (cellules de Burkner)
- Ensemencer : 30 000 en plaque 12 puits + 1ml DMEM (+10%FBS+pénicilline/streptovidine)

Pour les NIH3T3 :

- Rincer les cellules 1 fois avec 10 ml de PBS
- Retirer le PBS
- Ajouter 2ml de trypsine pendant 5 à 10 min à 37°C
- Compter les cellules (cellules de Burkner)
- Ensemencer :
 - 30 000 en plaque 12 puits + 1ml DMEM (+10%FBS+pénicilline/streptovidine)

5.3.3. *Transfections transitoires*

Les transfections transitoires sont réalisées avec l'agent de transfection Turbofect (Fermentas).

- Préparer le mix :
 - 2µg de plasmide
 - 200µl de milieu sans sérum ni antibiotiques.
 - 4µl de d'agent de transfection « Turbofect », mélanger par pipettage.
 - Incuber 20 min à RT
- Ajouter 200ul du mix par chaque puits.
- Incuber 24 heures.

6. Test Luciférase

6.1. Transfection des plasmides

(Voir point 4.5.3)

Les différentes transfections réalisées pour les tests luciférase sont :

CMV-PRL Renilla 0.2mg	pGL3-basic 2mg		
	pGL3-basic promoteur maged2 2mg		
	pGL3-basic fragment 1 2mg		
	pGL3-basic fragment 2 2mg		
	pGL3-basic fragment 3 2mg		
	pGL3-basic promoteur maged2 1mg	Plasmide d'expression de MyoD 1mg	
	pGL3-basic promoteur maged2 1mg	Plasmide d'expression de Myogénine 1mg	
	pGL3-basic promoteur maged2 1mg	Plasmide d'expression de Mef2c 1mg	
	pGL3-basic promoteur maged2 0.70mg	Plasmide d'expression de MyoD 0.70mg	Plasmide d'expression de Myogénine 0.70mg
	pGL3-basic promoteur maged2 0.70mg	Plasmide d'expression de Mef2c 0.70mg	Plasmide d'expression de MyoD 0.70mg
pGL3-basic promoteur maged2 0.70mg	Plasmide d'expression de Mef2c 0.70mg	Plasmide d'expression de Myogénine 0.70mg	
pGL3-basic fragment 2 délétion E47 2mg			
pGL3-basic fragment 2 délétion YY1 2mg			

6.2. Lyse des cellules

- Laver les puits 2 fois avec du PBS 1X
- Lysér les cellules avec de 250µl de PLB (passive lysis buffer).

6.3. Mesure de l'activité luciférase

- Prélever 30 µl du lysat en tube à luminescence
- Ajouter 100 µl de Luciferase assay Reagent (LARII)
- Mélanger par pipetage à RT
- Première mesure au luminomètre (10sec), cette lecture quantifie la lumière émise par la luciférase de luciole du vecteur pGL3 basic
- Ajouter 100 µl de solution Stop & Glow
- vortexer

- Deuxième mesure (10sec), cette lecture quantifie la lumière émise par la luciférase Renilla.

7. PCR quantitative en temps réel

7.1. Préparation d'ARN

- Voir point 1.1

7.2. Retrotranscription des ARNm en ADNc

- kit promega ImProm-II™ Reverse Transcription System
 - Engager 1µg d'ARN
 - Placer les tubes PCR sur la glace
 - Faire le mix suivant :
 - 1µg ARN
 - 1µl Random Primer 500µg/ml
 - Volume final 5µl (eau DEPC)
 - Mettre à 70°C 5min
 - Mettre sur glace 5'
 - Préparer le mix de reverse transcription :
 - ImProm-II 5X Reaction Buffer 4.0 µl
 - MgCl₂ (final concentration 1.5-8.0mM) 2,6 µl
 - dNTP Mix (0.5mM each dNTP) 1.0µl
 - Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor 40U/ml (20U) 0,5µl
 - ImProm-II Reverse Transcriptase 1.0µl
 - Volume final 15µl
 - Vortexer doucement et laisser sur glace
 - Mettre 15µl du mix de reverse transcriptase dans les tubes contenant l'ARN et les amorces
 - Programme PCR :
 - 25°C, 5min (annealing)
 - 42°C, 1h (extension)
 - 70C°, 15min (inactivation de la RT transcriptase)

7.3. PCR quantitative

La real time PCR quantitative ou PCR en temps réel quantitative est basée sur la technique classique de PCR (Polymerisation Chain Reaction). A chaque cycle, la quantité d'ADN amplifiée est mesurée grâce à l'utilisation d'un fluorochrome le SYBR green. Le SYBR green est un agent intercalant qui vient s'insérer dans le petit sillon de l'ADN double brin et émet un signal fluorescent à 520 nm. La fluorescence émise est directement proportionnelle à la quantité d'ADN. Donc, plus la quantité d'ADN de départ est importante, plus le signal fluorescent sera important. Le cycle seuil (ou cycle treshold)

correspond au cycle de PCR où la fluorescence émise peut se distinguer du bruit de fond. A ce moment, la phase exponentielle d'amplification débute.

- Diluer l'ADNc pour obtenir une concentration de 0,4 ng/μl
- Préparer le mix Syber Green :
 - Syber green 10μl
 - Primer F (2,4μM) 2,5μl
 - Primer R (2,4μM) 2,5μl
- Distribuer 15μl de ces mix dans tous les puits
- Ajouter ADN, 5μl/puits
- Mettre un film autocolant sur la plaque
- Centrifuger la plaque
- Programme de la RT-PCR 40X :
 - 2 min à 50°C
 - 10 min à 95°C
 - 15 sec à 95°C
 - 1min à 60°C.

8. Oligonucléotides utilisés :

Oligonucléotides des fragments PCR:

primer PGL3 luc	5'CAAGGTACCCCAGTATGGGCAAAGGTGACC
reverse primer PGL3 luc	5'CAGAGCTCCGTCGTATCCCTTGTTCTGCC
mD2prom3_KpnI	5'CAAGGTACCGCCGGTGTAGGGAGAAAGTG
mD2prom4_KpnI	5'CAAGGTACCTTTAGTGGGGAGGGCAGTATC

Oligonucléotides de comprenant une mutation :

mD2d4_E47_S	5'CCCTCTGGGATCAAGAGAAAACC
mD2d4_E47_AS	5'GGTTTTCTCTTGATCCCAGAGGG
mD2d4_YY1_S	5'GCTGGGCCTAAGACAGAATCACTAG
mD2d4_YY1_AS	5'CTAGTGATTCTGTCTTAGGCCCAGC

Oligonucléotides employés pour de séquençage :

primer PGL3 luc	5'CAAGGTACCCCAGTATGGGCAAAGGTGACC
reverse primer PGL3 luc	5'CAGAGCTCCGTCGTATCCCTTGTTCTGCC
mMaged2 seq1	5'TCGAAAAGGGGGAAACAACCC
mMaged2 revseq1	5'TTCTCCCTACACCGGCTATAC
mMaged2 PCR1	5'GCTTTGGCGTCAGACAGCATTG
mMaged2 PCR2	5'CTCACACCGCATCAAATGCAG
mMaged2 seq2	5'GGATGCAGAGAAGGGTTAAGG
mMaged2 seq3	5'TCAATCCTGAGTTGAGGAGGG

Résultats et Discussions

1. Détermination des sites d'initiation de la transcription de *Maged2* dans les C2C12 en différenciation

Afin de caractériser la région promotrice de *Maged2* il est nécessaire d'identifier les sites d'initiation de la transcription. Nous avons choisi d'utiliser une méthode de 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). Cette méthode est réalisée au départ de l'ARNm des C2C12 prélevé deux jours à près l'initiation de la différenciation, stade auquel la protéine *Maged2* est fortement exprimée (Figure 9). Dans un premier temps l'ARNm est traité pour en déphosphoryler les extrémités 5', ensuite la coiffe est dégradée et l'ARNm est alors rétro-transcrit en ADNc avec un oligonucléotide universelle et un oligonucléotide choisi en aval du site d'initiation de la traduction. Enfin, la région 5' de cet ADNc est amplifiée par PCR. Ces produits PCR sont ensuite clonés et séquencés pour être analysés.

Les séquences obtenues par 5' RACE mettent en évidence 3 départs de transcription possibles (Figure 11) situés respectivement à -1578 pb, -960pb et -238pb du codon initiateur de la traduction (ATG). Ces 3 sites d'initiation ne semblent pas être transcrits à la même fréquence. Sur les 10 séquences de clones obtenues et séquencées, nous trouvons 2 départs de transcription en -1578pb, 4 départs de transcription en -960pb et 4 départs de transcription en -238pb.

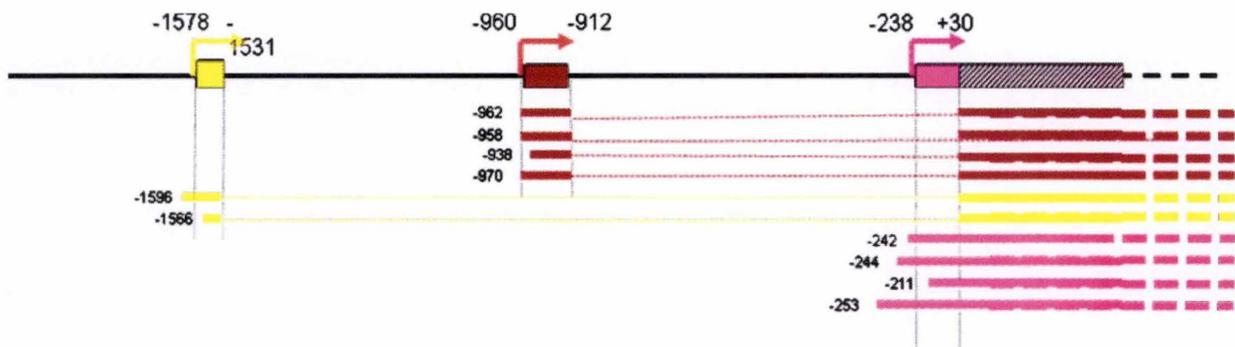


Figure 11 : Représentation schématique de la région 5' de *Maged2* par rapport au site d'initiation de la transcription (ATG). Les 3 départs potentiels de transcription et leurs exons respectifs sont représentés en jaune, rouge et violet. Les séquences obtenues par 5'RACE sont schématisées en traits épais.

2. Analyse *in silico* du promoteur de *Maged2*

Pour identifier les sites de liaison potentiels des facteurs de transcription impliqués dans la myogenèse, la suite de logiciels Transfac 2008.3 (<http://www.biobase-international.com>) a été utilisée. Celle-ci permet d'identifier des sites possibles de liaison de facteurs de transcription grâce à son programme de calcul MATCH 11.2. L'analyse de la région promotrice de *Maged2* a été réalisée avec une base de calcul spécifique aux tissus musculaires. Les figures

12 et 13 montrent les sites potentiels de liaison à l'ADN des facteurs de transcription ayant un degré de certitude supérieur ou égal à 90%. Ce degré de certitude est calculé en fonction de la similitude entre le site potentiel de liaison à l'ADN et la séquence analysée.

Nous avons ciblé la région comprise entre -2610 et 0 par rapport à l'ATG. Cette région se situe un peu plus de 1000 paires de bases (pb) en amont du premier site d'initiation de la transcription (-1578bp) de *Maged2* et s'achève un peu plus de 200pb en aval du troisième site d'initiation (-238pb).

La région promotrice analysée comporte 2 boîtes TATA, mais leurs localisations sont atypiques. En effet, les boîtes TATA fonctionnelles se situent environ 30 pb en amont du site d'initiation de la transcription, or, ici, la boîte TATA la plus proche d'un site initiation de transcription en est distante de 300pb.

La région comprise entre -290pb et -1700pb, compte 19 sites potentiellement reconnus par le facteur SP1, facteur capable de jouer le rôle d'initiateur transcriptionnel, six sites de liaison aux facteurs TBP (TATA Binding Protéine), un site de liaison à TAF4 (TBP Associated Factor 4) et un site de liaison à NF-Y (Nuclear Factor Y). Il à noter que facteurs SP1 peuvent interagir avec TBP, TAF4 et NF-Y .

Vu leur nombre et la localisation des sites CpG, il est probable que la transcription de la région promotrice de *Maged2* soit initiée par ces îlots CpG plutôt que par des boites TATA.

Dans la région promotrice étudiée, six sites de liaison pour le facteur de transcription YY1 (Yin Yang1) sont également présents. YY1 est un facteur de transcription ubiquiste et hautement conservé entre les espèces. La littérature lui confère autant de rôles activateurs que répresseurs (pour revue, voir He et Casaccia-Bonfil, 2008). Dans le contexte de la myogenèse, il semblerait qu'YY1 soit un régulateur négatif de la myogenèse par son action répresseur du gène de l'actine alpha (Lee et al. 1994).

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux sites de liaison des facteurs de transcription spécifiques de la myogenèse. La région promotrice étudiée compte 4 E-Box. Ces sites sont reconnus par les facteurs de détermination myogénique (MyoD, Myf5, Myogénine et MRF4). La région comporte aussi 2 sites de liaison du facteur de transcription MEF2 (Myocyte Enhancer binding Factor 2) et 4 sites de liaison pour E47, une protéine E capable de dimériser avec les MEF pour activer la transcription.

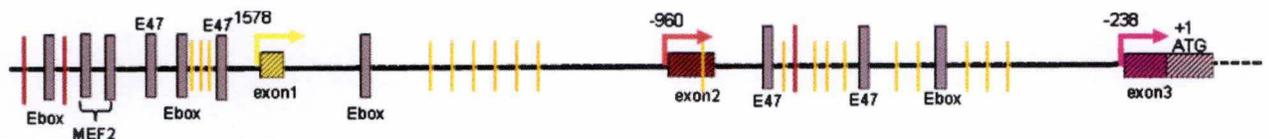


Figure 12 : Représentation schématique de la région promotrice de *Maged2* située entre +1pb et -1700pb par rapport au codon initiateur ATG. Les 3 départs potentiels de transcription de transcription et les premiers exons qui correspondent sont représentés respectivement en jaune, rouge et violet. Les sites potentiels de liaison de facteurs de transcription myogéniques ayant un degré de certitude supérieur ou égal à 90% (selon la base de calcul MATCH 11.2) sont annotés sur la séquence ainsi que les sites YY1 représentés par des traits rouges et les sites SP1 représentés par des traits oranges.

```

                TBP
-2610AAGAAAGATCTTGAATTTATTTCTATAACTACCGTGAATTATAGTTTATAATAAGCTTT
                EBOX
-2550TTCTGGGTCTGCATTCACCTGCTCTATTGCTAATGATATTTGTCTACTTCTCTTTGTCT
-2490TTACATTTTATCTTGTCTCATGAAGACACCCAGTTGTTTATGTGAATTTATCAGGCAAC
                YY1
-2430AGAAGTGCCATTTCAAACTAGTGAAAAACGTTATTGAGGGTGAATCTGTCAATGCCATAA
                YY1
-2370TAAAAGTCATTACTTTGTACAGTTAACTTACGCTGAAAATGGTAGTTTTTTCAAATGAAT
                TBP
-2310TGAATCAGCAAAACATAATAAAACAACAAAACAGTCCAATATAGACACCAGGATGGTCCT

```

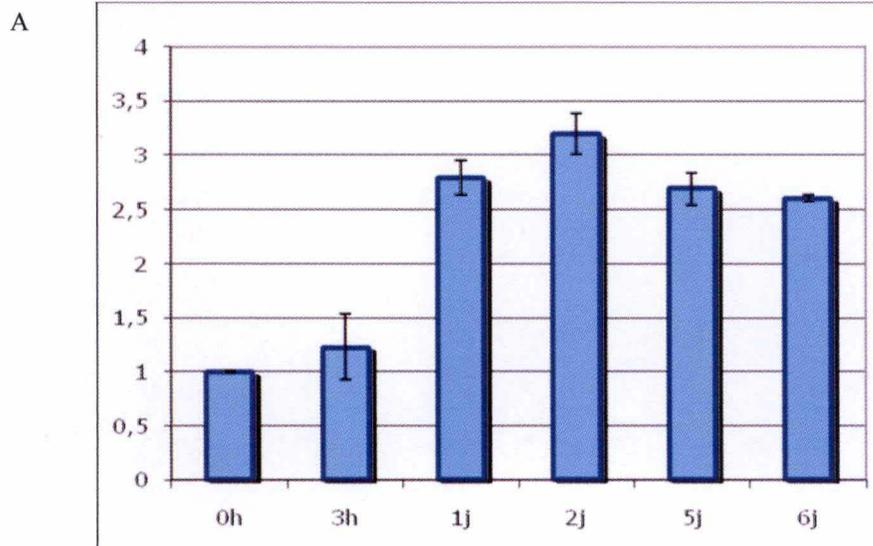

Figure 13 : Séquence de la région promotrice de *Maged2*. En encadré, figurent les sites de liaison à l'ADN des facteurs de transcription spécifiques des tissus musculaires de degré de certitude $\geq 90\%$ identifiés par le programme MATCH 11.2. La séquence se termine par le codon d'initiation de la traduction ATG.

3. Activité transcriptionnelle de la région promotrice de *Maged2* lors de la différenciation des C2C12

3.1. Expression de l'ARNm de *Maged2* au cours de la différenciation des C2C12

Afin d'évaluer la quantité de transcrite de *Maged2* dans les C2C12 en prolifération et en différenciation, nous avons réalisé des PCR quantitatives en temps réel (RT-PCRq) sur l'ADNc de C2C12 en prolifération et au cours de la différenciation (Figure 14 A et B). Les résultats montrent que le transcrite de *Maged2* est présent dans les C2C12 en prolifération. La quantité d'ARNm augmente très peu dans les heures qui suivent le retrait de sérum responsable de l'induction de la différenciation. Après 24 heures de différenciation, la quantité augmente de 3 à 4 fois et le maximum semble être atteint après 2 à 3 jours de différenciation. La quantité d'ARNm reste supérieure à celle mesurée lors de la phase proliférative durant plusieurs jours.

Contrairement à ce qui a été observé pour la protéine *Maged2*, l'ARNm n'augmente pas de façon très importante 3 heures après le retrait du sérum. Une augmentation plus importante est par contre observée 1 jour après l'initiation de la différenciation.



B

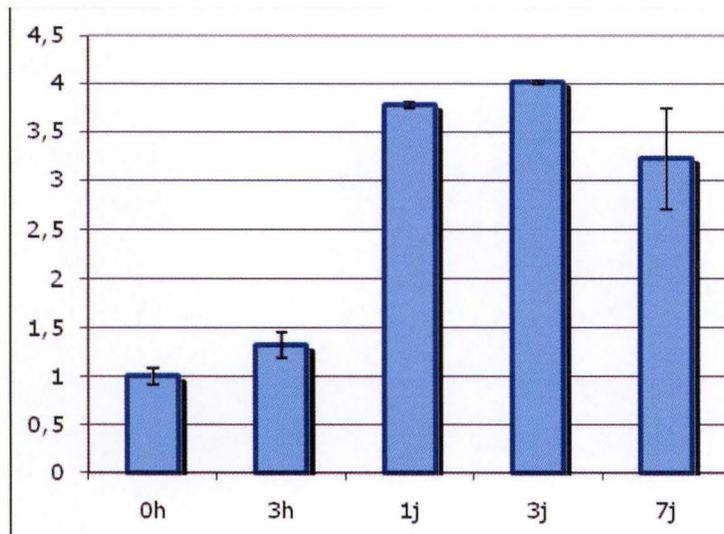


Figure14 : Analyse de la quantité d'ARNm de *Maged2* dans les C2C12 en différenciation par RT-PCRq au cours de 2 expériences indépendantes. A : Les cellules ont été prélevées avant le retrait de sérum (0h) et 3 heures, 1 jour, 2 jours, 5 jours et 6 jours après le retrait de sérum. B : Les cellules ont été prélevées avant le retrait de sérum (0h) et 3 heures, 1 jour, 3j et 7 jours après le retrait de sérum. L'expression de *Maged2* a été normalisée par rapport à l'expression de *GAPDH* et *L37*. La barre d'erreur correspond à l'écart type calculer à partir des triplicats de la même expérience.

3.2. Étude de la régulation de l'activité transcriptionnelle du promoteur de *Maged2* grâce à un système rapporteur

L'activité promotrice de *Maged2* a été analysée à l'aide d'un système rapporteur luciférase. Pour cela, des myoblastes C2C12 en prolifération ont été transfectés avec le vecteur pGL3 basic (Figure15) contenant le promoteur de *Maged2* cloné en amont de la séquence de la luciférase de luciole (Firefly luciférase). Cette construction exprimera la luciférase de façon directement proportionnelle à l'activité du promoteur *Maged2*.

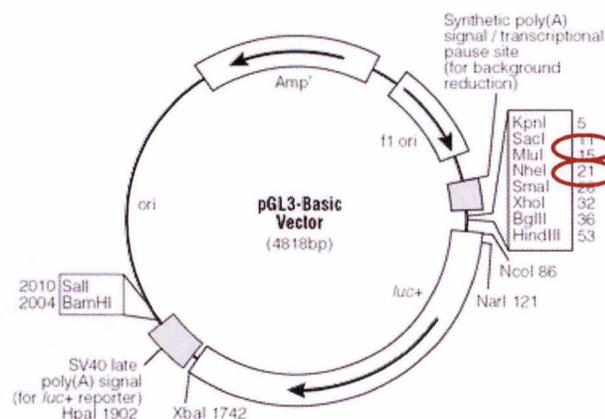


Figure15 : Représentation schématique du vecteur PGL3-Basic. Ce vecteur porte le gène de la luciférase (*LUC+*) (Firefly luciférase) en aval d'un site multiple de clonage. Ce vecteur contient aussi un gène de résistance à l'Ampicilline.

La région promotrice de *Maged2* a été amplifiée par PCR à partir d'un cosmide contenant la région promotrice de *Maged2*. Les oligonucléotides utilisés pour amplifier cette

région sont situés 1088pb en amont du premier site d'initiation de transcription et 306pb en aval du troisième site d'initiation de transcription. Les extrémités 5' des primers utilisés portent des bouts flottants contenant la séquence du site de restriction KpnI (amorce 5') ou SacI (amorce 3') qui permet l'insertion du produit PCR dans le site de clonage de pGL3-basic (Figure16).

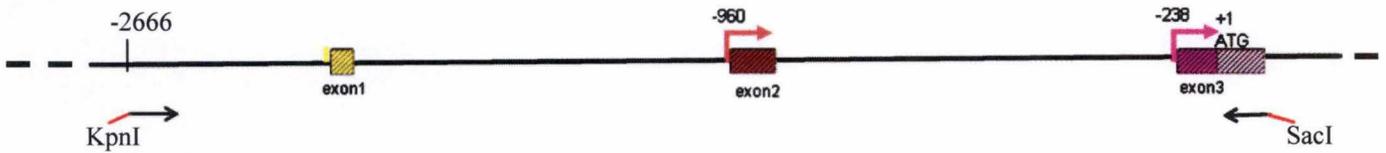


Figure16 : Représentation schématique de la localisation des oligonucléotides utilisés pour amplifier la région promotrice de *Maged2* par PCR en vue de la cloner dans le vecteur pGL3-Basic. Les oligonucléotides sont situés en -2666bp et 68pb par rapport au site d'initiation de la traduction (ATG).

Les C2C12 ont été transfectées avec le vecteur pGL3-Basic contenant le promoteur de *Maged2* (pGL3-Fragment 1) ou avec le vecteur pGL3-basic vide qui est un contrôle négatif. Chacun de ces vecteurs a été co-transfecté avec un plasmide d'expression pour la luciférase de Renilla. Cette luciférase est sous contrôle du promoteur fort CMV. L'expression de la luciférase de renilla est constitutive et ne varie pas avec la différenciation des C2C12. Elle fournit donc un contrôle interne et permet de normaliser les valeurs obtenues pour la luciférase expérimentale de luciole. Ceci permet donc d'éliminer une grande partie de la variabilité expérimentale (par exemple les variabilités liées à la transfection).

Nous avons étudié l'activité du promoteur de *Maged2* au cours d'une cinétique de six heures suivant le retrait de sérum initiant la différenciation. Cette cinétique a été choisie car elle correspond aux observations faites par Western Blot montrant l'apparition de la protéine *Maged2* dans les quelques heures suivant le début de la différenciation (Figure 9).

Au cours de ces 6 premières heures le promoteur de *Maged2* montre une activité transcriptionnelle significative, mais aucune variation de l'activité transcriptionnelle n'a été détectée au cours de cette période (Figure 17).

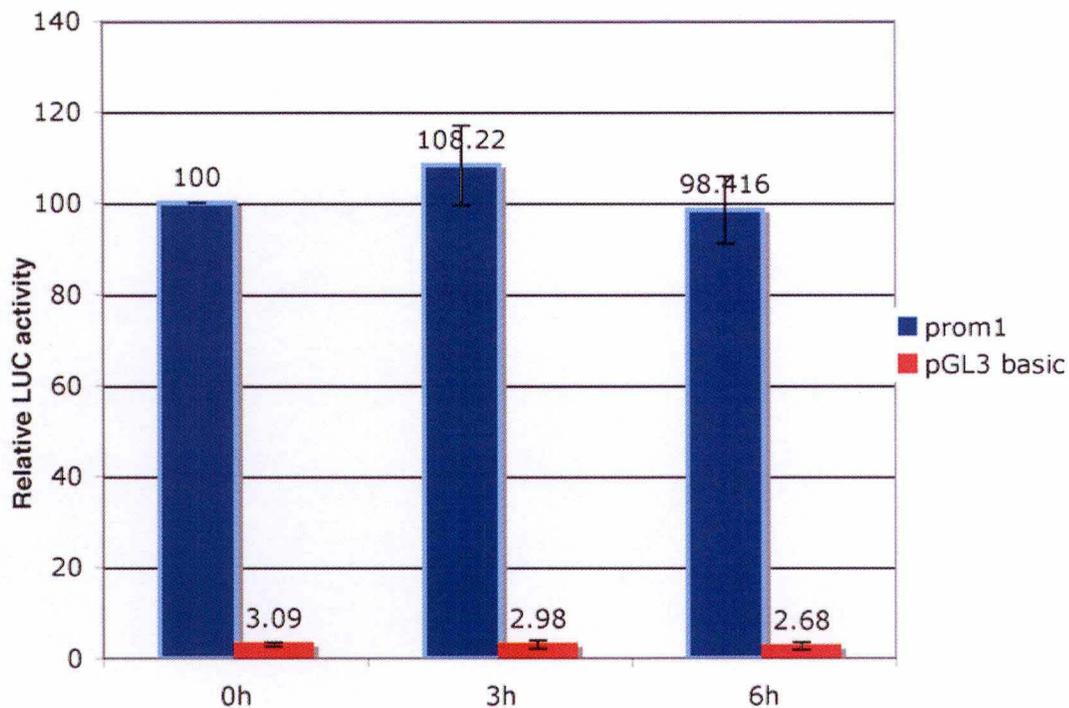


Figure 17 : *Activité Luciférase relative du promoteur de Maged2 au cours des 6 premières heures de la différenciation de C2C12. Les valeurs sont normalisées par rapport à la valeur obtenue dans les C2C12 en prolifération.*

Puisque qu'aucune augmentation de l'activité transcriptionnelle du promoteur de *Maged2* n'a été observée dans les six premières heures suivant le retrait de sérum, nous avons étendu la cinétique à 48 heures.

Vingt-quatre heures après le retrait du sérum l'activité de transcription de la région promotrice de *Maged2* augmente d'un facteur 5 et 48 heures après le retrait, elle augmente d'un facteur 40 (Figure 18)

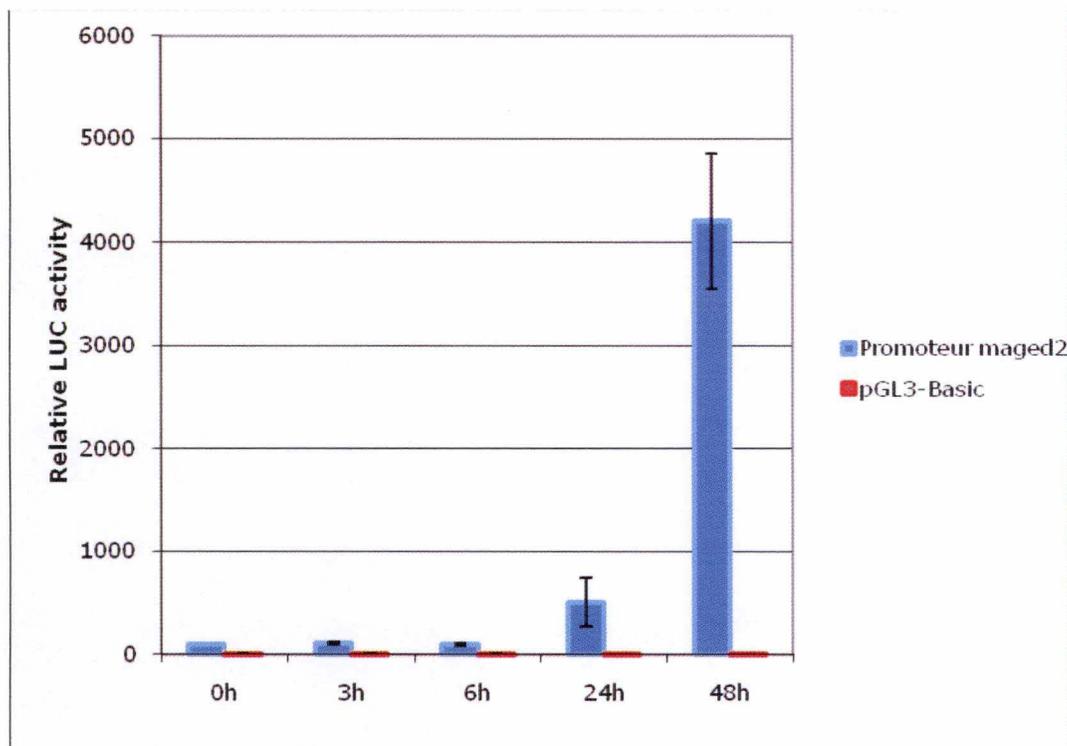


Figure 18: Activité Luciférase relative du promoteur de Maged2 et de pGL3-basic au cours de 48 heures de différenciation des C2C12. Les valeurs sont normalisées par rapport à la valeur obtenue pour le promoteur de Maged2 dans les C2C12 en prolifération.

En phase proliférative, on mesure une transcription constitutive de *Maged2* alors que la protéine n'est pas détectable. Le fait que la protéine ne soit pas détectée alors qu'on observe la présence du transcrite peut s'expliquer de différentes manières. Si la protéine est présente en faible quantité, il se pourrait que l'analyse en Western Blot n'ait pas été assez sensible pour la détecter. Il se pourrait aussi que la protéine soit continuellement dégradée en phase proliférative par le protéasome. Cette hypothèse a été testée par l'inhibition du protéasome par l'époxomycine, mais suite à cette expérience aucune augmentation significative de *Maged2* n'a pu être observée par Western Blot (M. Delimoy, communication personnelle). Enfin, il est possible que la traduction de l'ARN soit inhibée par un mécanisme impliquant des microARN. L'analyse des séquences cDNA par Patrocles (www.patrocles.org) révèle la présence de nombreuses interactions possibles du transcript avec plus d'une trentaine de microARN connus.

Les analyses par Western Blot (voir introduction, figure10) détectent la protéine *Maged2* dès 1 heure après le retrait du sérum. Dans les 3 heures, suivantes on observe une induction marquée de la protéine et cette expression augmente encore au cours des 48 heures suivantes. Les RT-PCRq réalisées montrent que la quantité d'ARNm augmente fortement après 24 heures. Les tests luciférase montrent une augmentation de l'activité de transcription 24 heures après le retrait du sérum. Cette activité transcriptionnelle augmente encore davantage après 48 heures.

L'augmentation très précoce (une heure après le retrait de sérum) de la protéine *Maged2* ne semble pas être causée par une régulation transcriptionnelle. Il semble donc qu'il y ait 2 niveaux de régulation de *Maged2* dans le cadre de la différenciation des myoblastes. Le

Après 24 heures : l'activité de transcription mesurée n'est pas significativement différente du promoteur complet.

Après 48 heures : l'activité transcriptionnelle est réduite de 50%.

Fragment 2 (-978pb à -68pb)

En prolifération : on mesure une diminution de l'activité de transcription d'environ 15%.

Après 24 heures : l'activité de transcription est environ 2.8 fois supérieure à celle du promoteur complet de *Maged2*.

Après 48 heures : L'activité de transcription de ce fragment ne semble pas être différente de celle de la région promotrice complète de *Maged2*. La moyenne des mesures d'activité luciférase du fragment2 est X fois supérieure à celle du « promoteur complet » mais la variabilité de l'activité de ce fragment est importante. On ne peut donc pas tirer de conclusion

Fragment de 3 (-655pb à -68pb)

En prolifération : on mesure une diminution de l'activité de transcription d'environ 70%.

Après 24 heures : l'activité de transcription est réduite de 50%.

Après 48 heures : L'activité de transcription est réduite de 50%.

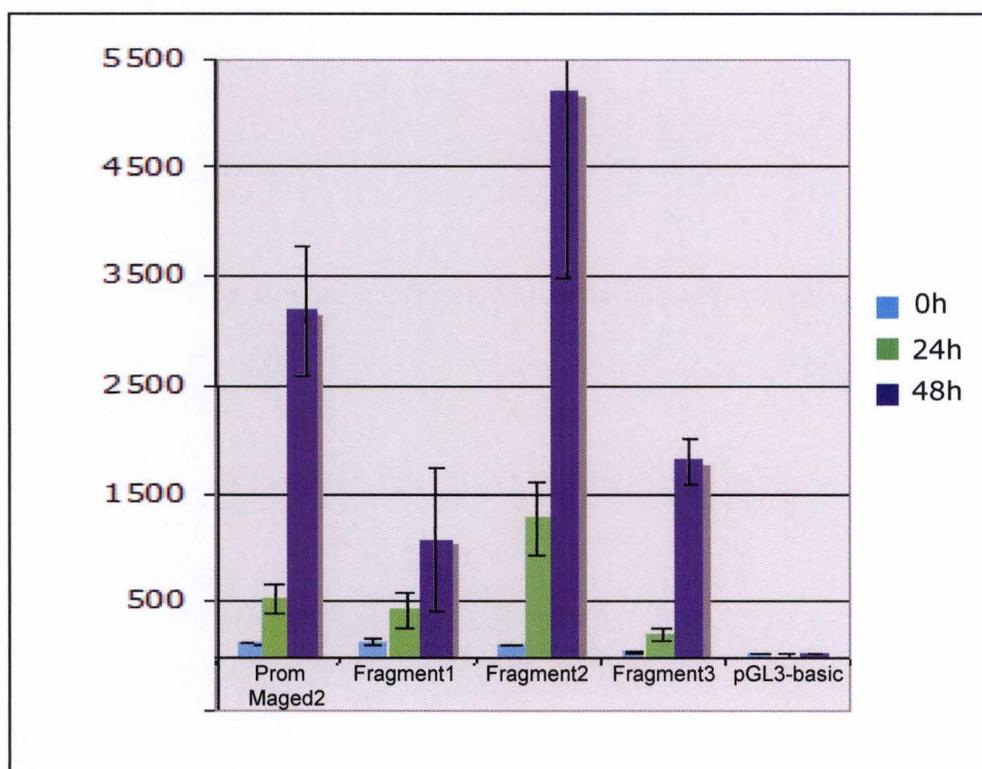


Figure20 : Activité Luciférase relative des fragments 1, 2 et 3 *Maged2* et du vecteur contrôle sans promoteur (pGL3-basic) au cours de 48 heures après induction de la différenciation des C2C12 par retrait de sérum. Les valeurs sont normalisées par rapport à la valeur obtenue pour le promoteur complet *Maged2* dans les C2C12 en prolifération (0h).

Pour la discussion de ces résultats, nous ne tenons compte que des sites de facteurs de transcription connus pour leur rôle dans les tissus musculaires et ayant, selon la base de calcul MATCH 11.2, un degré de certitude supérieur ou égal à 90%. Il est vraisemblable que d'autres facteurs de transcription ne correspondant pas à ces critères interviennent dans la régulation de la région promotrice de *Maged2*.

Fragment compris entre -2662pb et -1657pb

L'analyse *in silico* du fragment de la région promotrice comprise entre -2662p et -1657pb indique une plus faible conservation de cette région que des régions plus proches de la séquence codante avec 68% d'identité entre l'homme et la souris. Ce fragment comprend 2 Ebox, 2 sites Mef2, 1 site E47, 4 sites YY1 et 2 sites SP1. Sa suppression entraîne une diminution de l'activité de transcription qui pourrait être due à la perte des sites cités ci-dessus et/ou à la perte de la région située en amont du premier site d'initiation de la transcription. Ce fragment aurait un rôle global d'activation de la transcription.

Fragment compris entre -1657pb et -978pb

Ce fragment de la région promotrice présente une conservation nucléotidique homme-souris de 80%. Il compte 1 site de liaison de facteur de transcription E47, 1 site Ebox et 6 sites SP1. Cette région aurait un rôle répresseur au cours de la différenciation myogénique. Ce fragment ne contient pas la région en amont du second site d'initiation mais son activité de transcription est importante. Il est dès lors difficile de définir le rôle du second site d'initiation de la transcription.

Fragment compris entre -978pb et -655pb

Ce fragment de la région promotrice présente une conservation nucléotidique entre l'homme et la souris de 83%. Il comprend un site de liaison à l'ADN de YY1, E47 et NFY et 4 sites SP1. Il aurait un rôle activateur important tant en phase de prolifération des myoblastes C2C12 qu'en phase de différenciation de ceux-ci.

Fragment compris entre -655pb et -68pb

Ce fragment de la région promotrice présente lui aussi une conservation nucléotidique entre l'homme et la souris de 83%. Ce fragment inclut plusieurs sites de liaison à l'ADN, 1 site Ebox et 1 site E47. Cette région seule semble suffisante pour la transcription de *Maged2* en phase proliférative et pour l'induction en phase différenciative dans les C2C12.

3. Effet de la surexpression des facteurs de transcription Myogénine, MyoD et Mef2 sur l'activité du promoteur de Maged2

L'augmentation de l'activité du promoteur de *Maged2* lors de la différenciation des C2C12 suggère qu'il est régulé par des facteurs de transcription spécifiques de la myogénèse. Afin de tester cette hypothèse nous avons testé l'effet de la surexpression de la myogénine, de MyoD et de Mef2 sur l'activité transcriptionnelle de ce promoteur. Des vecteurs d'expression de ces protéines ont été co-transfectés avec le plasmide pGL3 comprenant le promoteur complet de *Maged2* dans des C2C12 en prolifération. Comme les MRF (MyoD et Myogénine) peuvent dimériser entre eux ou avec Mef2 et d'autres protéines E, nous avons

transfecté chacune de ces 3 protéines. L'activité luciférase a été mesurée 24 heures après la transfection (Figure 21).

Cette expérience a été réalisée qu'une fois (en triplicat). Les résultats présentés ici n'ont donc qu'une valeur indicative. L'expression de la Myogénine, MyoD et Mef2 induisent tous une augmentation de l'activité transcriptionnelle du promoteur de *Maged2* dans les C2C12 .

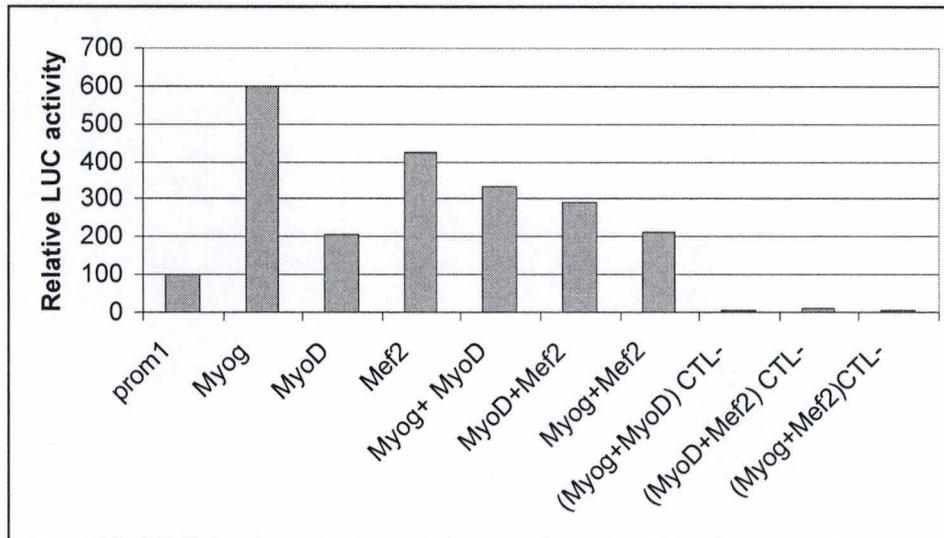


Figure21 : Effet de la surexpression de la Myogénine (Myog), de MyoD, de Mef2 sur l'activité transcriptionnelle de la région promotrice complète de *Maged2* dans des C2C12. L'activité luciférase mesurée a été normalisée par rapport aux valeurs des cellules transfectées avec le promoteur de *Maged2*. Les contrôles négatifs ont été obtenus par la transfection de pGL3 sans promoteur conjointement avec les combinaisons de facteurs myogéniques.

Les C2C12 sont des cellules myogéniques, elles expriment donc, de manière endogène, les facteurs de transcription nécessaires à l'activation des gènes impliqués dans la différenciation myogénique. Cette expression constitutive pourrait donc influencer l'activité de la région promotrice de *Maged2*. Afin d'éviter l'influence des facteurs myogéniques endogènes, ces mêmes expériences, ont été répétées dans des fibroblastes NIH3T3. Cette expérience n'a été réalisée qu'une fois (en triplicat). Les résultats (Figure 22) montrent l'augmentation de l'activité de transcription du promoteur de *Maged2* lors de la surexpression des facteurs de transcription Myogénine, MyoD et Mef2. Ceux-ci ont donc une fonction activatrice sur le promoteur de *Maged2*.

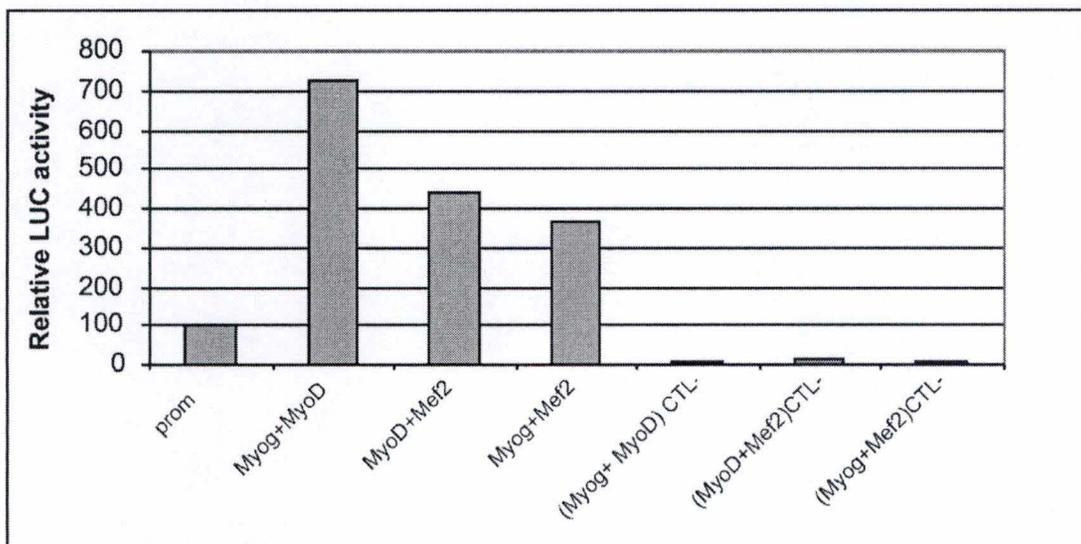


Figure 22 : Effet de la surexpression de la Myogénine (Myog), de MyoD de Mef2 sur l'activité transcriptionnelle de la région promotrice de Maged2 dans des NIH3T3. L'activité luciférase mesurée a été normalisée par rapport aux valeurs des cellules transfectées avec pGL3-promoteur Maged2 complet (prom). Les contrôles négatifs ont été obtenus par la transfection de pGL3 sans promoteur conjointement avec les combinaisons de facteurs myogéniques.

Les résultats obtenus par cotransfection dans les C2C12 et les NIH3T3 démontrent que les facteurs de transcriptions myogéniques testés ont une action activatrice sur le promoteur de *Maged2*.

4. Etude de l'importance des sites des liaisons potentiels d'E47 et YY1 par mutagenèse dirigée.

Pour déterminer si les Ebox et les sites de liaison à l'ADN de E47 (situé en -836pb) et YY1 (situé en -750pb) identifiés par Transfact interviennent dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de *Maged2* lors de la différenciation des myoblastes, nous avons muté certains sites de liaison de ces facteurs. Si les facteurs de transcription dont les sites de liaison ont été invalidés régulent effectivement l'activité du promoteur *Maged2* alors, l'activité luciférase des « promoteurs mutés » devrait augmenter ou diminuer suivant que le facteur est activateur ou répresseur.

Des mutations ponctuelles ont été introduites dans les sites choisis par la méthode de « triple PCR » décrite dans la figure 23. Deux couples d'amorces sont utilisées : a/b* et c*/d. b* et c* portent les mutations ponctuelles souhaitées. Une première PCR est réalisée avec les couples a/b* et une seconde avec les couples c*/d. Les produits de ces deux PCR sont ensuite mélangés et une troisième PCR utilisant le couple d'amorce a/d est réalisée. Dans notre cas, le produit PCR obtenu est cloné dans pGL3-basic.

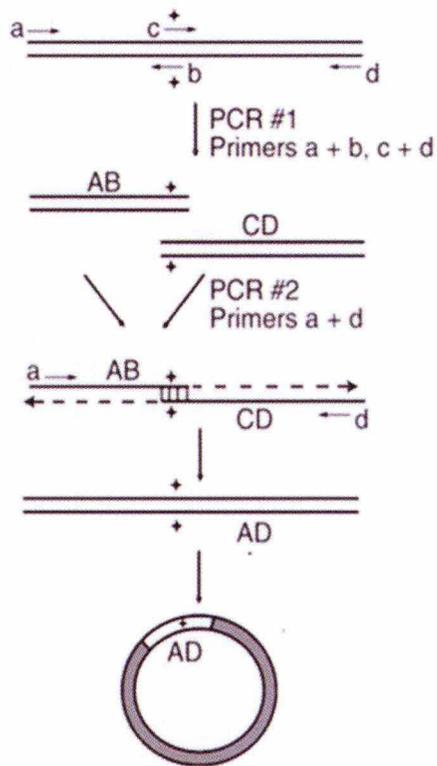


Figure 23 : Représentation schématique de la mutagenèse dirigée par PCR. Les couples d'amorces sont a/b* et c*/d. b* et c* portent les mutations souhaitées. Les 2 premiers produits de PCR sont alors soumis à une troisième PCR avec le couple d'amorce a/d. Le fragment muté ainsi obtenu est alors cloné dans le vecteur pGL3-basic. (Nature protocols 2 924-932)

Des mutagenèses dirigées ont été réalisées sur les sites des facteurs de transcription YY1 et E47 du fragment 2 car celui-ci est le fragment le plus court ayant encore une forte activité de transcription (figure 24). Les sites de liaison à l'ADN de E47 et YY1 ont été choisis car ces sites sont connus pour interagir avec les MRF. Des mutagenèses dirigées ont aussi été réalisées pour le second site E47 et pour le site Ebox du fragment 2 mais les clones n'ont pu être obtenus à temps pour cette étude.

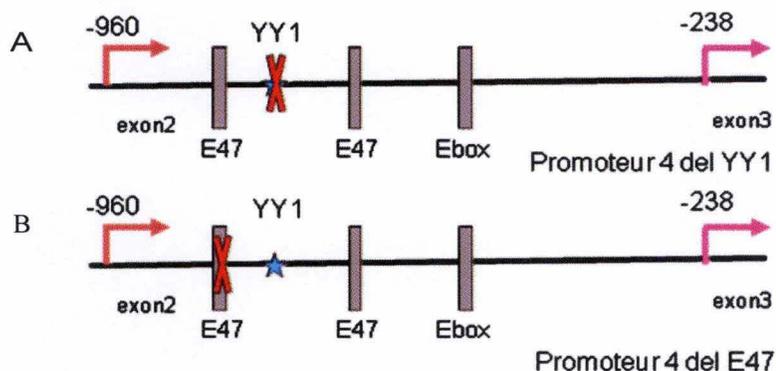


Figure 24 : Représentation schématique de la région promotrice du fragment 2 représentant les 2 promoteurs et leur mutation (croix rouge) sur a : le site de liaison de YY1 et b : le site de liaison de E47.

Les sites de liaison à l'ADN des facteurs de transcription sont des séquences consensus. Les liaisons tolèrent donc certaines variations de séquence. Pour s'assurer de l'invalidation

complète des sites de liaison, les mutagenèses dirigées choisies modifient 2 nucléotides par site de liaison. Les mutations ont été choisies de façon à substituer les nucléotides les mieux conservés. Nous avons muté le motif CCAT du site de liaison de YY1 en CTGT cette séquence consensus n'ayant jamais été observée. De la même façon pour E47 nous avons muté le motif conservé CTGG et CAAG.

Les tests luciférasés ont été réalisés dans des cellules C2C12 de la même façon que précédemment au cours d'une cinétique de 48 heures. L'expérience a été réalisée deux fois en duplicats.

Le mutant du site de liaison de YY1 montre une diminution d'activité transcriptionnelle d'un facteur 1.5x au temps 0 comparativement au fragment 2 non muté. Cette diminution d'activité transcriptionnelle s'accroît pour atteindre un facteur trois 24 heures après le retrait du sérum et un facteur six 48 heures après l'initiation de la différenciation. Ces résultats suggèrent que YY1 lie effectivement ce site et qu'il aurait un rôle activateur de *Maged2* lors de la différenciation des C2C12.

Le mutant du site de liaison 5' du facteur E47 dans le fragment 2, montre une activité transcriptionnelle 3.5 fois supérieure au fragment 2 non muté au temps 0 (Figure 25). Après 24 heures, l'expression du mutant de E47 dans le fragment 2 est comparable à celle du fragment non muté et après 48 heures, l'expression du fragment muté est 5 fois inférieure au fragment non muté. Les résultats suggèrent que le facteur de transcription qui lie le site E47 réprime la transcription de *Maged2* lorsque les C2C12 sont en prolifération et aurait une activité activatrice de la transcription de *Maged2* 48 heures après l'induction de la différenciation myogénique.

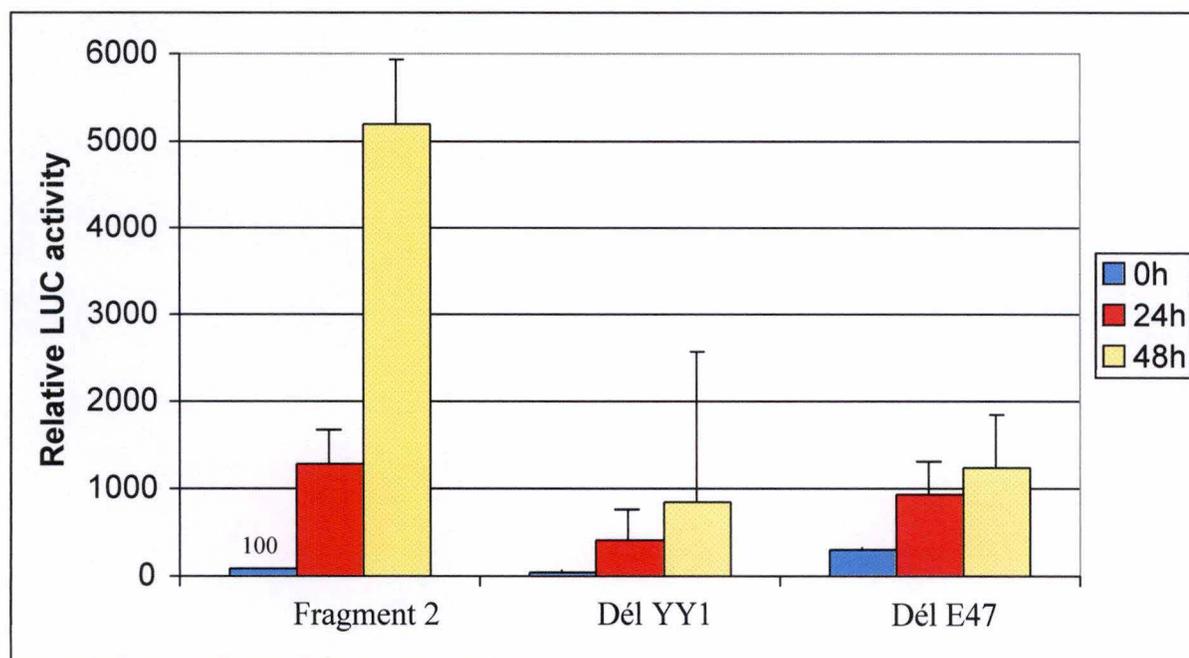


Figure 25 : Activité luciférase relative de la transcription des promoteurs 4 mutés pour YY1 et E47 dans les C2C12 comparé à l'activité du fragment 2 au temps 0 (prolifération des C2C12) ainsi que 24 et 48 heures.

Conclusions et Perspectives

Des études antérieures montrent que les protéines Maged1 et Necdin jouent un rôle important dans la différenciation cellulaire, notamment, dans les cellules musculaires. Necdin protégerait les cellules musculaires squelettiques de l'apoptose et favoriserait leur différenciation (De Ponti *et al.*, 2007). Des observations ont montré que la protéine Maged2 est exprimée *in vivo* dans le muscle ayant subi des dommages, ainsi que dans les myoblastes (C2C12) en différenciation (M. Delimoy, communication personnelle). Au cours de cette étude, nous avons entrepris de caractériser la transcription de *Maged2* au cours de la différenciation des myoblastes murins C2C12. En utilisant une méthode de 5' RACE, nous avons mis en évidence 3 départs possibles de transcription localisés en -1578pb, -960pb et -238pb avant le codon initiateur de la traduction (ATG). L'analyse *in silico* de la région promotrice de *Maged2* montre la présence de sites de liaison de facteurs de transcription impliqués dans la myogenèse et dans la régénération musculaire. Elle a aussi mis en évidence des îlots CpG ainsi que des sites de facteurs de transcription ubiquistes.

Des RT-PCRq réalisées ont montré que l'ARNm de *Maged2* est présent de façon constitutive dans les C2C12 en prolifération et que cet ARNm est induit dans les heures suivant l'induction de la différenciation.

Les tests luciférase montrent une activité transcriptionnelle basale de la région promotrice de *Maged2* mais nous n'observons pas d'activation lors des premières heures suivant l'induction de la différenciation. Une activation est par contre observée 24 heures après le retrait du sérum. Ces résultats suggèrent l'existence d'une première régulation au niveau de la traduction et/ou de la stabilité de la protéine au cours des premières heures de la différenciation. Celle-ci serait suivie d'une régulation d'ordre transcriptionnelle. Pour confirmer nos résultats et exclure la possibilité que l'augmentation d'activité luciférase au cours de la différenciation soit due à l'accumulation de la luciférase dans les cellules plutôt qu'à l'activation du promoteur, il serait utile de réaliser un contrôle supplémentaire en réalisant les tests luciférase avec un plasmide contenant un promoteur non inductible lors de la différenciation myogénique (le promoteur de la timidine kinase par exemple).

La cartographie fonctionnelle du promoteur de *Maged2* montre que les différents fragments de la région promotrice auraient des rôles régulateurs différents. Le fragment compris entre -2662pb et -1657pb aurait un rôle global d'activation de la transcription. Par contre le fragment compris entre -1657pb et -978pb aurait un rôle répresseur au cours de la différenciation myogénique. Le fragment compris entre -978pb et -655pb aurait un rôle d'activateur important en phase de prolifération comme en phase de différenciation des C2C12. Enfin le fragment compris entre -655pb et -68pb semble suffisant à la transcription de *Maged2* en phase proliférative et en phase de différenciation.

La mutation des sites YY1 et E47 dans fragment compris entre -978pb et -68pb a permis de montrer une diminution de l'activité de transcription. Ces sites ont donc un rôle activateur de la transcription dans les C2C12 en différenciation. Par la suite, il serait intéressant d'inactiver l'Ebox en position -397pb afin d'observer l'effet des MRF sur ce site.

Pour confirmer l'existence d'une interaction physique entre les facteurs de transcription myogénique et la séquence promotrice de *Maged2*, il serait intéressant de réaliser une expérience de ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) ou de retard sur gel.

Bibliographie:

- Amthor, H., Christ, B., Weil, M., Patel, K. The importance of timing differentiation during limb muscle development. *Curr Biol.* **21**: 642-52 (1998)
- Anderson, J.E., Wozniak, A.C., Satellite cell activation on fibers: modeling events in vivo--an invited review. *Can J Physiol Pharmacol.* **82**: 300-10 (2004).
- Anderson, J.E. Murray L. Barr Award Lecture. Studies of the dynamics of skeletal muscle regeneration: the mouse came back! *Biochem Cell Biol.* **76**: 13-26 (1998)
- Andrieu, D., Watrin, F., Niinobe, M., Yoshikawa, K., Muscatelli, F., Fernandez, P.A. Expression of the Prader-Willi gene *Necdin* during mouse nervous system development correlates with neuronal differentiation and p75NTR expression. *Gene Expr Patterns* **3**, 761-5 (2003).
- Andrieu, D., Meziane, H., Marly, F., Angelats, C., Fernandez, P.A., Muscatelli, F. Sensory defects in *Necdin* deficient mice result from a loss of sensory neurons correlated within an increase of developmental programmed cell death *BMC Dev Biol.* **20**: 56 (2006)
- Atanackovic, D., Arfsten, J., Cao, Y., Gnjatic, S., Schnieders, F., Bartels, K., Schilling, G., Faltz, C., Wolschke, C., Dierlamm, J., Ritter, G., Eiermann, T., Hossfeld, D.K., Zander, A.R., Jungbluth, A.A., Old, L.J., Bokemeyer, C., Kröger, N. Cancer-testis antigens are commonly expressed in multiple myeloma and induce systemic immunity following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* **109**: 1103-12 (2007)
- Bertrand, M.J., Kenchappa, R.S., Andrieu, D., Leclercq-Smekens, M., Nguyen, H.N., Carter, B.D., Muscatelli, F., Barker, P.A., De Backer, O. NRAGE, a p75NTR adaptor protein, is required for developmental apoptosis in vivo. *Cell Death Differ.* **15**: 1921-9 (2008).
- Bertrand M, Huijbers I, Chomez P, De Backer O. Comparative expression analysis of the MAGED genes during embryogenesis and brain development. *Dev Dyn.* **230**:325-34 (2004)
- Bischoff, R., Heintz, C. Enhancement of skeletal muscle regeneration. *Dev Dyn.* **201**: 41-54 (1994)
- Borycki, A.G., Brunk, B., Tajbakhsh, S., Buckingham, M., Chiang, C., Emerson, C.P. Jr. Sonic hedgehog controls epaxial muscle determination through *Myf5* activation. *Development.* **126**: 4053-63 (1999)
- Bren-Mattison, Y., Olwin, B.B. Sonic hedgehog inhibits the terminal differentiation of limb myoblasts committed to the slow muscle lineage. *Dev Biol.* **15**: 130-48 (2002)
- Bush, J.R., Wevrick, R. The Prader-Willi syndrome protein *necdin* interacts with the E1A-like inhibitor of differentiation EID-1 and promotes myoblast differentiation. *Differentiation* **76**: 994-1005 (2008)
- Chen, A.E., Ginty, D.D., Fan, C.M. Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature.* **20**: 317-22. (2005)

- Chomez, P., De Backer, O., Bertrand, M., De Plaen, E., Boon, T., Lucas, S. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res.* **61**: 5544-51 (2001)
- Chomez, P., Williams, R., De Backer, O., Boon, T. and Vennstrom, B. The SMAGE gene family is expressed in post-meiotic spermatids during mouse germ cell differentiation. *Immunogenetics* **43**: 97-100 (1996)
- Christ, B., Ordahl, C.P. Early stages of chick somite development. *Anat Embryol (Berl)*. **191**: 381-96 (1995)
- 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**, 696-9 (2000).
- Cornelison, D.D., Olwin, B.B., Rudnicki, M.A., Wold, B.J. MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. *Dev Biol.* **15**: 122-37 (2000)
- De Smet, C. et al. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7149-53 (1996).
- Deponti, D., François, S., Baesso, S., Sciorati, C., Innocenzi, A., Broccoli, V., Muscatelli, F., Meneveri, R., Clementi, E., Cossu, G., Brunelli, S. Necdin mediates skeletal muscle regeneration by promoting myoblast survival and differentiation. *J Cell Biol.* **22**: 305-19 (2007)
- Florini, J.R., Ewton, D.Z., Roof, S.L. Insulin-like growth factor-I stimulates terminal myogenic differentiation by induction of myogenin gene expression. *Mol Endocrinol.* **5**: 718-24 (1991)
- Gu, W., Roeder, R.G. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell.* **22**: 595-606 (1997).
- Hasegawa, K., Yoshikawa, K. Necdin regulates p53 acetylation via Sirtuin1 to modulate DNA damage response in cortical neurons. *J Neurosci.* **27,28**: 8772-84 (2008).
- Hoffman EP, Fischbeck KH, Brown RH, Johnson M, Medori R, Loike JD, Harris JB, Waterston R, Brooke M, Specht L, et al. Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med.* **318**(21):1363-8 (1988)
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ervasti, J. M., Leveille, C. J., Slaughter, C. A., Sernett, S. W., and Campbell, K. P. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* **355**: 696-702 (1992)
- Holterman, C.E., Rudnicki, M.A. Molecular regulation of satellite cell function. *Semin Cell Dev Biol.* **16**: 575-84 (2005)
- Jay, P., Rougeulle, C., Massacrier, A., Moncla, A., Mattei, M.G., Malzac, P., Roëckel, N., Taviaux, S., Lefranc, J.L., Cau, P., Berta, P., Lalonde, M., Muscatelli, F. The human necdin gene, NDN, is maternally imprinted and located in the Prader-Willi syndrome chromosomal region. *Nat Genet.* **17**:357-61 (1997)
- Kendall, S.E., Battelli, C., Irwin, S., Mitchell, J.G., Glackin, C.A., Verdi, J.M. NRAGE mediates

- p38 activation and neural progenitor apoptosis via the bone morphogenetic protein signaling cascade. *Mol Cell Biol.* **25**: 7711-24 (2005).
- Kidd M, Modlin IM, Mane SM, Camp RL, Eick G, Latich I. The role of genetic markers--NAP1L1, MAGE-D2, and MTA1--in defining small-intestinal carcinoid neoplasia. *Ann Surg Oncol.* **13**(2):253-62 (2006)
- Kuwajima T, Taniura H, Nishimura I, Yoshikawa K. Necdin interacts with the Msx2 homeodomain protein via MAGE-D1 to promote myogenic differentiation of C2C12 cells. *J Biol Chem.* **279**:40484-93 (2004)
- Kuwako, K., Hosokawa, A., Nishimura, I., Uetsuki, T., Yamada, M., Nada, S., Okada, M., Yoshikawa, K. Disruption of the paternal necdin gene diminishes TrkA signaling for sensory neuron survival *J Neurosci.* **25**: 7090-9 (2005)
- Lemon, B., Tjian, R. Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev.* **15**: 2551-69 (2000)
- Lucas, S., Brasseur, F. & Boon, T. A new MAGE gene with ubiquitous expression does not code for known MAGE antigens recognized by T cells. *Cancer Res* **59**, 4100-3 (1999).
- MacDonald, H.R., Wevrick, R. The necdin gene is deleted in Prader-Willi syndrome and is imprinted in human and mouse *Hum Mol Genet.* **6**:1873-8 (1997)
- Mastrangelo, I.A., Courey, A.J., Wall, J.S., Jackson, S.P., Hough, P.V. DNA looping and Sp1 multimer links: a mechanism for transcriptional synergism and enhancement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1**: 5670-4 (1991).
- Masuda, Y., A. Sasaki, H. Shibuya, N. Ueno, K. Ikeda, and K. Watanabe. Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptional function. *J Biol Chem* **276**:5331-8 (2001)
- Mauro, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* **9**: 493-5 (1961).
- Modlin IM, Kidd M, Latich I, Zikusoka MN, Eick GN, Mane SM, Camp RL. Genetic differentiation of appendiceal tumor malignancy: a guide for the perplexed. *Ann Surg.* **244**(1):52-60 (2006)
- Merly, F., Lescaudron, L., Rouaud, T., Crossin, F., Gardahaut, M.F. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve.* **22**: 724-32 (1999)
- 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**, 3101-10 (2000).
- Olson, E.N. Proto-oncogenes in the regulatory circuit for myogenesis *Semin Cell Biol.* **3**:127-36 (1992).
- Papageorgio, C., Brachmann, R., Zeng, J., Culverhouse, R., Zhang, W., McLeod, H. MAGED2: a novel p53-dissociator. *Int J Oncol.* **31**: 1205-11 (2007)
- Roder, K., Wolf, S.S., Larkin, K.J., Schweizer, M. Interaction between the two ubiquitously

expressed transcription factors NF-Y and Sp1. *Gene*. **234**: 61-9 (1999).

Rojo-Niersbach, E., Furukawa, T., Tanese, N. Genetic dissection of hTAF(II)130 defines a hydrophobic surface required for interaction with glutamine-rich activators. *J Biol Chem*. **19**: 33778-84 (1999)

Rötzschke, O., Falk, K., Deres, K., Schild, H., Norda, M., Metzger, J., Jung, G., Rammensee, HG. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature* **348** :195-7(1990)

Salehi AH, Xanthoudakis S, Barker PA. NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway. *J Biol Chem*. **277**:48043-50. (2002)

Seale, P., Sabourin, L.A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., Rudnicki, M.A. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*. **15**: 777-86 (2000)

Salehi, A.H., Roux, P.P., Kubu, C.J., Zeindler, C., Bhakar, A., Tannis, L.L., Verdi, J.M. and Barker P.A. NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron* **27**:279-288 (2000)

Sasaki, A., Y. Masuda, K. Iwai, K. Ikeda, and K. Watanabe. 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**:22541-6 (2002)

Suzuki, A., Yoshida, M., Hayashi, K., Mizuno, Y., Hagiwara, Y. and Ozawa, E. Molecular organization at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin. Three dystrophin-associated proteins bind directly to the carboxy-terminal portion of dystrophin. *Eur. J. Biochem*. **220** : 283-292 (1994)

Taniura, H., Matsumoto, K. & Yoshikawa, K. Physical and functional interactions of neuronal growth suppressor necdin with p53. *J Biol Chem* **274**, 16242-8 (1999).

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**, 720-8 (1998).

Torigoe, T., Izumi, H., Yoshida, Y., Ishiguchi, H., Okamoto, T., Itoh, H., Kohno, K. Low pH enhances Sp1 DNA binding activity and interaction with TBP *Nucleic Acids Res*. **1**: 4523-30 (2003)

Uetsuki, T., Takagi, K., Sugiura, H. & Yoshikawa, K. Structure and expression of the mouse necdin gene. Identification of a postmitotic neuron-restrictive core promoter. *J Biol Chem* **271**, 918-24 (1996).

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**, 1643-7 (1991).

Velloso, C.P. Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I *Br J Pharmacol*. **154**:

557-68 (2008)

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 Lett.* **23**: 171-6 (2004)

Williams, M. E., P. Strickland, K. Watanabe, and L. Hinck. UNC5H1 induces apoptosis via its juxtamembrane region through an interaction with NRAGE. *J Biol Chem* **278**:17483-90 (2003)

Wischnewski, F., Friese, O., Pantel, K., Schwarzenbach, H. Methyl-CpG binding domain proteins and their involvement in the regulation of the MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, and MAGE-A12 gene promoters. *Mol Cancer Res.* **5**:749-59 (2007)

Zanella, S., Barthelemy, M., Muscatelli, F., Hilaire, G. Necdin gene, respiratory disturbances and Prader-Willi syndrome. *Adv Exp Med Biol.* **605**:159-64 (2008)