

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Construction de vecteurs de criblage (knock-in) destinés à créer des souris transgéniques exprimant de façon inductible des protéines MAGE de type I

Hardij, Julie

Award date:
2010

Awarding institution:
Universite de Namur

[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

Construction de vecteurs de criblage (knock-in) destinés à créer des souris transgéniques exprimant de façon inductible des protéines *MAGE* de type I

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Julie HARDIJ

Janvier 2010

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32[1]81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Construction de vecteurs de criblage (knock-in) destinés à créer des souris transgéniques exprimant de façon inductible des protéines MAGE de type I

HARDIJ Julie

Résumé

Les gènes MAGE de type I sont exprimés exclusivement dans les cellules de la lignée germinale et dans le placenta. Dans de nombreuses tumeurs, ces gènes sont exprimés de façon ectopique, probablement à cause de modifications épigénétiques, en particulier, la déméthylation du promoteur de ces gènes. L'expression des MAGE de type I par les cellules cancéreuses pourrait n'être qu'un épiphénomène sans conséquences pour la cellule cancéreuse ou le développement de la tumeur. Toutefois, on peut aussi imaginer, et c'est l'hypothèse de ce projet, que l'expression des MAGE de type I par les cellules cancéreuses leur procure un avantage qui est sélectionné au cours du développement de la tumeur (prolifération, résistance à l'apoptose, capacités invasives, néoangiogenèse, résistance aux drogues de chimiothérapie...). Certaines données publiées sont en faveur de cette hypothèse. Ainsi, MAGEA2 interagirait avec la protéine suppresseur de tumeur p53 et inhiberait son activité. Une manière puissante de tester l'activité « oncogène » d'une protéine est de provoquer son expression ectopique ou sa surexpression dans un animal transgénique. Au cours de ce travail, nous avons construit des transgènes permettant une expression inductible de la protéine humaine MAGEA1 après recombinaison homologue (knock-in) dans le locus ROSA26. Dans le transgène, une cassette « STOP » constituée du gène Neo^r flanquée de sites lox est insérée entre le promoteur ROSA26 et la partie codante de MAGEA1. Cette cassette empêche l'expression de MAGEA1 tant qu'elle n'a pas été excisée par la recombinaison Cre. Comme il est possible que MAGEA1 ne fonctionne pas dans un contexte cellulaire murin, nous projetons de réaliser à l'avenir des transgènes semblables pour les gènes murins de type I Magea2 et Mageb1. Comme il n'existe pas d'anticorps permettant de suivre l'expression de ces protéines, nous avons imaginé de développer un système qui permette l'ajout facultatif d'une étiquette (tag) HA du côté N-ter des protéines transgéniques. Ce système implique un exon supplémentaire qui spécifie l'étiquette et qui peut être délété par le recombinaison site-spécifique Flp. Pour tester ce système, nous avons construit un transgène MAGEA1 pourvu de cette étiquette amovible. Nous pourrions tester son fonctionnement dans des cellules ES grâce à des anticorps anti-HA et anti-MAGEA1.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2010

Promoteur: O. De Backer

Les remerciements officiels

Je remercie le Pr. Olivier De Backer, promoteur de ce mémoire, pour ses conseils et son temps passé à vider son bic rouge dans les corrections. Et surtout pour sa disponibilité.

Je remercie Aurélie Depauw, ma doctorante pour m'avoir suivie durant la plus grande partie de ce mémoire et surtout pour les corrections laborieuses que je lui ai imposées. Merci pour ta patience et les intérêts communs extra-labo que nous avons partagés.

Un tout grand merci à Christiane pour avoir pris le relais de mon suivi. Ton expérience est très précieuse, tu m'as appris beaucoup. Merci pour ta rigueur, j'espère qu'elle aura un peu déteint sur moi.

Merci à Edgar pour ses sages conseils, Coco pour sa complicité, Carlos pour son humour, Domi pour plein de petites choses (dont la recette des moelleux), Thuan pour ses idées judicieuses et Marie pour ses explications.

Merci aux membres de mon jury C. Michiels, F. Minner, G. Rommelaere, et A. Sermeus qui ont accepté de lire mon manuscrit.

Les remerciements officieux

Merci à mes parents de m'avoir permis d'entreprendre des études universitaires, à leur confiance durant ces semaines où ils ne savaient pas ce que je faisais à Namur. Merci d'avoir supporté les petits tracassés chaque weekend et d'avoir partagé mes stress de blocus et d'examen, ouf c'est terminé ! Et enfin, merci d'avoir toujours pensé à me fournir en ingrédients de ma recette fétiche.

Merci à ma sœur Elodie d'avoir fait semblant de comprendre tout ce que je baraguinais mais surtout de poser d'excellentes questions pendant mes récitations.

Merci à mon François de m'avoir tant donné ces 3 dernières années. Ton avis m'est très précieux et s'est souvent révélé juste. Merci pour ton réconfort durant les moments de colère et de doute mais surtout pour ta complicité dans les bons moments.

Je remercie particulièrement Ben et Caro, mes amis, pour leur soutien durant les moments de panique et de découragement mais surtout pour les bons moments passés ensemble.

Merci à tous les mémorants de M2 2009 pour avoir partagé le stress et les anecdotes que l'expérience de mémoire nous a apportés.

Et enfin merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de ce mémoire (Merci Picou, ouf EndNote fonctionne enfin !)

Je ne pouvais écrire ces remerciements de mémoire sans évoquer l'élément qui m'a si souvent permis de me vider la tête, au grand plaisir de mon entourage :

- 250g de farine
- 2 pincées de sel
- 2 sachets de sucre vanillé
- 2 œufs
- 1 tasse de lait (150ml)
- 1 tasse d'eau



Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Ap ^r ou Amp ^R	Résistant à l'ampicilline
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adenosine Tri-Phosphate
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
Bp	Base pair
BrEt	Bromure d'Ethidium
CIAA	Chloroform isoamylalcohol
CIP	Phosphatase alcaline intestinale de veau
Cm	Chloramphénicol
CTA	Cancer testis antigen
CTL	Lymphocytes T cytolytiques
dATP	Déoxyadénosine triphosphate
dCTP	Déoxycytosine triphosphate
dGTP	Déoxyguanosine triphosphate
dNTP	Déoxynucléotide triphosphate
dTTP	Déoxythymidine triphosphate
EDTA	Ethylenedinitrotetraacetic acid
Cellule ES	Cellule souche embryonnaire (embryonic stem cell)
Dlxin	Dlx interacting protein
DO	Densité optique
DMEM	Dulbecco's modified eagle media
DMSO	Diméthylsulfoxyde
ECMV	encephalomyocarditis virus
E. coli	Escherichia coli
EDTA	acide éthylène diamine tetra acétique
F	Faraday
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal Calf serum (sérum de veau foetal)
Flp	Flippase
FRT	Flippase recognition Target
G418	Généticine
GMEM	Glasgow Modified Eagle Medium
GW	Gateway
HA	Human influenza hemagglutinin
HAT	Histone acétyl transférase
HDAC	Histone déacétylase
HIF	Hypoxia-inducible factors
HLA	Human leukocyte antigen
IL-2	Interleukin 2
IRES	internal ribosome entry site
JNK	c-jun N-terminal kinase
KAc	Acétate de potassium
Kb	Kilo base
kD	Kilo Dalton
KO	Knock out
KRAB	Krueppel-associated box
LB	Luria Bertani

LBA	LB + ampicilline
LIF	Leukemia Inhibitor Factor
LoxP	Locus of X-over of P1
MAGE	Protéine MAGE humaine
<i>MAGE</i>	Gène MAGE humain
<i>Mage</i>	Gène Mage murin
Mage	Protéine Mage murine
MCS	Site multiple de clonage
MEC	Matrice Estra Cellulaire
MEF	Mouse embryonic fibroblast
min	minute
MHC-I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
MHD	Mage homology domain
MMC	Mytomicine C
MMP-2	Matrix metalloproteinases
msec	milliseconde
NaCl	Chlorure de sodium
NaOH	Hydroxyde de sodium
Ndn	Necdin
Neo ^r	Résistance à la neomycine
NGF	Nerve Growth Factor
NNT-1	Novel Neurotrophin-1
NRAGE	Neurotrophin receptor-interacting mage homolog
NT	Neurotrophine
NTR	N-terminal repeat
O/N	Over night
p75 ^{NTR}	p75 neurotrophin receptor
pA	Signal de polyadénylation
PAP	poly A polymérase
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHD	HIF prolyl hydroxylases
Pgk	Phosphoglucokinase
PM	Poids moléculaire
PTB	pyrimidine tract-binding
PWS	Syndrôme de Prader-Willi
RBCC	Ring B box coiled coil
rpm	Rotation par minute
SDS	Sodium lauryl sulfate ou sodium dodecyl sulfate
SKIP	Ski interacting Protein
Spect	Spectinomycine
TAE	Tris acétate EDTA
TE	Tris EDTA
tetO	Opérateur tetracycline
Tm	Température de melting
TVP	Trypsine –EDTA pour cellules souche
V	Volt
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

Table des matières

Introduction	11
A. Les gènes <i>MAGE</i>	11
1. Découverte du premier gène <i>MAGE</i> par l'équipe du professeur T.Boon	11
2. La famille des gènes <i>MAGE</i>	13
2.1. Caractéristiques: les gènes <i>MAGE</i> ont un domaine d'homologie en commun et sont classés en 2 « types » et 12 sous-familles.....	13
2.2. Structure et localisation chromosomique : les gènes <i>MAGE</i> sont répartis sur 3 chromosomes et la plupart sont constitués d'un exon codant.	13
2.3. Les gènes <i>MAGE</i> de type I (ou cancer testis antigen genes, CTA).....	13
2.3.1. Les <i>MAGE</i> de type I regroupent 3 sous-familles. Ils sont exprimés exclusivement dans les tumeurs, les testicules et le placenta.....	13
2.3.2. L'expression des gènes <i>MAGE</i> de type I : leurs protéines sont dégradées en peptides antigéniques.....	15
2.3.3. La sous famille <i>MAGEA</i>	15
2.3.3.1. Caractéristiques des gènes <i>MAGEA</i>	15
2.3.3.2. Fonction des protéines <i>MAGEA</i>	15
▪ <i>MAGEA1</i> interagit avec l'adaptateur <i>SKIP</i> et recrute <i>HDAC1</i>	17
▪ L'impact de l'interaction de <i>MAGEA2</i> avec les histones déacétyl-transférases sur la fonction de transactivation de <i>p53</i>	17
▪ Les protéines <i>MAGEA</i> interagissent avec le répresseur <i>KAP-1</i>	17
▪ <i>MAGEA11</i> interagit avec les <i>HIF</i> prolyl hydroxylases	19
2.3.4. La sous- famille des <i>MAGEB</i>	20
2.4. Les gènes <i>MAGE</i> de type II.....	20
2.4.1. Caractéristiques : les gènes <i>MAGE</i> de type II sont exprimés dans différents tissus somatiques adultes et embryonnaires.....	20
2.4.2. <i>MAGED1</i> et ses interactants	20
2.4.3. <i>Necdin</i>	24
B. Transgénèse dans la souris	24
1. Transgénèse d'addition	26
2. Transgénèse par recombinaison homologue	26
3. Le locus <i>Rosa26</i>	26
C. Les systèmes d'expression inductible	26
1. Les systèmes inductibles par la tétracycline	26
1.1. Le système Tet-Off.....	28
1.2. Le système Tet-ON	28
2. Le système Cre-Lox	28
D. Systèmes moléculaires permettant de confectionner un transgène <i>MAGEA1</i> inductible et pourvu d'une étiquette amovible.....	28
1. Le système de recombinaison FRT/FLP	30
2. Les séquences IRES (Internal Ribosome Entry Sites), signaux de reconnaissance pour le ribosome.....	30
L'IRES permet de débiter la traduction même dans des circonstances empêchant normalement la traduction, telles que durant la méiose, l'apoptose ou des conditions d'hypoxie. Certains gènes transcrits en cas de stress comportent des séquences IRES...	32
3. L'épissage de l'ARN.....	32
4. Le système de recombinaison Gateway	34

5. Le signal d'arrêt de la transcription ou signal de polyadénylation	34
Objectif du mémoire.....	36
Matériel et méthodes	38
A. ADN et plasmides	38
1. ADN	38
2. Les plasmides	38
B. Les oligonucléotides.....	39
C. Milieux de culture	39
D. Tampons et solutions.....	40
E. Techniques relatives à la manipulation d'ADN	41
1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	41
2. Migration sur gel d'électrophorèse	42
3. Restriction d'ADN	42
4. Déphosphorylation d'extrémités de plasmide clivé	42
5. Remplissage des extrémités 5' protrudantes avec la Klenow DNA polymérase	43
6. Rognage des extrémités 3' protrudantes avec la T4DNA Polymerase	43
7. Ligation d'un insert et d'un plasmide linéarisé.....	43
8. Purification d'ADN après migration sur gel, WIZARD®	43
9. Transformation de bactérie par électroporation d'ADN	44
10. Recombinaison Gateway.....	44
11. Culture de bactéries	45
12. Isolation d'ADN plasmidique par lyse alcaline	45
F. Techniques relatives à la manipulation de bactéries	45
1. Préparation de bactéries électrocompétentes.....	45
2. Activation de l'expression de la recombinase Cre	46
3. Activation de l'expression de la Flippase	46
G. Techniques relatives à la manipulation de cellules	46
1. Culture de cellules souches embryonnaires	46
2. Transformation de cellules par choc électrique.....	47
3. Sélection sur milieu contenant de la généticine	47
4. Repiquage des colonies sélectionnées.....	47
5. Congélation des cellules.....	48
6. Purification d'ADN génomique	48
7. Western blot	48
Résultats	52
A. Stratégie élaborée dans le but d'obtenir des souris exprimant MAGEA1 de manière conditionnelle.....	52
B. Résultats	55
1. Obtention d'une séquence comportant les sites FRT et la séquence HA.....	55
2. Insertion de la séquence IRES en aval du premier site FRT	57
3. Insertion des gènes MAGE derrière l'intron contenant le second site FRT.....	57
3.1. Introduction de MAGEA1 non étiqueté dans pCR8	61
3.2. Introduction de la construction FRT-IRES-HA-MAGEA1 dans pCR8.....	61
4. Introduction des cassettes FRT-IRES-HA-MAGE et MAGEA1 native dans pROSA26DEST	61
5. Vérification de l'intégrité de la cassette STOP	65
6. Vérification de la fonctionnalité des systèmes de recombinaison Cre/Lox en bactéries.....	65
6.1. Test de recombinaison Cre/loxP du vecteur pRosa26DEST-A1	69
6.2. Test de recombinaison Cre/loxP du clone pRosa26DEST-FRT-IRES-HA-A169	

6.3.	Test de recombinaison FRT/FLP du vecteur pRosa26dest-FRT-IRES-HA-A1	
	69	
7.	Obtention de cellules ES exprimant MAGEA1 de manière conditionnelle.....	69
7.1.	Electroporation, sélection et criblage des cellules ES.....	69
7.2.	Screening Criblage des clones de cellules ES par PCR.....	69
7.2.1.	Extraction d'ADN.....	69
7.2.2.	Vérification que les ADN sont amplifiables.....	73
7.2.3.	Vérification que l'amorce GenRosa3' permet une amplification PCR....	73
7.3.	Test de fonctionnalité de la séquence de polyadénylation STOP.....	73
7.4.	Test de l'induction de l'expression du gène MAGEA1 dans les cellules ES ..	73
	Discussion.....	75
	Perspectives.....	78
	Bibliographie.....	86



Introduction

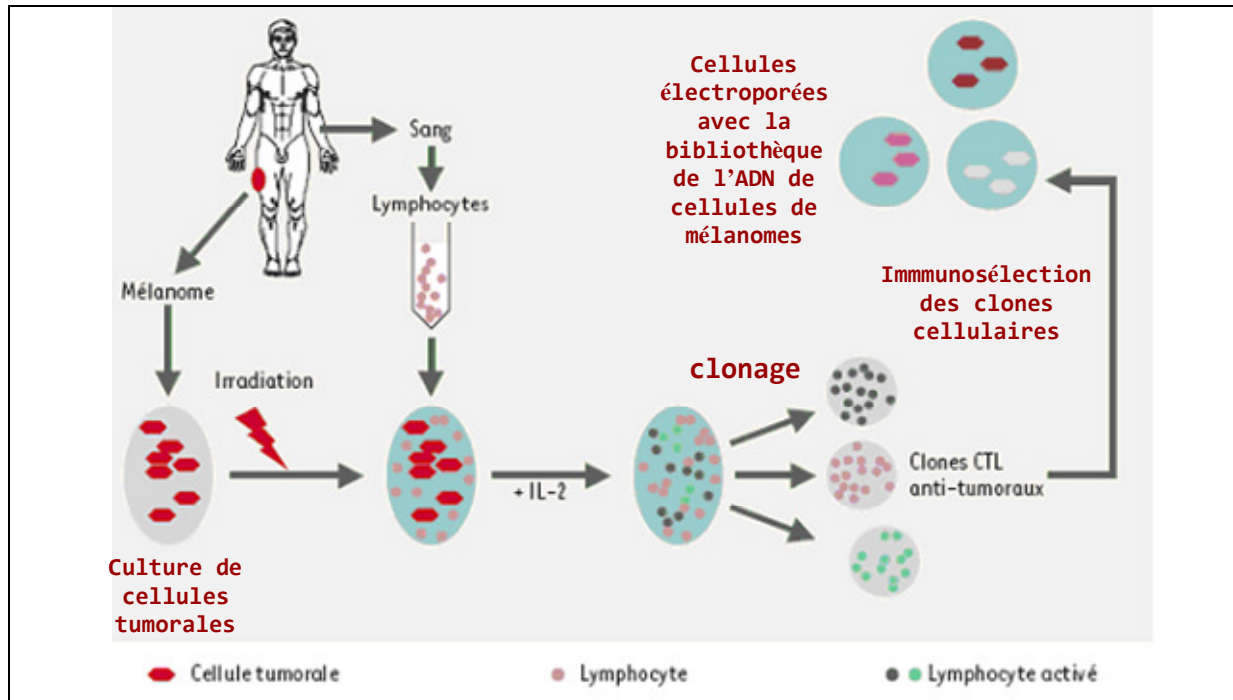


Figure 1 : Méthode d'identification des antigènes tumoraux. La première étape de la méthode consiste à cultiver des cellules tumorales avec des lymphocytes du même patient. Les lymphocytes dirigés contre les antigènes vont proliférer et lyser les cellules portant l'antigène cible. Des cellules vont échapper à la reconnaissance en exprimant d'autres antigènes, ce sont des cellules qui ont perdu l'antigène, on les appelle des variants de perte. Une bibliothèque de l'ADN de cellules tumorales est constituée et introduite dans des variants de perte de l'antigène d'intérêt. Les cellules sont mises en cultures avec les lymphocytes dirigés contre cet antigène tumoral. Les cellules qui sont lysées par une population de lymphocytes sont celles qui réexpriment l'antigène spécifiquement reconnu. Il ne reste plus qu'à identifier le gène codant pour le peptide.

Introduction

A. Les gènes *MAGE*

Depuis 1957, on sait que certaines cellules cancéreuses expriment des antigènes à leur surface. En 1991, l'équipe du professeur T. Boon de l'Institut Ludwig de Bruxelles identifia le premier gène spécifiant un antigène spécifique de tumeurs humaines : le gène *MAGEA1* (pour Melanoma Antigen Genes) [1].

1. Découverte du premier gène *MAGE* par l'équipe du professeur T.Boon

On sait que certaines tumeurs sont capables de provoquer une réaction de rejet par le système immunitaire. L'équipe du professeur Thierry Boon s'intéressa en 1991 à ces antigènes de cancer en vue d'un traitement immunothérapeutique du cancer. La méthode par laquelle cette équipe est parvenue à identifier le premier gène codant pour une protéine spécifique des tumeurs est basée sur la reconnaissance spécifique par les CTLs (lymphocytes T cytolytiques) (Figure 1). Les lymphocytes T cytolytiques matures reconnaissent leur antigène cible à la surface des cellules et lysent la cellule cible. La stratégie de T. Boon a été d'obtenir des clones de lymphocytes dirigés contre un antigène tumoral déterminé, de les cultiver pour identifier le gène spécifiant cet antigène. Des lymphocytes T du sang d'un patient ont été mis en culture avec des cellules de mélanome de ce patient. Les cellules tumorales présentant l'antigène étaient lysées par les lymphocytes T. Cependant, certaines cellules échappent à la reconnaissance et prolifèrent. Il s'agit d'un phénomène d'immuno-sélection qui concerne des clones de cellules qui ont perdu l'antigène reconnu par les lymphocytes. On appelle ces cellules, des variants de perte d'antigène. Ce phénomène a démontré l'existence de plusieurs antigènes à la surface des cellules de mélanome. En effet, ces variants étaient reconnus par d'autres lymphocytes T. Pour identifier un antigène exprimé à la surface des cellules cancéreuses, une bibliothèque génomique contenant l'ADN des cellules de la lignée du mélanome a été confectionnée. Après avoir introduit cette bibliothèque dans un variant de perte pour cet antigène, les cellules transformées ont été mises en culture en présence de lymphocytes qui reconnaissent l'antigène. Si les cellules transfectées ont incorporé le gène spécifiant l'antigène, elles expriment cet antigène et peuvent à nouveau être reconnues par le lymphocyte et stimuler la prolifération de celui-ci. C'est de cette manière qu'a été identifié *MAGEA1* (Melanoma AntiGEN1) Ce gène ne présente aucune homologie avec les séquences contenues dans les banques de données.

Après la découverte du premier gène *MAGE*, des expériences d'hybridation de bibliothèques génomiques ont permis d'établir que *MAGEA1* appartient à une grande famille de gènes. Grâce au séquençage des génomes murins et humains, 55 gènes *MAGE* humains et une trentaine de gènes *Mage* murins ont été identifiés [1-4]. Par l'étude de leur structure génomique il semblerait que les gènes *MAGE* qui dérivent d'un gène *MAGED* ancestral qui aurait subi des rétro-transpositions et des duplications successives.

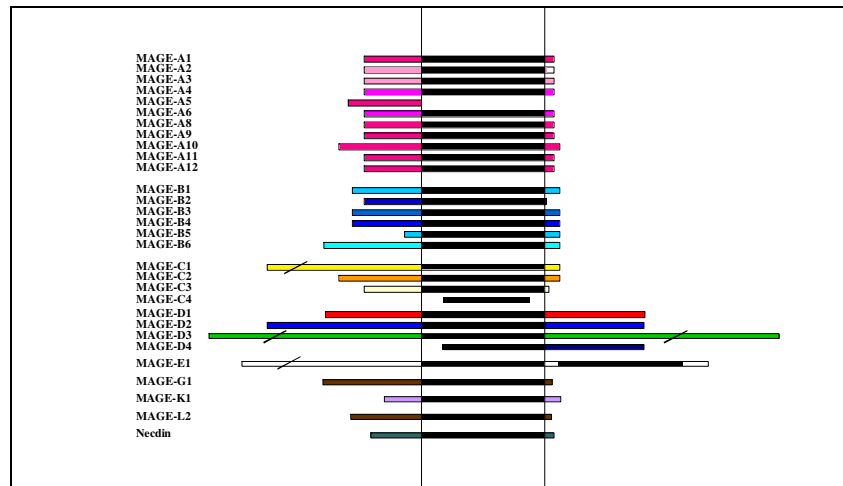


Figure 2 : Le domaine d'homologie des gènes *MAGE*. Le MHD, ou MAGE Homology Domain est une suite de 200 acides aminés qui est commune à tous les gènes *MAGE*. Sa structure ne correspond à rien de connu, sa fonction reste inconnue[1].

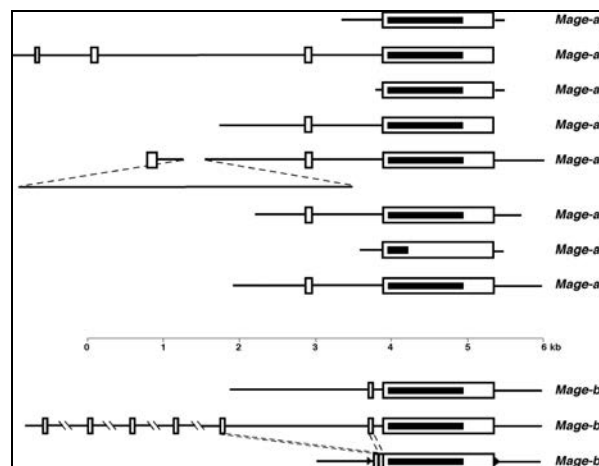


Figure 3 : Structure des gènes *MageA* et *B* murins. Les rectangles représentent les exons et les traits noirs représentent les séquences codantes. Les gènes *MageA* et *MageB* sont constitués de 3 exons. La séquence codante n'est contenue que dans le dernier exon.

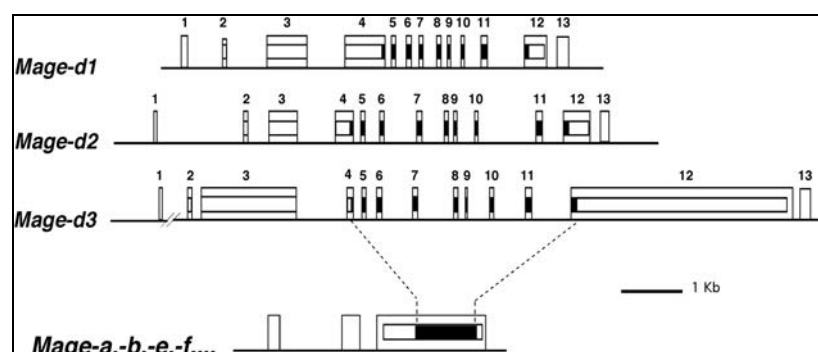


Figure 4 : Structure des gènes *MAGED*. Les rectangles représentent les exons et les traits noirs représentent les séquences codantes. Les gènes *MAGED* sont composés de 13 exons dont seuls 11 sont codants.

2. La famille des gènes *MAGE*

- 2.1. Caractéristiques: les gènes *MAGE* ont un domaine d'homologie en commun et sont classés en 2 « types » et 12 sous-familles

Toutes les protéines *MAGE* partagent un domaine d'homologie composé d'environ 200 acides aminés appelé le « Mage Homology Domain » (MHD) (figure 2). Cette séquence d'homologie se trouve du côté carboxy-terminal dans la plupart des protéines *MAGE*[5]. Dans les protéines *MAGED*, il est localisé plus centralement. Cette séquence ne ressemble à aucun domaine connu pouvant donner une piste sur la fonction des protéines *MAGE*.

Il existe plusieurs classifications des gènes *MAGE*. En se basant sur leur similarité de séquence et leur localisation chromosomique, les gènes *MAGE* sont répartis en sous-familles : de *MAGEA* à *MAGEL*. D'autre part, en fonction de leur profil d'expression, on classe les gènes *MAGE* en deux grands types : I et II. Les gènes *MAGE* de type I (sous-famille A, B et C) sont exprimés dans une portion significative de tumeurs (mélanomes, carcinomes, cancer du poumon, du sein, vessie, estomac...), mais pas dans les tissus normaux excepté dans les cellules de la lignée germinale mâles et, pour certains gènes *MAGE*, dans le placenta. Les gènes *MAGE* de type I constituent une cible idéale pour l'immunothérapie anti-tumorale, qui vise à stimuler la réponse immunitaire des patients contre les cellules cancéreuses.

Les gènes *MAGE* de type II s'expriment dans différents tissus adultes normaux somatiques adultes et embryonnaires.

- 2.2. Structure et localisation chromosomique : les gènes *MAGE* sont répartis sur 3 chromosomes et la plupart sont constitués d'un exon codant.

Les gènes *MAGE* ont été identifiés pour la première fois chez l'homme et ils sont également présents chez plusieurs vertébrés. Parmi ceux-ci, le zebrafish, le poulet ou encore le xénope. Chez ces animaux, il n'y a qu'un seul gène *MAGE*. Celui-ci est constitué de 13 exons dont 11 sont codants. Chez les mammifères, il existe 3 ou 4 gènes semblables constitués de 13 exons, ce sont les gènes *MAGED* qui sont des gènes de type II. En plus de ceux-ci une quarantaine de gènes *MAGE* sont présents dans le génome humain. Tous ces autres gènes ne sont constitués que d'un seul exon codant (Figures 3 et 4)[6]. Ces observations suggèrent que les gènes *MAGE* à un exon codant sont des rétrogènes.

Les gènes *MAGE* humains se distribuent sur 3 chromosomes : le chromosome 3, le 15 et le chromosome X (figure 5) [6].

- 2.3. Les gènes *MAGE* de type I (ou cancer testis antigen genes, CTA)

- 2.3.1. Les *MAGE* de type I regroupent 3 sous-familles. Ils sont exprimés exclusivement dans les tumeurs, les testicules et le placenta

Nous nous sommes intéressés aux gènes *MAGE* de Type I et plus particulièrement aux *MAGEA* et *MAGEB*. Les gènes de type I regroupent la grande majorité des gènes *MAGE* (sous familles A, B et C). Chez l'homme, il y a 15 gènes *MAGEA*, 17 *MAGEB* et 7 *MAGEC*. Chez la souris, il y a 9 *MAGEA* et 7 *MAGEB* chez la souris.

Les gènes des sous-familles A, B, C sont disposés en chapelet dans 3 régions distinctes du chromosome X : p21 pour les *MAGEB*, q26 et q27 pour les *MAGEC* et q28 pour les *MAGEA*.

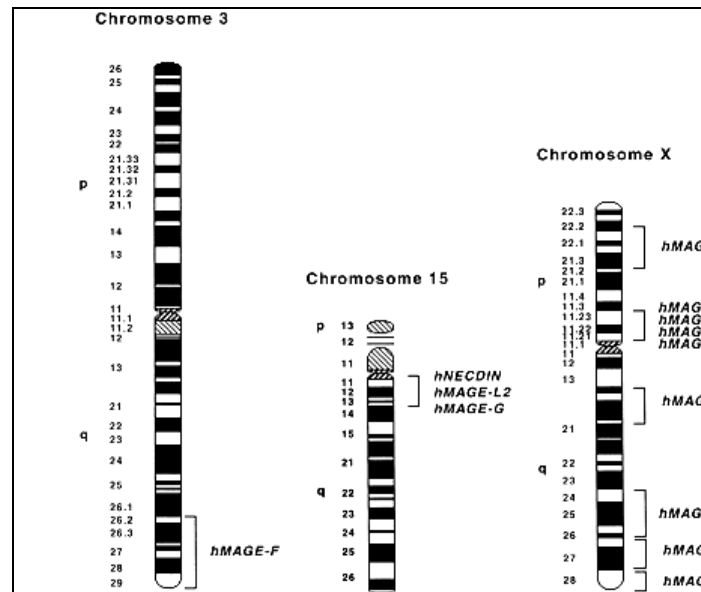


Figure 5 : Localisation chromosomique des gènes *MAGE*. Les gènes *MAGE* se trouvent sur 3 chromosomes : le chromosome 3, le chromosome 15 et le chromosome X. Chez l'homme, les gènes *MAGE* de type I sont localisés en chapelet sur le chromosome X dans les régions p21 (*MAGEB*), q26-27 (*MAGEC*) et q28 (*MAGEA*). Les gènes *MAGE* de type II se trouvent sur chacun des 3 chromosomes.

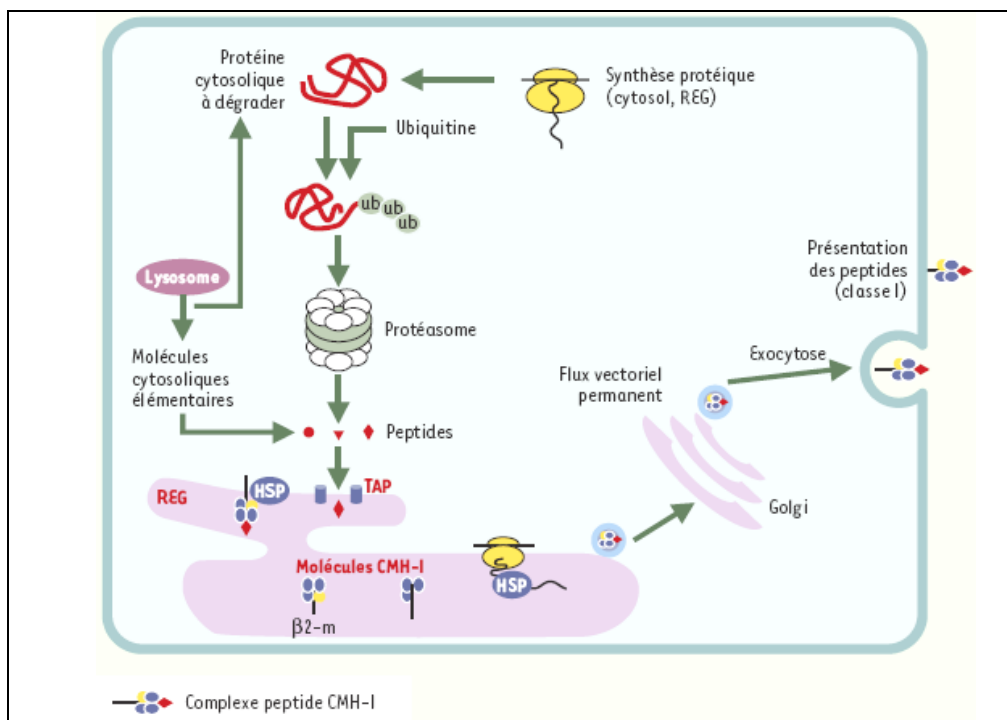


Figure 6 : Les protéines *MAGE* sont dégradées en peptides antigéniques. Grâce à des mécanismes d'adressage, les protéines *MAGE* sont dégradées par le protéasome qui reconnaît la séquence de poly-ubiquitylation. Les peptides qui en résulte se voient ajouter un peptide de présentation. Le complexe est transporté par des protéines TPA vers la surface de la membrane cellulaire.

Les *MAGE* de type I s'expriment dans différents histotypes de tumeurs, par exemple les cancers du sein, du poumon ou de l'estomac. L'expression des gènes *MAGE* ne semble pas dépendre de la présence de facteurs de transcription spécifiques des tumeurs mais de modifications épigénétiques comme la déméthylation de leur promoteur [7-10]. En étudiant le profil de méthylation des îlots CpG présents dans le promoteur des gènes, il a été démontré que les promoteurs des gènes *MAGE* n'étaient pas méthylés dans les tissus où ils s'expriment. Dans les tissus normaux, les gènes *MAGE* sont méthylés et donc silencés et ce n'est qu'après un phénomène de déméthylation que l'expression des gènes *MAGE* est induite.

2.3.2. L'expression des gènes *MAGE* de type I: leurs protéines sont dégradées en peptides antigéniques

Comme il a été précisé plus haut, les gènes *MAGE* de type I codent pour des protéines tumorales[11]. Ces protéines sont dégradées dans la cellule par le protéasome. Les peptides qui en résulte mesurent une dizaine d'acides aminés. Ils sont pris en charge par des protéines TAP qui les transportent jusqu'au reticulum endoplasmique (figure 6). C'est au niveau du RE que le peptide s'associe au HLA (complexe du MHC-I) [12]. Le complexe antigénique est alors présenté à la surface des cellules.

Comparons l'expression d'une cellule tumorale, une cellule somatique et une cellule cancéreuse (figure 7). Les cellules somatiques n'expriment pas les gènes *MAGE* et donc ces cellules ne présentent pas d'antigènes *MAGE*. Les cellules cancéreuses expriment les protéines *MAGE* qui sont dégradées en peptides antigéniques et peuvent être reconnues par les lymphocytes T cytotoxiques. Les cellules de la lignée germinale expriment les protéines *MAGE* mais elles n'expriment pas les protéines présentatrices d'antigène, il n'y a donc pas de réaction immunitaire dirigée contre elles[13].

L'expression des gènes *MAGE* de type I, qui nous intéressent particulièrement dans cette étude, n'étant activée que lors de la transformation cellulaire propre aux cellules cancéreuses, le système immunitaire n'avait encore jamais été confronté à ces antigènes et les catalogue comme du « non-soi ».

2.3.3. La sous famille *MAGEA*

2.3.3.1 Caractéristiques des gènes *MAGEA*

Les gènes *MAGEA* ne semblent pas tous exprimés dans le même compartiment cellulaire, la localisation subcellulaire des protéines diffère d'un membre à l'autre. Ainsi *MAGEA1* et *MAGEA3* seraient cytosoliques. Par contre, *MAGEA10* et *MAGEA11* semblent localisés dans le noyau[14, 15]. *MAGEA1* et *MAGEA4* sont également localisés dans le cytoplasme et dans le noyau des spermatogonies[16].

La fonction des protéines *MAGE* de type I est encore très peu connue, seules quelques interactions peuvent indiquer leur rôle dans les cellules tumorales.

2.3.3.2 Fonction des protéines *MAGEA*

La littérature nous apporte plusieurs informations quant aux propriétés des protéines *MAGE* de type I et à leurs interactions. Celles-ci suggèrent que les gènes *MAGE* de type I pourraient avoir une activité oncogénique.

La protéine *MAGEA1* interagit avec plusieurs protéines. Parmi celles-ci, l'adaptateur protéique *SKIP*. Lorsque *MAGEA1* s'y lie, elle recrute *HDAC1* (histone déacétylases) qui bloque la transcription des gènes. *MAGEA2* est également capable de recruter des *HDAC*

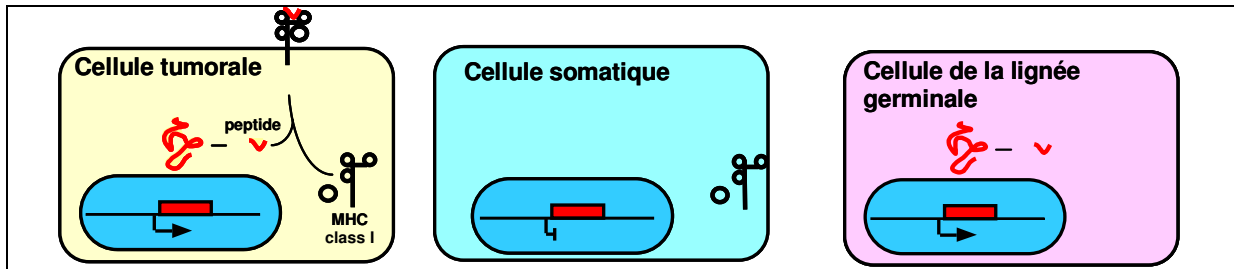


Figure 7 : Représentation schématique de la présentation antigénique de cellules spécifiques des tumeurs. (d'après le mémoire de Vanessa Hérion,, 2004). La cellule tumorale exprime les gènes *MAGE* et possède des systèmes de présentation en surface, donc sera reconnue par le système immunitaire. Une cellule somatique normale, n'exprime pas de gène *MAGE* et n'induit aucune réponse. La cellule de la lignée germinale mâle exprime les protéines *MAGE* mais ne comporte pas de complexe de présentation, c'est pourquoi elle ne sera pas reconnue par la défense immunitaire.

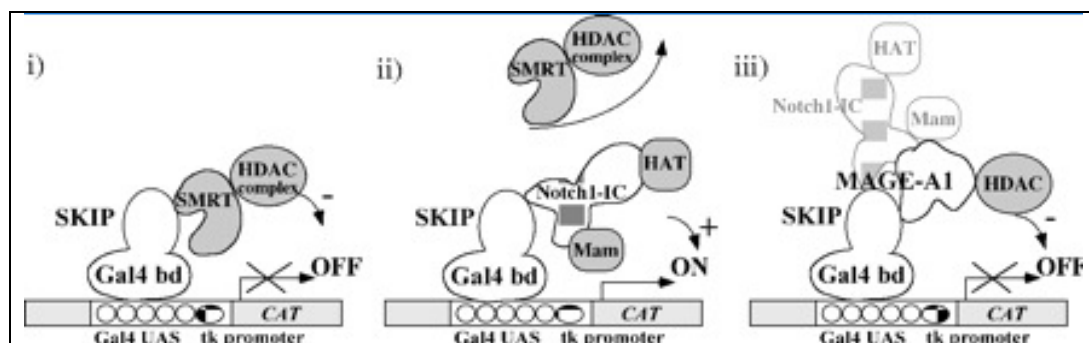


Figure 8 : Interaction entre les protéines MAGEA1 et l'adaptateur SKIP. MAGEA1 va à l'encontre de la transactivation médiée par Notch1-IC et recrute des HDAC. (i et ii) Le modèle de Zhou et al. de l'initiation de la transcription par le détachement du complexe répresseur (complexe HDAC) réalisé par une partie du récepteur Notch1 (iii) MAGEA1 est capable de se lier à SKIP et elle recrute une HDAC, ce qui contrecarre la transactivation de Notch1-IC et par ce fait réprime la transcription.

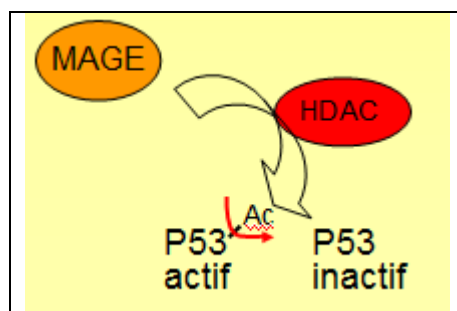


Figure 9 : Les protéines MAGE recrutent des histones déacétyl transférase. Les protéines *MAGE* sont capables de recruter des HDAC afin d'agir sur la protéine p53. p53 est actif lorsqu'il est acétylé. La déacétylation provoque son inactivation. La protéine *MAGEA2* aurait donc un effet anti-apoptotique via p53.

(HDAC3) et d'intervenir sur la transcription de gènes. Parmi ces gènes qu'elle a le pouvoir de réguler, il y a P53, le gène suppresseur de tumeur.

- **MAGEA1 interagit avec l'adaptateur SKIP et recrute HDAC1**

S'intéressant au rôle de MAGEA1, *Laduron et al* [17] ont recherché des partenaires par la méthode du double hybride. Le régulateur transcriptionnel SKIP a été identifié comme un de ses interactants. SKIP (pour Ski interacting protein) joue le rôle d'adaptateur entre des protéines liant l'ADN et des protéines qui activent ou inhibent la transcription. L'interaction entre MAGEA1 et SKIP a été vérifiée par des expériences de coimmunoprécipitations (figure 8). MAGEA1 inhiberait ainsi la transactivation médiée par Notch, un récepteur transmembranaire responsable d'une voie signalétique importante pour le destin de la cellule durant le développement.

L'expression des gènes est associée à l'acétylation des histones. Lorsqu'un complexe répresseur ayant une activité « histone déacétylase » est présent sur le promoteur du gène, la transcription est bloquée. Le facteur SKIP interagit avec la partie intracellulaire du récepteur Notch et ce complexe permet le détachement du complexe répresseur et donc l'activation de l'expression par le recrutement de HAT (histone acétyl transférase). MAGEA1 reconnaît SKIP et participe à une compétition pour la liaison à cette protéine. Si MAGE s'y lie, il recrute des HDAC (Histone déacétylases) ce qui a pour conséquence la répression de la transcription.

- **L'impact de l'interaction de MAGEA2 avec les histones déacétyl-transférases sur la fonction de transactivation de p53**

p53 est un gène suppresseur de tumeur qui contrôle la transcription de gènes importants dans le contrôle de la prolifération cellulaire et dans l'apoptose. Dans des cellules normales, l'expression de la protéine p53 et son acétylation augmentent après un traitement à l'etoposide, une molécule qui aboutit à des dommages à l'ADN et qui est utilisée en chimiothérapie anti cancéreuse. Mais dans les cellules surexprimant MAGEA2, l'effet apoptotique de p53 diminue suite à un dommage à l'ADN[18]. Cela constitue une forme de protection aux agents chimiothérapeutiques. Le fait qu'on n'observe aucun effet de protection au traitement à l'etoposide dans les cellules qui n'expriment pas p53 et qui surexpriment MAGEA2, implique que MAGEA2 empêche la mort cellulaire d'une manière dépendante de p53 (figure 9). Des expériences de coimmunoprécipitation ont permis de mettre en évidence une interaction entre p53 et MAGEA2. MAGEA2 est capable de lier p53, grâce au domaine de liaison à l'ADN de p53.

MAGEA2 n'a pas d'impact sur l'état de phosphorylation de p53, mais bien sur son acétylation. p53 est actif lorsqu'il est acétylé. On remarque une diminution de l'acétylation de la lysine 382 de p53 dans les cellules surexprimant MAGEA2. Lorsque l'on étudie les interactions entre p53 et des histones déacétylases, on observe une association entre HDAC3 et p53 préférentiellement quand MAGEA2 est exprimé. MAGEA2 aurait donc le pouvoir d'assembler des complexes p53/HDAC3.

Dans les mélanomes exprimant MAGEA2, on observe un état réfractaire à l'apoptose provoquée par des dommages à l'ADN.

- **Les protéines MAGEA interagissent avec le répresseur KAP-1**

KAP1 est une protéine qui joue un rôle central dans le contrôle de la transcription. Il s'agit d'un répresseur capable d'agir sur la fonction et le silençage de plusieurs gènes[19]. Il est capable de recruter différentes protéines par son domaine RBCC (ring B box coiled coil) afin de former un complexe de répression. KAP1 est ainsi capable de lier la protéine

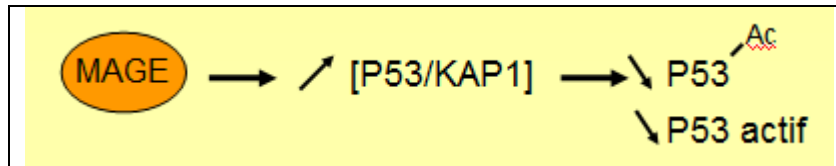


Figure 10 : Les protéines MAGE sont capables de former des complexes avec KAP1 et de favoriser la formation de complexes p53/KAP1. Des complexes P53/KAP1 se forment préférentiellement en présence de protéines MAGEA. Cela a pour conséquence la diminution de p53 acétylé (actif) libre. Les protéines MAGEA ont une action sur les voies dépendantes de p53.

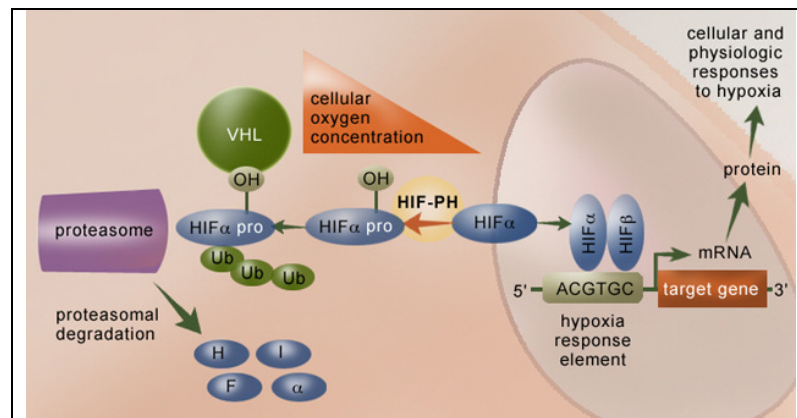


Figure 11 : Le devenir de la sous unité α en conditions de normoxie et hypoxie. Le facteur HIF est un facteur de transcription qui agit sur des gènes en réponse aux stress oxygéniques. Il est constitué d'une sous unité alpha et une sous unité beta. La sous-unité alpha est dégradée par le protéasome en condition de normoxie. Le signal de dégradation est exprimé par des PHD (HIF prolyl hydroxylases).

p53 ce qui a pour conséquence la diminution de la proportion de p53 libre. Le domaine est partagé avec tous les facteurs de transcription à domaine KRAB (Krueppel-associated box). Ce domaine joue un rôle dans la répression transcriptionnelle des ARN polymérase I, II et III ainsi que dans l'épissage des ARN. KAP1 peut recruter des protéines afin de participer au silençage de gènes de 4 manières. (1) KAP1 est capable de cibler des promoteurs spécifiques grâce au motif en doigt de zinc des protéines KRAB. (2) Il promeut la déacétylation d'histones, (3) Il favorise la méthylation de la lysine 9 de l'histone 3, reconnue pour son effet répresseur. (4) KAP1 peut recruter la protéine HP1 (protéine de l'hétérochromatine). Celle-ci joue un rôle majeur dans la répression de l'activité des gènes transcrits au voisinage d'une région hétérochromatique[20].

KAP1 est capable de lier p53 au niveau de son domaine MDM2 pour agir comme un corépresseur. Cela a pour conséquence la suppression de son acétylation et de sa fonction (figure 10). Il semble que l'expression des protéines MAGE supprime l'apoptose dépendante de la voie p53 dans des lignées cellulaires de mélanomes. MAGEA2 est capable de se lier à KAP1 (expériences de doubles hybrides et de coimmunoprécipitation), et ainsi de favoriser la liaison de KAP1 avec p53. Lorsque l'expression des MAGE est supprimée (par ARN interférents) on observe une augmentation de l'apoptose, une augmentation de l'acétylation de p53 et une diminution de la viabilité des cellules. Le domaine de MAGE qui interagit avec le domaine BB coiled coil est commun aux 3 sous-familles de type I, il est donc possible que les MAGE de ces 3 sous-familles puissent interagir avec KAP-1.

L'action de MAGE menant au maintien de la survie cellulaire et à la diminution d'apoptose de manière dépendante de p53 peut à priori se dérouler selon 2 hypothèses : soit MAGE facilite sa dégradation, soit il bloque sa liaison à l'ADN.

▪ **MAGEA11 interagit avec les HIF prolyl hydroxylases**

Il a récemment été démontré que MAGEA11 avait la capacité d'interagir avec l'enzyme PHD (HIF prolyl hydroxylases)[15]. Lors d'une diminution de la concentration en oxygène dans la cellule, le facteur HIF (Hypoxia inducible factor) est activé, enclenche l'angiogenèse et induit un switch glycolytique. HIF est un hétérodimère constitué de la sous-unité α dont la concentration est régulée et de la sous-unité β présente constitutivement dans le cytoplasme. En temps normal, lorsque la concentration en oxygène est stable dans la cellule, la sous-unité α est hydroxylée ce qui constitue un signal pour sa dégradation par le protéasome (figure 11). Il n'y a aucune stabilisation donc aucune translocation vers le noyau. Par contre, quand la cellule entre en conditions d'hypoxie, il n'y a plus de dégradation de la sous-unité α qui migre dans le noyau et s'hétérodimérise. Cette forme constitue un facteur de transcription pour des réponses à l'hypoxie. MAGE11 serait capable d'inhiber les PHD ce qui aurait pour conséquence l'augmentation de la forme stable de HIF.

Notons que des oncogènes tels que V-Src et Ras ont aussi la capacité de modifier l'activité des PHD.

2.3.4. La sous-famille des MAGEB

Il y a actuellement 17 gènes MAGEB identifiés chez l'homme et 10 chez la souris. Comme pour les gènes de la sous-famille A, la séquence des MAGEB est peu conservée entre les espèces, chez la souris, *Mageb1*, *Mageb2* et *Mageb3* ont des séquences très proches. *Mageb1* et *Mageb2*, sont localisés sur le chromosome X. Ils sont composés de 3 exons, dont seul le dernier est codant. Ces 2 gènes codent pour la même protéine Mageb1-b2 constituée de 330 acides aminés[6]. *Mageb3* est localisé sur le chromosome 2. Il est probablement un variant de *Mageb2* qui aurait été rétrotransposé sur le chromosome 2. Il y a une homologie de séquence de 98% entre *Mageb2* et *Mageb3* et les protéines correspondantes ne sont différentes que de 12 acides aminés. *Mageb3* ne contient pas d'intron.

2.4. Les gènes MAGE de type II

2.4.1. Caractéristiques : les gènes MAGE de type II sont exprimés dans différents tissus somatiques adultes et embryonnaires.

Les deux gènes MAGE de type II les mieux caractérisés sont *Necdin* et *MAGED1*. Les gènes MAGE de type II regroupent les 9 sous-familles suivantes, en plus du gène *Necdin* : *MAGED*, *E*, *F*, *G*, *H*, *I*, *J*, *K* et *L*. Leur profil d'expression est très large : leurs ARN sont présents dans de nombreux tissus normaux adultes somatiques [1, 21]. Ces gènes sont localisés sur 3 chromosomes : *MAGEF* se situe sur le chromosome 3, *MAGEG*, *L* et *Necdin* se trouvent dans la région q11-q13 du chromosome 15 et les gènes *MAGED*, *E*, *H*, *I*, *J* et *K* sont sur le chromosome X.

La fonction des protéines MAGE de type II est encore peu connue. Ces gènes sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose. Au niveau moléculaire, ils interagissent avec des récepteurs membranaires, des protéines modulatrices de l'apoptose et de la machinerie transcriptionnelle.

Les 2 gènes MAGE de type II qui sont les mieux caractérisés sont *MAGED1* et le gène *NECDIN*.

2.4.2. MAGED1 et ses interactants

MAGED1, aussi appelée Dlx1 ou NRAGE, est une protéine de 87,792 Daltons qui joue un rôle dans le développement des neurones. La sous-famille *MAGED* regroupe 3 gènes murins et 4 gènes humains[22-24].

Contrairement à ce qui est observé pour la plupart des autres gènes MAGE, ces gènes sont très conservés entre l'homme et la souris[1].

MAGED1 s'associe à différentes protéines de régulation importantes intervenant dans l'apoptose et le cycle cellulaire comme des récepteurs à la surface des cellules, des facteurs de transcription[21]...

Par des expériences de double hybride, de nombreux interactants de MAGED1 ont été identifiés :

Xiap

Xiap est une protéine inhibitrice de l'apoptose liée au X[25]. MAGED1 interagit avec Xiap qui interfère directement avec la voie des caspases. Dans ce contexte, MAGED1 a une activité pro-apoptotique.

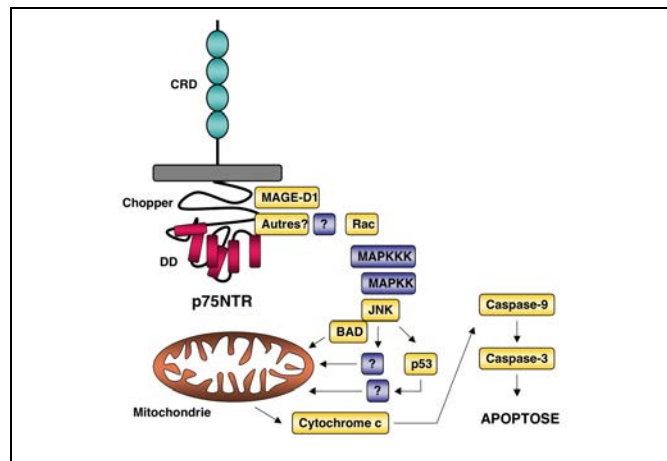


Figure 12 : Représentation schématique de la voie intracellulaire du récepteur à neurotrophines p75NTR. p75NTR conduit à l'activation de la kinase JNK, à la libération de cytochrome c et à l'activation des caspase-9, -6, et -3. Les mécanismes reliant p75NTR à l'activation de JNK ainsi que ceux reliant JNK à la libération de cytochrome c ne sont que partiellement élucidés. Les boîtes jaunes indiquent les protéines de la voie signalétique identifiées expérimentalement. Les boîtes bleues représentent des participants potentiels. (Figure d'après la thèse de M. Bertrand, 2005[26])

Dlx/Msx

Les protéines Dlx/Msx sont des facteurs de transcription à homéodomaine[27-30]. Elles ont des activités opposées dans le sens où elles s'inhibent l'une l'autre. Dlx joue un rôle d'activateur tandis que Msx a un rôle dans la répression transcriptionnelle de gène. MAGED1 module l'activité transcriptionnelle de ces homéoprotéines.

MMP2

MAGED1 peut diminuer l'expression des protéines MMP-2 (matrix metalloproteinases) de la famille des endoprotéases extracellulaires, ce qui a pour conséquence de diminuer le potentiel de formation de métastases des tumeurs. Ces enzymes MMP-2 sont capables d'hydrolyser les composants de la Matrice Extra Cellulaire (MEC). Un contrôle de ces protéines suggère un contrôle sur la formation de métastases qui doivent pouvoir sortir du tissu initial et en envahir un autre[22].

Les neurotrophines

Les neurotrophines sont des facteurs de croissance qui mènent à la survie et à la différenciation des neurones. Les protéines sécrétées appartenant à la famille des neurotrophines sont les suivantes : le *nerve growth factor* (NGF), le Novel Neurotrophin-1 (NNT-1), la neurotrophine 3 (NT-3), le *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) et la neurotrophine 4/5 (NT-4/5). Ces facteurs de croissance se lient à des récepteurs à tyrosine kinase et au récepteur p75NTR [26, 31].

p75NTR

p75NTR est un récepteur aux neurotrophines (figure 12). En fonction du contexte cellulaire, la neurotrophine peut initier un signal menant à l'activation de la voie JunK et la mort cellulaire [32]. Les neurotrophines sont des facteurs de croissance qui peuvent se lier à 2 types de récepteurs : les récepteurs à tyrosine kinase et le récepteur p75 qui appartient à la superfamille des récepteurs TNF. Les neurotrophines entrent en jeu dans 4 activités liées au développement : la régulation de la survie neuronale, la différenciation, la croissance dendritique et axonale et enfin, l'activité synaptique. Il existe 3 types de récepteurs à tyrosines kinase : TrkA auquel se lie NGF, TrkB auquel se lient BDNF et NT4 /5 et TrkC dont le ligand est NT3.

p75NTR interagit avec les récepteurs à tyrosine kinase mais en leur absence est capable de signalisation autonome. Son mécanisme de signalisation est encore inconnu mais il a la capacité d'induire la mort cellulaire dans plusieurs histotypes. Cette signalisation passe par la voie p53. Cette affirmation a été apportée par l'observation de l'inhibition de l'apoptose dans des cellules déficientes en p53. La région intracellulaire du récepteur ressemble avec quelques différences cruciales au domaine de mort que contiennent typiquement les récepteurs apoptotiques dont la cascade intra cellulaire active la voie des caspases via des adaptateurs cytosoliques. En tout cas, malgré les ressemblances, le signal diffère de celui engendré par les autres membres de la superfamille des récepteurs TNF car il n'implique pas l'activation de la caspase 8 mais de la JunK et la phosphorylation des membres de la famille à domaine BH3.

p75 est coexprimé dans plusieurs populations de neurones avec les récepteurs Trk. MAGED1 peut interagir physiquement avec p75. L'effet apoptotique de MAGED1 est contraire à l'effet des Trk et MAGED1 empêche la liaison p75/TrK. Chaque association est dite « exclusive ». La liaison p75/MAGED1 mène à l'apoptose et l'expression de Trk annule le signal de mort cellulaire.

MAGED1 interagit avec la partie cytosolique de p75 afin de favoriser les réponses apoptotiques suite à la liaison de NGF. L'activation de cette voie provoque une accumulation

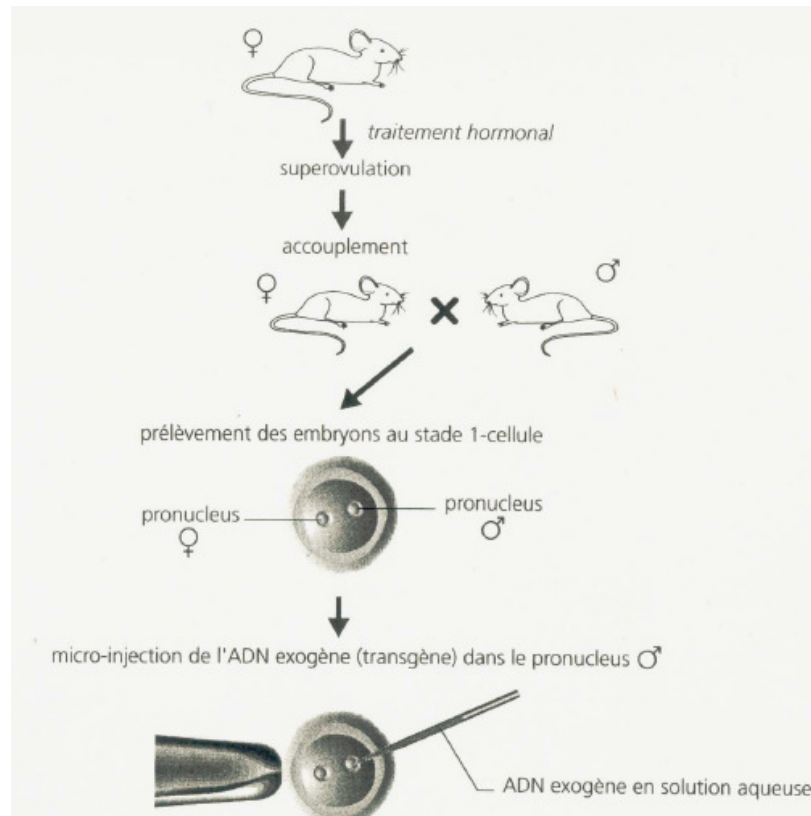


Figure 13 : Représentation schématique de la transgénèse par addition. La transgénèse d'addition est une méthode permettant l'insertion d'un transgène de manière aléatoire dans le génome en introduisant sa séquence dans le pronucléus Male d'un œuf fécondé.

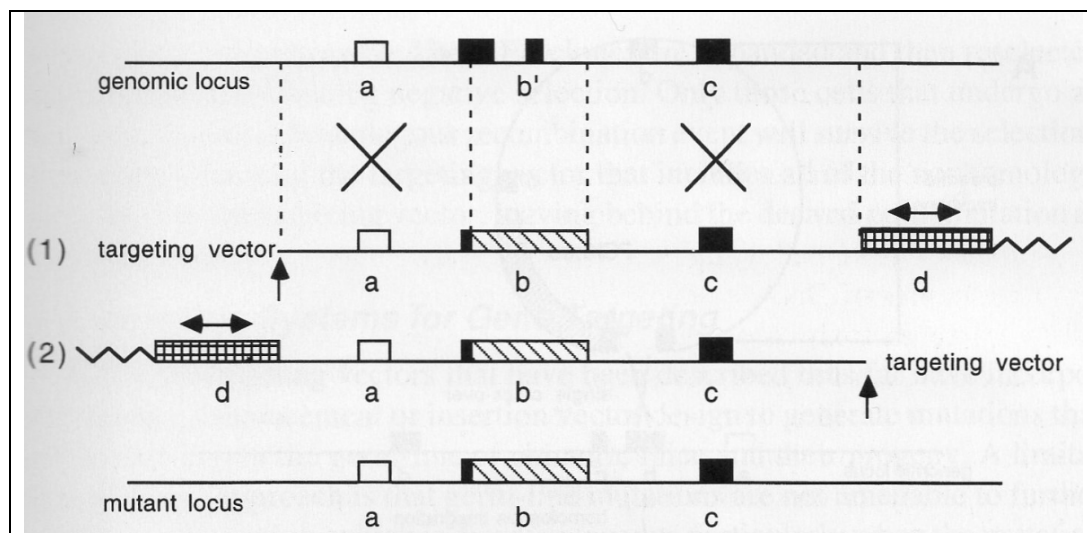


Figure 14 : Représentation schématique des événements de recombinaison homologue permettant l'introduction d'un transgène. La double recombinaison permet l'échange des séquences se trouvant entre les bras d'homologie. (1) Une séquence b' est remplacée par une séquence b dans le locus génomique. Le résultat (2) est un locus mutant.

cytosolique de cytochrome C, une activation des caspases 3,9 et 7 et la mort cellulaire par la voie des caspases.

MAGED1 est aussi impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire via la voie p53.

En conclusion, MAGED1 est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, de l'adhérence cellulaire et de la transcription. MAGED1 qui lie p75 sous certaines conditions, inhibe le cycle cellulaire via la voie p53 et facilite l'apoptose. Cette liaison est antagoniste de la liaison P75/TrK.

2.4.3. Necdin

Le gène *Necdin* (*Ndn*) spécifie une protéine de 321 acides aminés. Il est localisé sur le chromosome 15q11.2-q12 et ne possède pas d'intron. Necdin joue un rôle important dans la différenciation neuronale au niveau du cerveau [33-36]. Comme MAGED1, c'est une protéine de signalisation multifonctionnelle. Elle stabiliserait la différenciation terminale des neurones post-mitotiques.

Les ARN messagers de Necdin sont présents dans pratiquement tous les neurones du système nerveux central, à partir des stades les plus précoces jusqu'à l'âge adulte. Necdin est impliquée dans les événements intranucléaires par lesquels les neurones sortent du cycle de prolifération cellulaire et deviennent définitivement quiescents[37].

Ndn supprime la prolifération de plusieurs lignées cellulaires et interagit avec des facteurs de transcription qui régulent le cycle cellulaire tel qu'E2F. Un des interactants connus de Ndn est p53 dont elle inhibe l'activité apoptotique. Ndn facilite la sortie du cycle cellulaire et l'inhibition de l'apoptose pour stabiliser la différenciation terminale des neurones. Ndn faciliterait aussi la liaison Trk/p75.

Une caractéristique de ce gène est qu'il est soumis à l'empreinte génomique : seul l'allèle paternel est exprimé. Lorsque le gène paternel est délété chez la souris, certains traits phénotypiques identiques à la pathologie du syndrome de Prader Willy sont observés[33]. La délétion de Ndn provoque une augmentation de l'apoptose dans les neurones sensoriels dont la croissance dépend du facteur NGF. Le syndrome de Prader Willy est une pathologie développée en conséquence de l'absence de la région PWS/AS du chromosome 15 paternel. Les malades atteints de ce syndrome présentent un hypogonadisme, de l'obésité et des troubles mentaux, alimentaires et comportementaux.

B. Transgénèse dans la souris

(Génétique de la souris, Panthier et al., 2003)

Il existe de nombreuses méthodes permettant de manipuler le génome de la souris[38, 39]. Nous avons décidé de réaliser des souris transgéniques qui exprimeront des gènes type I de manière ectopique. Les transgènes sont introduits dans le génome de la souris de 2 manières différentes. Soit par transgénèse d'addition, soit par recombinaison homologue. L'expression du transgène peut être rendue conditionnelle grâce à un système qui régule la transcription. Le système Cre-lox peut être employé pour réguler la transcription. En effet, sous l'action de la recombinase Cre, une séquence qui arrête la transcription en amont du gène est délétée.

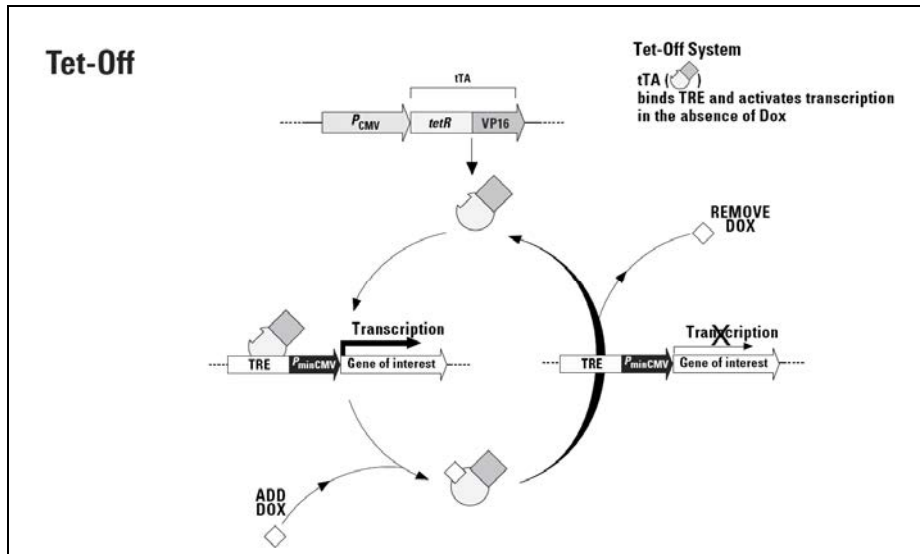


Figure 15 : Représentation schématique du fonctionnement du système inductible à la tétracycline **TetOFF**. Le système tetOFF dépend de la tétracycline. En absence de tétracycline, la transcription est active. La tétracycline est capable de se lier au régulateur transcriptionnel ce qui le détache du promoteur, la transcription est donc arrêtée.

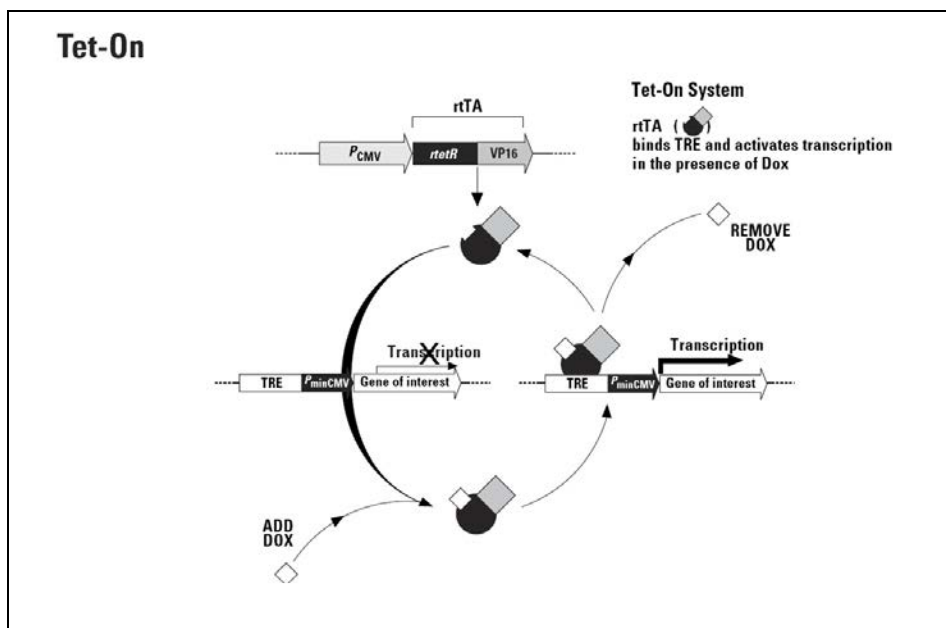


Figure 16 : Représentation schématiques du fonctionnement du système inductible à la tétracycline **TetON**. En absence de tétracycline, la transcription est bloquée car aucun activateur n'est présent sur le promoteur. Lorsque la tétracycline est administrée, elle se lie à l'activateur, qui dorénavant actif peut se lier sur le promoteur et activer la transcription.

1. Transgénèse d'addition

La transgénèse d'addition est un processus par lequel on introduit une séquence exogène dans le génome de la souris par insertion aléatoire. Le transgène est en général injecté dans le pronucléus mâle d'un œuf fécondé et peut s'insérer n'importe où et souvent en plusieurs copies. L'avantage est la relative simplicité de l'expérience. Les désavantages, en plus du nombre de copies incontrôlable, sont le manque de contrôle sur le locus d'insertion et sur son expression. La séquence peut s'être insérée au milieu d'un gène important ou elle peut s'être introduite dans une région d'hétérochromatine. Une technique plus fiable est la transgénèse par recombinaison homologue.

2. Transgénèse par recombinaison homologue

La transgénèse par recombinaison homologue est une technique qui permet d'introduire une séquence à un locus donné par recombinaison homologue. Elle débute avec l'élaboration d'un vecteur qui permettra l'insertion au bon endroit du génome. Typiquement cela est possible par la présence de bras d'homologie bordant le transgène. Ces bras correspondent à la séquence du locus dans lequel doit être introduite la séquence, soit en remplaçant ce qui se trouve entre les bras dans le génome, soit en insérant le transgène (Figure 14).

3. Le locus *Rosa26*

Le locus *Rosa26* se trouve sur le chromosome 6. Il a été identifié par insertion d'une cassette de gene-trap [40-42]. Il présente 2 caractéristiques essentielles pour son emploi dans l'élaboration dans un système de knock-in (insertion d'un transgène dans un locus déterminé par recombinaison homologue). Tout d'abord, son promoteur présente une expression ubiquiste. Ensuite, l'introduction d'ADN dans sa séquence ne semble causer aucune conséquence phénotypique. Sa fonction reste pourtant inconnue.

C. Les systèmes d'expression inductible

Il existe plusieurs systèmes permettant l'expression conditionnelle d'un gène dans un modèle murin. Par exemple, le système utilisant la tétracycline qui consiste à moduler le domaine de liaison à l'ADN de l'activateur du promoteur d'un gène cible. Il existe aussi des systèmes qui recombinent une séquence d'ADN se trouvant entre 2 sites particuliers, délétant ainsi une partie du gène.

1. Les systèmes inductibles par la tétracycline

Le système inductible par la tétracycline met en jeu un complexe activateur qui se lie au promoteur de l'opéron tétracycline. Le complexe est une protéine hybride entre le répresseur de l'opéron TetR bactérien et l'activateur transcriptionnel VP16, du virus de l'herpes simplex. Cette protéine s'hybride au niveau de la séquence d'ADN de l'opérateur tétracycline (tetO). L'affinité de l'activateur hybride est modulée par la présence de tétracycline. Le gène dont on souhaite contrôler l'expression est placé sous le contrôle d'un promoteur minimum associé à des séquences tetO.

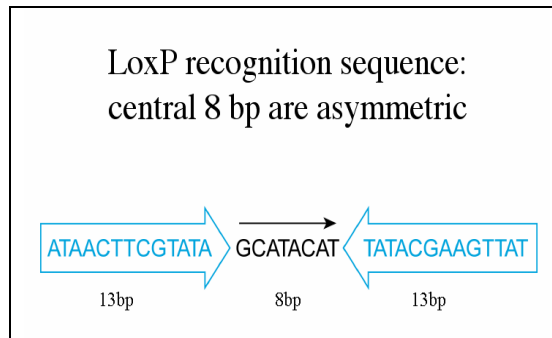


Figure 17 : Représentation schématique de la composition d'un site loxP. Les sites lox sont composés de séquences inversement répétées de 13pb et d'une séquence corps centrale de 8pb.

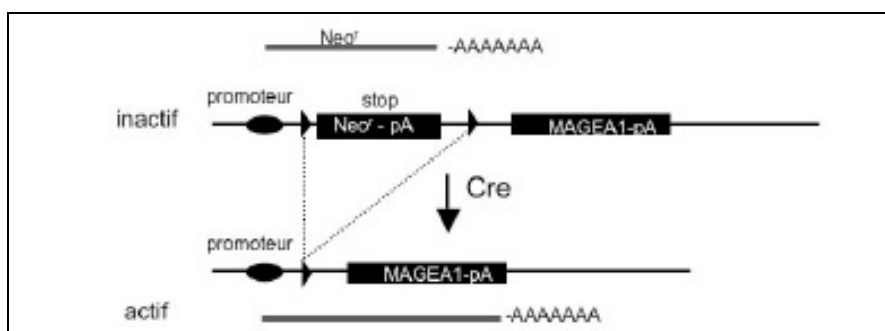


Figure 18 : Représentation schématique du fonctionnement du système Cre/loxP. Les flèches représentent les sites loxP. Une cassette de résistance à la Néomycine ainsi qu'un signal de polyadénylation (qui stoppe la transcription) se trouvent entre les sites, cette séquence est dite « floxée ». La recombinase Cre est capable de reconnaître les sites loxP et d'enclencher leur recombinaison. La cassette floxée est déléetée par ce système, permettant la transcription.

1.1. Le système Tet-Off

Dans le système Tet-Off la transcription est inhibée lors de l'ajout de la tétracycline. L'activateur hybride tetR/Vp16 est tTA. En absence de tétracycline, il se lie au promoteur tetO ce qui active la transcription. Lors de l'ajout de tétracycline, le complexe perd de l'affinité et ne peut plus se lier au promoteur. Cela ne permet plus l'activation de la transcription. Le système est donc actif en absence de tétracycline (Figure II.15).

1.2. Le système Tet-ON

Le système Tet-ON met en jeu un complexe hybride modifié, rtTA. Celui-ci ne se lie aux séquences tetO qu'en présence de tétracycline. Pour induire la transcription par le système Tet-ON, il faut ajouter de la tétracycline qui permet d'augmenter l'affinité du complexe pour la région promotrice. Le système est donc actif en présence de tétracycline (figure II.16).

2. Le système Cre-Lox

Le système Cre-loxP met en scène des sites loxP (Figure 17) et la recombinaise site spécifique Cre[43]. Le principe est le suivant : sous l'action de la recombinaise Cre, deux sites loxP portés par la même molécule d'ADN et orientés dans le même sens forment une boucle et la séquence qui les sépare est délétée (figure 18). Ce système a été initialement trouvé chez le phage P1. Les sites loxP sont constitués de séquences de 13 paires de bases inversement répétées, séparées par un espaceur de 8 paires de bases. L'enzyme Cre quant à elle mesure 35kDaltons, elle reconnaît les sites loxP et les recombine.

Ce système de recombinaison est souvent employé dans la réalisation de souris KO dites « conditionnelles » car elle procède à la délétion du gène à un moment voulu, ce qui évite les désavantages que peut présenter la délétion du gène d'intérêt durant le développement.

Dans le cadre de la réalisation de nos souris knock in, les sites loxP ont été employés pour flanquer un fragment d'ADN (cassette stop) contenant 3 séquences de polyadénylation qui constituent un frein à la transcription du gène qui suit. Le gène en question est un des MAGE d'intérêt. La recombinaison des sites loxP permet la délétion du STOP et ainsi l'expression du gène MAGE.

Le système cre-lox est utilisé de manière très répandue car son efficacité est importante.

Pour utiliser ce système in vivo, le moyen le plus courant est de croiser une souris transgénique avec une souris qui exprime la Cre de manière ubiquiste ou tissu-spécifique. La recombinaison des sites loxP aura lieu là où l'enzyme est exprimée.

D. Systèmes moléculaires permettant de confecturer un transgène MAGEA1 inducible et pourvu d'une étiquette amovible

Le transgène construit dans ce projet utilise, outre le système de recombinaison Cre/loxP, un autre système de recombinaison site-spécifique, le système FRT/FLP. Est également utilisée une séquence d'attachement interne du ribosome (IRES). Certaines étapes de la construction du transgène ont été réalisées à l'aide du système Gateway.

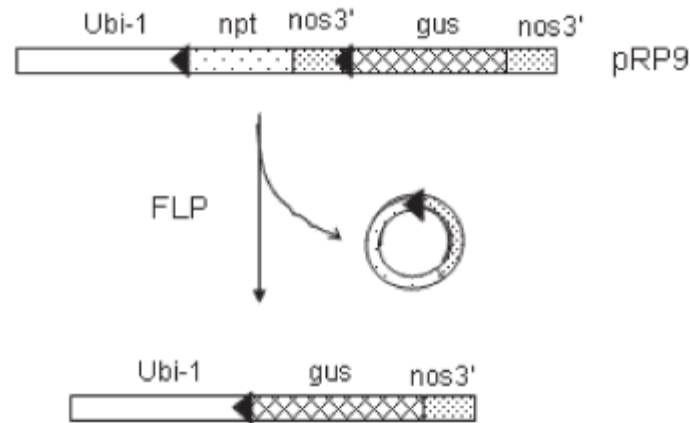


Figure 19 : Représentation schématique de la recombinaison FRT/FLP. Sous l'action de la flippase, les sites FRT orientés dans le même sens se recombinent déléant la séquence se trouvant dans leur espacement.

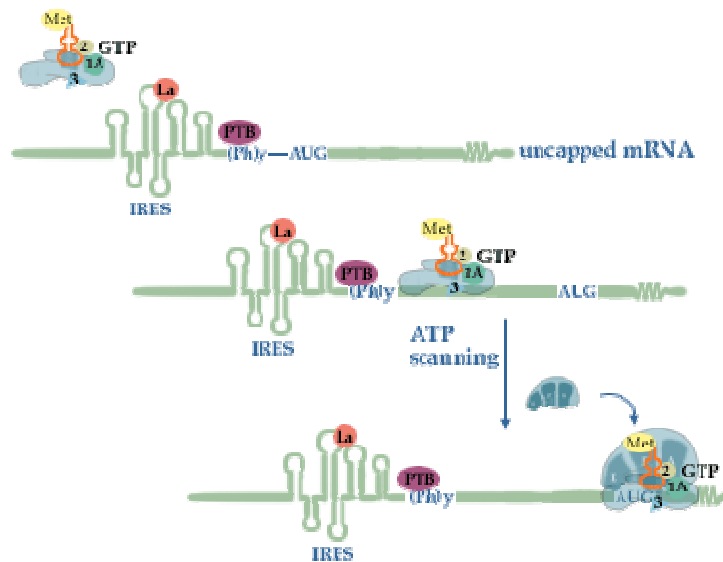


Figure20 : La séquence IRES permet au ribosome de reprendre la traduction sur l'ARN messenger. La séquence IRES permet le recrutement du ribosome d'une manière indépendante à l'extrémité 5' de l'ARN messenger.

1. Le système de recombinaison FRT/FLP

Le système FRT-FLP, originaire de la levure *S. cerevisiae*, a été modifié pour être efficace dans les cellules de mammifères (figure19). Il implique des sites FRT qui sont des répétitions inversées de 34 paires de base : 5' GAAGTTCCTATTctagaaaGTATAGGAACTTC 3'. Sous l'action de la flippase, deux sites présents sur la même molécule d'ADN dans la même orientation sont recombines et engendrent la délétion de la séquence comprises entre eux.

Pour faire fonctionner la recombinaison FLP lors de manipulations in vivo, il faut croiser la souris portant les sites FRT avec une souris exprimant FLP dans un type cellulaire cible [44]. La génération F1 qui en résulte aura délété les séquences présentes entre les sites FRT dans les cellules cibles.

2. Les séquences IRES (Internal Ribosome Entry Sites), signaux de reconnaissance pour le ribosome

Une expérience a montré que les ribosomes de procaryotes étaient capables de se lier à de l'ARN circulaire afin d'en initier la traduction (C. Hellen et al., 2001). Or cette capacité n'est pas partagée avec les ribosomes d'eucaryotes, qui ne peuvent l'initier que sur des ARN linéaires. Les ribosomes eucaryotiques ont besoin d'une extrémité 5' libre pour s'attacher. En 1988, Jang et al ont découvert que certains ARN viraux étaient traduits par un mécanisme indépendant de l'extrémité 5'. La traduction est débutée grâce à des régions spéciales appelées IRES.

Les séquences IRES, pour Internal Ribosome Entry Site, sont des séquences qui ont été initialement identifiées chez le poliovirus mais il s'avère qu'elles existent dans l'ARN de plusieurs virus et dans certains gènes de mammifères.

La traduction classique dépendante de l'extrémité 5' commence par le recrutement de la sous-unité 40S du ribosome à l'extrémité 5' de l'ARNm. Cette sous-unité porte le t-RNA de la méthionine. Plusieurs facteurs d'initiation scannent littéralement l'ARN de 5' en 3' jusqu'à trouver le codon « start ». A ce stade la 2^{ème} sous-unité du ribosome, 60S, est recrutée et le ribosome décode l'ARN en protéine.

L'IRES quant à lui permet l'initiation de la traduction d'une manière indépendante de l'extrémité de l'ARN, en amont de l'AUG proximal (figure20).

Pour confirmer le rôle initiateur de la traduction des éléments IRES, des ARN messagers contenant une séquence IRES ont été modifiés. En remplaçant un par un les AUG de la séquence en amont du codon d'initiation par des UUG (qui ne permettent pas l'initiation), la traduction était quand même réalisée. Cette expérience met en évidence que ce sont bien les éléments IRES qui permettent la traduction. D'autre part, en introduisant des séquences IRES d'origine virale dans une région qui sépare 2 cistrons d'un ARN polycistronique, on observe que la traduction du second gène est quand même réalisée, même si la traduction du premier est interrompue.

Beaucoup d'ARN contiennent des séquences IRES, surtout à l'extrémité 5' NTR. Des banques d'ARN ont été testées pour la traduction d'ARN polycistronique et on trouve des séquences IRES chez beaucoup d'espèces aussi bien chez les mammifères que les insectes. Il y a énormément de similarités en terme de séquence, de structure et de tailles entre les IRES des organismes supérieurs. Les IRES de virus contiennent des AUG à leur extrémité 3', mais on ne sait pas comment le ribosome atteint l'ARN. Cela dépend sans doute du recrutement de facteurs cellulaires. Un argument en faveur du besoin de facteurs qu'auraient les séquences IRES est qu'une même séquence IRES ne fonctionne pas dans tous les types cellulaires. Il

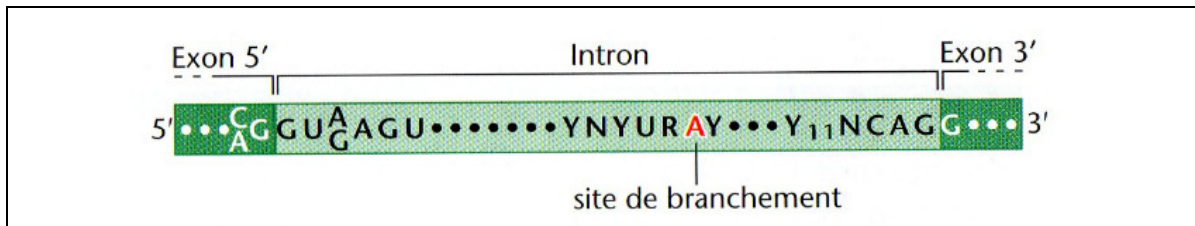


Figure 21: Séquences consensus aux jonctions exon-intron-exon nécessaires à la réalisation du splicing.

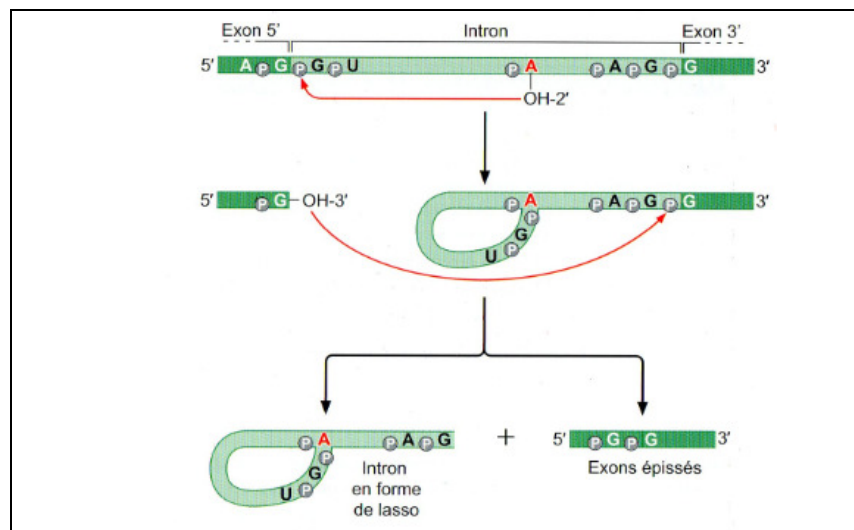


Figure 22: La réaction d'épissage. La figure représente les 2 attaques nucléophiles successives qui se produisent pour aboutir à l'excision de l'intron lors de l'épissage de l'ARN messager.

existe une restriction à certains types cellulaires pour chaque séquence IRES. Une multitude de facteurs trans-agissant (ITAFs) ont été identifiés. Ils jouent un rôle important dans la modulation de l'efficacité de plusieurs éléments IRES. Durant le cycle cellulaire et l'apoptose, seuls quelques facteurs sont capables de traverser le noyau. On a observé que les ITAFs étaient capables de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau, ce qui implique qu'ils peuvent moduler l'activité des éléments IRES même durant le cycle cellulaire, l'apoptose ou encore une infection virale. Parmi les ITAFs, retenons le PTB (pyrimidine tract-binding) qui est une protéine qui peut se lier à l'IRES et dont l'action consiste à aider l'IRES à atteindre et à maintenir une conformation active, capable de recruter les facteurs essentiels.

Malgré que les séquences IRES soient présentes en grand nombre dans les ARN, leur fonctionnement et leur structure restent méconnus. Récemment, des études ont mis en évidence des hélices qui forment un échafaudage qui orienterait les régions inapariées ce qui agirait comme des sites de liaison pour les facteurs et les ribosomes pour former le complexe d'initiation

Une autre caractéristique des éléments IRES est que ceux-ci ne se résument pas à une seule séquence, en effet, ils sont composés de séquences non contiguës qui ensemble réalisent la fonction. L'intégrité est très importante cependant, il est donc surprenant de constater que l'IRES peut être composée de plusieurs morceaux.

L'IRES permet de débiter la traduction même dans des circonstances empêchant normalement la traduction, telles que durant la méiose, l'apoptose ou des conditions d'hypoxie. Certains gènes transcrits en cas de stress comportent des séquences IRES.

3. L'épissage de l'ARN

L'épissage est un réarrangement qui se produit après la transcription et qui modifie un ARN pré-messager, en ARN messager. Durant ce processus, les introns, qui séparent les exons, sont éliminés afin de rejoindre 2 exons.

Afin que la machinerie de l'épissage, appelée spliceosome puisse distinguer les introns des exons, des séquences particulières les délimitent. A l'extrémité 5' de l'intron, donc à la jonction 5' exon-intron 3' se trouve une séquence correspondant à un site donneur. A son extrémité 3', l'intron présente un site accepteur. Afin que l'épissage se produise, un 3^{ème} site est nécessaire, il s'agit d'un site de branchement (figure 21). Ce site se trouve dans la séquence de l'intron, à proximité de son extrémité 3'. Ces 3 sites n'ont pas une séquence exclusive, mais certaines bases sont très conservées. La figure I montre les bases indispensables formant chacun de ces sites.

L'intron est excisé en 2 étapes de transestérification pendant la transcription durant laquelle des liens phospho-diester sont cassés et où d'autres se forment (figure 22). La première est une attaque nucléophile de la guanosine conservée du site donneur de l'épissage sur l'adénosine du site de branchement. Ensuite a lieu une autre attaque nucléophile d'une guanosine du site donneur sur la guanosine du site accepteur. C'est durant cette 2^{ème} attaque nucléophile que l'intron est libéré et que les 2 exons sont soudés. Lorsque l'extrémité 5' de l'intron est encore liée au site de branchement, la structure que la liaison forme est communément appelée la « forme du lasso ». Après cette étape, l'intron est dégradé.

La machinerie de l'épissage, ou spliceosome est un complexe de 150 protéines et 5 ARN. Les réactions de réarrangements de l'ARN se déroulent en plusieurs étapes.

Tout d'abord, un premier facteur protéique est recruté sur la région riche en pyrimidines qui se trouve juste après le site de branchement. Ensuite la BBP aide une 2^{ème} protéine à se lier sur le

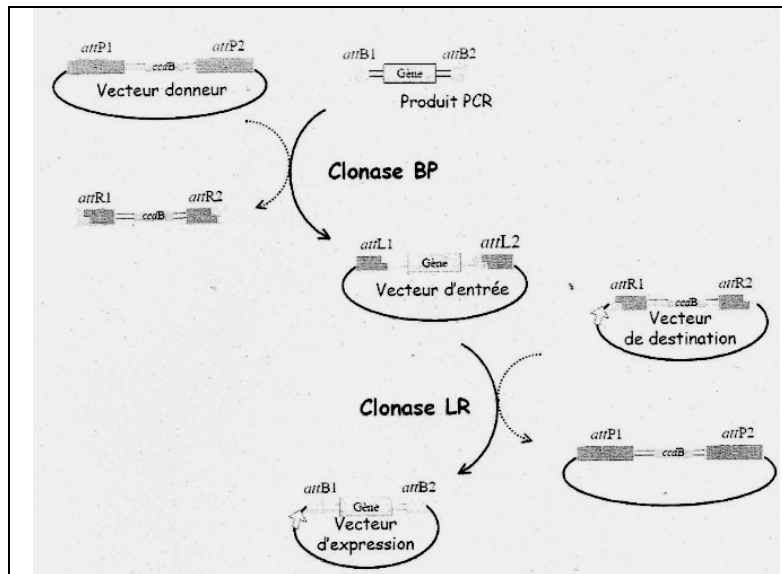


Figure 23: Principe de la recombinaison du système gateway. En 2 réactions, la séquence d'intérêt se retrouve dans un vecteur d'expression. La première réaction consiste à introduire la construction dans un vecteur donneur grâce à la réaction de la BP clonase. Ce vecteur d'entrée participe avec un vecteur accepteur à la seconde réaction qui est une réaction d'excision. Cette réaction est réalisée par le LR clonase.

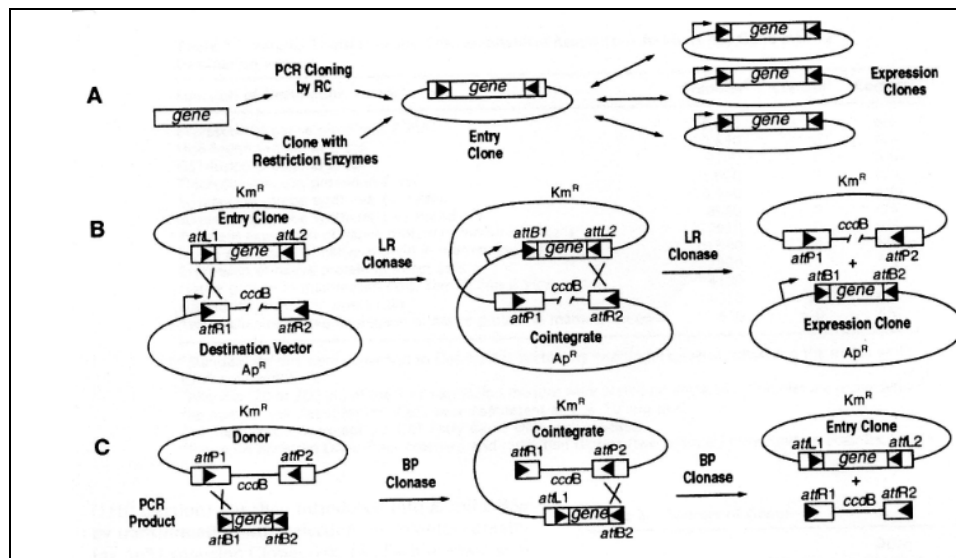


Figure 24: Détails des réactions de la clonase. A. Principe non détaillée de la recombinaison gateway, au départ le gène d'intérêt se voit ajouter des bras de recombinaison afin de pouvoir être recombinaison dans un vecteur d'expression. B. Réactions menant à l'introduction de la séquence d'intérêt dans un vecteur d'expression. C. Réaction menant à l'introduction de la séquence dans un vecteur d'entrée.

site de branchement. Il se passe alors un premier réarrangement pour rapprocher les sites d'épissage. Des sous unités s'ajoutent encore afin de former un plus gros complexe, qui sera capable d'encadrer les attaques nucléophiles et les chevauchements jusqu'à la délétion de l'intron et la liaison de 2 exons.

Une remarque intéressante est que les attaques nucléophiles en tant que telles ne consomment pas d'énergie, ce ne sont que des modifications de liaison qui augmentent l'entropie. Par contre toute la machinerie du complexe splicesome, en revanche, consomme énormément d'ATP.

4. Le système de recombinaison Gateway

Le système gateway est une ingénierie moléculaire récente qui permet une haute fidélité et efficacité de clonage. Ce système est composé de 2 réactions de recombinaison au terme desquelles, le transgène d'intérêt est placé dans un plasmide d'expression (Figures 23 et 24)[42]. La première réaction est une réaction d'intégration qui consiste à placer le transgène d'intérêt entre 2 bras de recombinaison d'un « vecteur d'entrée ». Cela peut être réalisé soit par amplification PCR avec des amorces contenant des sites de recombinaison soit par restriction et ligation dans le vecteur d'entrée. Les sites de recombinaison du vecteur d'entrée sont attL1 et attL2. La deuxième réaction est une réaction d'excision, elle consiste à mélanger le vecteur d'entrée avec un vecteur de destination contenant des sites reconnaissant attL1 et attL2, à savoir attR1 et attR2. Ils flanquent une cassette ccdB, toxique pour la bactérie. AttR1 ne peut se recombiner qu'avec attL1 et attR2 ne peut reconnaître qu'attL2. Sous l'action de la LR clonase, la cassette ccdB est échangée avec le transgène du vecteur d'entrée.

5. Le signal d'arrêt de la transcription ou signal de polyadénylation

Il apparaît lors de la transcription, que lorsque la polymérase a dépassé une certaine séquence, elle se détache de l'ADN. Cette séquence est une séquence de polyadénylation. Elle se trouve à la fin du dernier exon. Une fois transcrit, ce signal est reconnu par plusieurs facteurs qui s'y lient, clivent l'ARN et ajoutent des adénosines au bout du transcrit sur 200A de longueur, grâce à la poly A polymérase (PAP). Ensuite, les protéines liant cette extrémité 3' du transcrit se détachent et la PAP arrête l'élongation.

Mais comment la polymérase sait elle qu'après être passée sur le signal de polyadénylation elle peut se détacher de l'ADN ? Il existe 2 hypothèses à ce sujet (figures 25 et 26):

La première soutient qu'après la transcription du signal de poly-adénylation, une RNase serait activée et dégraderait les bases ajoutées après la queue 3', il s'agit du modèle torpille. Cette RNase se trouverait liée à la polymérase jusqu'au passage du signal. La seconde hypothèse présente un modèle pour lequel la polymérase aurait moins d'affinité avec l'ADN une fois passé ce signal et ce serait la raison pour laquelle elle arrête la transcription, il s'agit du modèle allostérique.

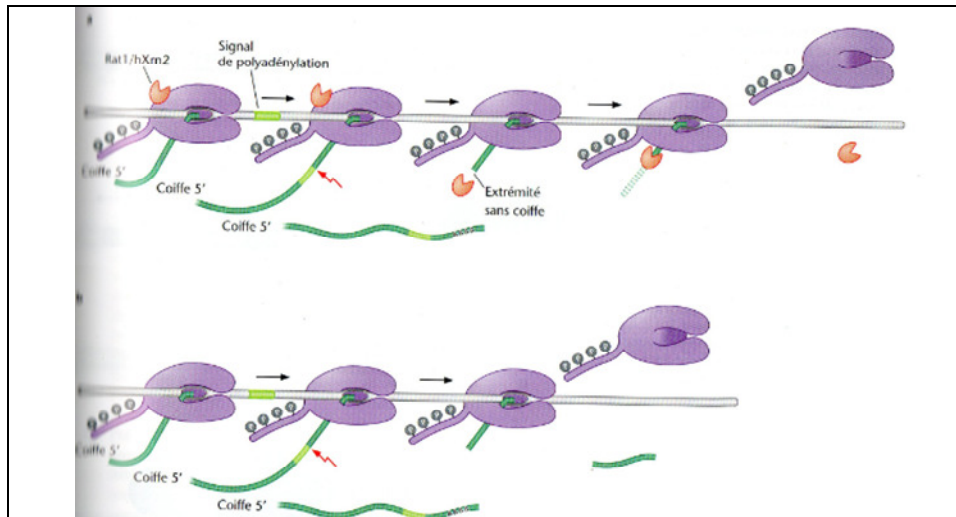


Figure 25: Les 2 hypothèses expliquant le détachement de la polymérase après le signal de polyadénylation. Première hypothèse : une fois que la polymérase dépasse le signal de polyadénylation, une RNase qui y était liée se détache et dégrade le RNA transcrit après la séquence polyA. Deuxième hypothèse, une fois passée au delà du signal, la polymérase perd son affinité pour le brin d'ADN et s'en détache.

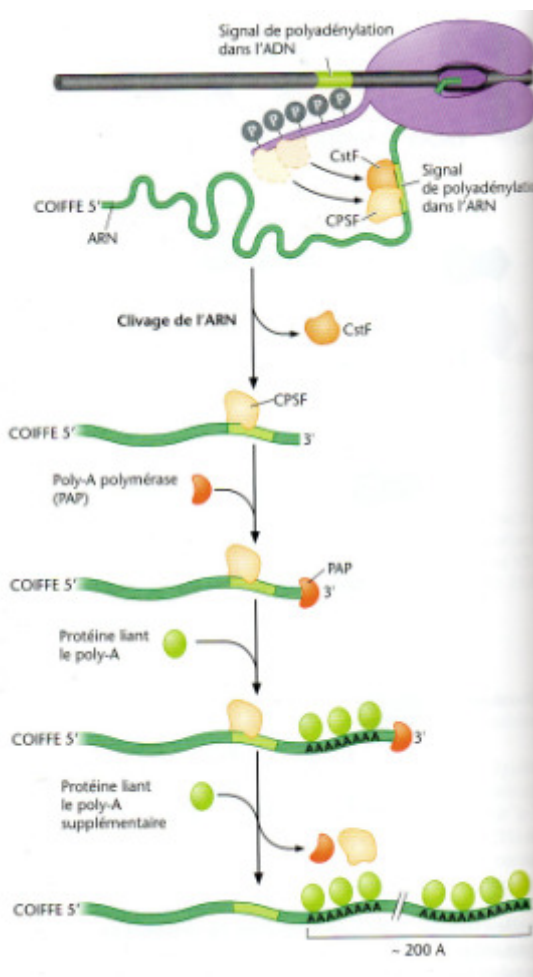


Figure 26: Mécanisme de terminaison de la transcription. Des protéines reconnaissent le signal de polyadénylation sur l'ARN et s'y lient. Certaines clivent l'ARN en aval de ce signal. La poly-A polymérase s'attache à l'extrémité 3' de l'ARN et synthétise la queue polyA d'environ 200 adényles.

Objectif du mémoire

Les gènes MAGE du type I sont des gènes spécifiques des tumeurs et ne sont pas exprimés dans les tissus normaux si ce n'est dans les testicules et parfois dans le placenta et les ovaires. Ils constituent une cible idéale pour l'immunothérapie anti cancéreuse. La fonction des gènes MAGE de type I est encore inconnue mais certaines interactions supportent l'hypothèse selon laquelle ces gènes joueraient un rôle dans le processus de transformation cellulaire. Ou de résistance à la chimiothérapie. L'action de MAGEA2 sur p53 par exemple, fait penser que la protéine pourrait favoriser le développement de tumeurs ou rendre la cellule résistante à certains agents de chimiothérapie. Pour tester cette hypothèse in vivo, nous voulons créer un modèle murin qui exprimera des gènes MAGE dans des tissus sains. Nous pensons que cette expression ectopique pourrait faciliter le développement de tumeurs et/ou la résistance à la chimiothérapie. Les animaux transgéniques seront testés pour leur tendance à développer des cancers par rapports à des animaux normaux. Pour empêcher que la protéine MAGE n'interfère avec le développement, nous avons élaboré une stratégie qui permettra l'expression de Mage de manière tissu-spécifique et inductible. Le caractère conditionnel est apporté par le système Cre/Lox. De plus, nous avons inclus une étiquette (tag) pour suivre l'expression de la protéine Mage. Mais cette étiquette pourrait entraver la fonction de la protéine, c'est pourquoi nous avons prévu un système permettant de l'enlever à la demande. L'objectif du mémoire est de construire les vecteurs de knock-in permettant d'introduire des transgènes MAGE dans le locus Rosa26 par recombinaison en cellules ES. Nous testerons la fonctionnalité de ces vecteurs dans des bactéries exprimant les recombinases Cre et Flp. Ces vecteurs serviront ensuite à produire des clones de cellules ES knock-in destinés à produire des souris chimériques. L'induction du transgène par Cre sera également testée par expression transitoire de Cre dans ces clones.

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

A. ADN et plasmides

1. ADN

◇ MAGEA1 : l'antigène de mélanome d'Homo sapiens, du type I, de la sous famille A (aussi dénommé antigène MZ2-E) mesure 1755pb. Le locus de référence est NM_004988. La séquence codante de l'antigène MAGEA1 débute à la 221^{ème} base et termine à la 1150^{ème}.

2. Les plasmides

◇ pCDNA A1 : ce vecteur contient la séquence de MAGEA1. Le vecteur servira de base à l'amplification PCR qui sortira le MAGE avec les sites de restrictions NsiI ajoutés aux extrémités.

◇ pUC57 : ce vecteur, clonable dans E.Coli, dérive du vecteur pUC19. Il est construit de manière à comprendre 24 sites de restriction uniques dans son site multiple de clonage. Son numéro d'accèsion à GenBank/EMBL est : Y14837. Ce vecteur porte une cassette de résistance à l'ampicilline ainsi que le gène rapporteur LacZ.

◇ pCR®8/GW/TOPO®TA cloning®Kit: ce vecteur mis au point par invitrogen est un vecteur donneur du système gatewayTM (GW). Afin d'introduire aisément le transgène dans pCR8 pour en faire un vecteur d'entrée pour la recombinaison, une réaction de clonage TA est réalisée par une polymérase. Cette réaction est suivie de l'intervention de la topoisomérase qui aboutit à l'introduction de l'insert dans le vecteur pCR8 sans cloage par restriction.

◇ pRosa26DEST : ce vecteur low copy commercialisé par addgene est conçu pour le clonage en système gatewayTM (GW) de fragments d'ADN d'intérêt. Il contient des sites de recombinaison *att* situés de part et d'autre d'une cassette contenant le gène *ccdB* toxique pour certaines souches d'E.Coli, et un gène de résistance à l'ampicilline. Le vecteur porte en outre un gène de résistance à la Néomycine. Il est impliqué dans des réactions BP impliquant l'échange de la cassette contre un fragment d'intérêt bordé des sites *att*. Il est conçu pour s'exprimer à 30°C.

◇ P705-Cre : ce plasmide permet l'expression de la recombinaise Cre. Il est transformé dans une souche de E.coli, contenant un plasmide, porteur d'un marqueur de sélection floxé (ex : gène de résistance pGK-neo). Le promoteur Cre dans p705Cre est activable à 37°C et l'origine de répllication de p705 Cre est thermosensible de sorte que ce plasmide ne se réplique pas à 37°C. Ce plasmide porte un gène de résistance au chloramphénicol.

◇ P705-FLP : ce plasmide permet l'expression de la Flippase. Il est transformé dans une souche de E.coli, contenant un plasmide, porteur d'un marqueur de sélection floxé (ex : gène de résistance pGK-neo).Le promoteur FLP dans p705FLP est activable à 35°C et l'origine de répllication de p705 FLP est thermosensible de sorte que ce plasmide ne se réplique pas à 37°C. Ce plasmide porte un gène de résistance au chloramphénicol.

◇ pGK Cre-puro : ce vecteur est utilisé premièrement car il porte la séquence de la Cre recombinaise. Lors de sa transfection en cellules ES, il permettra l'expression de l'enzyme.

D'autre part, comme il contient une cassette de résistance à la Puromycine, il permettra la sélection par cet antibiotique des cellules qui ont incorporé le vecteur.

B. Les oligonucléotides

Les oligonucléotides proviennent de chez Eurogentec.

Oligonucléotides	Séquence de 5' en 3'
NeoF	5' GAACAAGATGGATTGCACGCAGG 3'
NeoR	5' CTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGC 3'
NsiI-A1-S	5' GGATGCATTCTCTTGAGCAGAG 3'
NsiI-A1-AS	5' TAATGCATTCAGACTCCCTCTT 3'
I-IRES-S	5' GAAACTGGGCTTGTCGAGAC 3'
ODB5	5' CTTTGGCGAGCCTGAGGAG 3'
AB937	5' GCCTGTGCAGGATACACC 3'
bGHAS	5' ACTAGAAGGCACAGTCGAGG 3'
IRES reverse	5'CTTCGGCCAGTAACGTTAGG 3'
GenRosaAS	5'TGGCTCAACAACACTTGGTG 3'
EcoRI-FRT	5' ACTGAATTCTGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGA 3'
EcoRI-A1	5' ACTGAATTCTCAGACTCCCTCTTCCTCCTC 3'
M13F	5' CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC 3'
M13R	5' TCACACAGGAAACAGCTAT 3'
AD1	5' GCATCGCATTGTCTGAGTAG 3'
pCR8 F	5'TGTAAAACGACGGCCAG 3'

C. Milieux de culture

◆ Milieux de culture pour bactéries

	Milieu liquide	Milieu solide
LB (Difco)	10g	10g
Agar	-	8g
Eau milliQ	500ml	500ml

Stériliser 20minutes à 120°C.

◆ Milieux de culture pour cellules

Milieu complet pour MEFS	GMEM 500ml FCS (ES qualified) Sodium pyruvate Acides aminés non-essentiels β Mercapto Péni/Strepto (10000U)	Lonza :Be12-739F Gibco 10% final Invitrogen 100x Invitrogen 100x Gibco 0,1mMfinal 100x
Milieu complet pour cellules ES	Milieu complet+ LIF	10^3 U de Lif/ml de milieu complet

◆ Mitomycine C : Roche, référence : 10 107 409 001. A utiliser à la concentration de 10 μ g/ml.

◇ Puromycine : à utiliser à la concentration de 1µg/ml

D. Tampons et solutions

◇ Lyse alcaline

GTE + RNase	Glucose Tris pH8 EDTA RNase	50mM 25mM 10mM 100ng/ml
NaOH/SDS	NaOH SDS	0.2N 1%
KAc/HAc	KAc 5M Acide acétique glacial H ₂ O	6ml 1.15ml 2.85ml

◇ Electrophorèse

- Bromure d'éthidium	Solution de 2mg/ml H ₂ O	(0.2%)
- Solution d'alourdissement	Xylène cyanol Ficoll Bleu de bromophénol ou méthyl orange	0.25% 15% (0.25%)
- Tampon TAE 50x	Tris-HCl pH 8,0 EDTA Acide acétique glacial Porter à 1L de volume final	40mM 50mM 57,1ml/L

◇ Westernblot

- Tampon PBS 20x :	KH ₂ PO ₄ 2mM Na ₂ HPO ₄ 10mM KCL 2,7mM NaCl 137mM	4g/l 22.98g/l 4g/l 160g/l
- Tampon d'électrophorèse	Tris base Gycine SDS Eau	30g 144g 10g 1L
- Tampon de transfert	Tris base 54mM Glycine 192mM méthanol	3,03g/L 14,4g/L 20%
- PBS+ Tween	PBS Tween	1L 0,1% final

◆ Antibiotiques

Noms	Abréviations	Solution de dissolution	Concentration stock
Ampicilline	Amp	H ₂ O	100mg/ml
Chloramphénicol	Cm	Éthanol 100%	20mg/ml
Spectinomycine	Spect	H ₂ O	100mg/ml
Généticine	Gen = E418	eau	50mg/ml

◆ Traitement des cellules

Tampon de lyse des protéines	Tris HCl	50mM
	NaCl	150mM
	NP40	1%
Tampon de lyse pour ADN	Tris pH8	100mM
	EDTA	5mM
	SDS	0,2%
	NaCl	200mM
	Protéinase K	100µg/ml

E. Techniques relatives à la manipulation d'ADN

1. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La technique de PCR est utilisée pour amplifier rapidement un fragment d'ADN d'intérêt. Les séquences bordant le fragment doivent être connues pour concevoir des amorces oligonucléotidiques (primers). La matrice d'ADN est dénaturée par chauffage en présence d'un excès d'oligonucléotides et de dNTP's. Le mélange est ensuite soumis à une diminution de température (qui dépend de la composition des amorces) pour permettre l'hybridation spécifique des amorces. La séquence comprise entre les deux amorces est amplifiée par une DNA Polymérase thermorésistante qui présente une température optimale de fonctionnement. Le cycle de dénaturation/hybridation/élongation est répété 30 fois. Ce procédé fournit une amplification exponentielle.

Pour l'amplification par la Taq DNA polymérase provenant de l'organisme thermophile *thermus aquaticus*, le mix est le suivant :

Réactifs	Quantité pour 20µl
Tampon Taq DNA polymérase 5x	4µl
Mix dNTP's (2mM)	2µl
Primer sens (10µM)	2µl
Primer antisens (10µM)	2µl
Taq DNA polymérase	0.1µl
Template	30ng
Eau milli Q	Ajuster pour 20µl de volume total

Les cycles de programmes PCR sont constitués d'étapes: dénaturation de la matrice ADN, hybridation des amorces, élongation de la synthèse et élongation finale et terminaison.

La température d'hybridation des amorces se calcule par la formule $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$.

Le temps d'élongation dépend de la longueur du fragment à amplifier. La température de fonctionnement de chaque polymérase est spécifique.

2. Migration sur gel d'électrophorèse

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN dans un champ électrique en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer. La taille des fragments est estimée en comparaison avec une échelle de fragments de longueurs connues. Nous utilisons les marqueurs de poids moléculaires 1Kb (Fermentas) et 100bp (Invitrogen). La révélation d'ADN est réalisée grâce au bromure d'éthidium (BrEtH), composé fluorescent qui rend la double hélice visible sous UVs en s'intercalant entre les bases. La fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille, ainsi qu'à la quantité d'ADN. En connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de poids moléculaire, nous pouvons estimer la quantité d'ADN du fragment en comparant des intensités de fluorescence.

Préparation de la solution d'agarose :

- Peser la quantité d'agarose en fonction du pourcentage final désiré
- Diluer dans le tampon TAE
- faire fondre l'agarose au micro-ondes, agiter régulièrement

Préparation du gel :

- Couler le gel dans la cuve avec 1 μ l de BrEt 1%
- Attendre la solidification quelques minutes
- Charger l'échelle de poids moléculaire ainsi que les échantillons mélangés à la solution d'alourdissement.

3. Restriction d'ADN

Dans un tube Eppendorf et dans la glace, ajouter :

1. X μ l de tampon 10x correspondant à l'enzyme
2. 1 unité d'enzyme de restriction par μ g d'ADN de plasmide
3. X μ l de plasmide
4. Porter jusqu'à un volume final de X μ l avec de l'eau distillée
5. Incuber 2 heures à 37°C.

4. Déphosphorylation d'extrémités de plasmide clivé

1. Ajouter 1 μ l de phosphatase alcaline de veau (CIP) au produit de restriction
2. Incuber 1 heure à 37°C
3. Ajouter 1 μ l d'EDTA 500mM pour neutraliser l'enzyme
4. Incuber 10 minutes à 75°C pour finir l'inactivation
5. Ajouter 1 volume de phénol CIAA, vortexer et centrifuger 15minutes à 14000rpm
6. A la phase aqueuse, ajouter 1 volume de chloroforme, vortexer et centrifuger 15minutes à 14000rpm, récupérer la phase supérieure
7. Précipiter à l'éthanol 100% (2volumes) + 0.1volume de NaAc 3M, vortexer et placer une heure à -20°C
8. Centrifuger 10minutes à 14000rpm
9. Rincer le culot à l'EtOH 70% (une centaine de μ l), vortexer et centrifuger une dizaine de minutes à 14000rpm
10. Sécher le culot et le reprendre dans du TE

5. Remplissage des extrémités 5' protrudantes avec la Klenow DNA polymérase

1. Dans un eppendorf, ajouter
2. 5µl de tampon
3. 1µl de dATP, dCTP, dGTP, dTTP 0.5mM
4. 1µl de Klenow
5. Porter à un volume final de 50µl avec de l'eau distillée
6. Incuber 15 minutes à température ambiante en précipitant à l'éthanol
7. Extraire l'ADN au phénol-chloroforme

6. Rognage des extrémités 3' protrudantes avec la T4DNA Polymerase

La polymérase T4 catalyse la synthèse d'ADN de 5' en 3' en présence d'une matrice d'ADN et d'oligonucléotides et forme des extrémités franches :

1. Dans 20µl d'ADN restreint
2. Ajouter 1µl de chaque dntp 2mM
3. Ajouter 2U de T4 DNA polymerase par µg d'ADN
4. Incuber 15 minutes à 12°C
5. Incuber 10 minutes à 75°C (inactivation de l'enzyme)
6. Ajouter un volume équivalent de TE, pH 7,6
7. Réaliser une extraction au phénol chloroforme et une précipitation à l'éthanol

7. Ligation d'un insert et d'un plasmide linéarisé

1. Le vecteur linéarisé et déphosphorylé
2. L'insert
3. 1µl de DNA T4 ligase (NEB)
4. 2µl de tampon T4 DNA ligase 10x (NEB)
5. Porter à 20µl avec de l'eau
6. Incuber à 16°C de quelques heures à O/N

8. Purification d'ADN après migration sur gel, WIZARD®

Le Wizzard® SV Gel and PCR Clean-Up System permet la purification de fragments d'ADN simple ou double brin. Le principe de ce kit est basé sur la liaison sélective de l'ADN sur une membrane de silice en condition fortement salée. Les contaminants ne sont pas retenus sur la membrane et sont éliminés par lavage. L'ADN est élué en condition de faible salinité.

1. Découper le gel et ajouter un volume de membrane binding solution, faire fondre au bain marie à 55°C
2. Déposer le mélange sur une colonne et laisser 1 minute à température ambiante
3. Centrifuger une minute à 14000rpm
4. Laver avec 700µl de Membrane wash solution
5. Centrifuger une minute à 14000rpm
6. Laver avec 500µl de Membrane wash solution
7. Centrifuger 5 minutes à 14000rpm
8. Transférer la colonne sur un nouveau tube
9. Eluer avec 50µl d'eau stérile

9. Transformation de bactérie par électroporation d'ADN

1. Dans un tube de bactéries électrocompétentes, ajouter 5µl de produit de ligation
2. Transférer les bactéries dans une cuvette à électroporation refroidie dans la glace
3. Appliquer un choc électrique de 5msec à 2300V
4. Ajouter rapidement 450µl de milieu LB liquide
5. Transférer le tout dans un tube Ependorff
6. Incuber 1h (à 1h30) à la température convenant pour la souche et étaler 2 dilutions de bactéries sur 2 boîtes contenant un milieu sélectif approprié
7. Incuber O/N.

10. Recombinaison Gateway

Le système gateway est une ingénierie moléculaire qui permet une haute fidélité et efficacité de clonage. Le processus se déroule en 2 étapes, une réaction d'intégration pour obtenir un vecteur donneur portant la cassette d'intérêt et une réaction d'excision qui place la cassette du vecteur donneur dans un vecteur de destination qui devient un vecteur d'expression.

Le vecteur donneur est une construction clé qui permet d'insérer une cassette flanquée de sites attL1 et attL2 dans n'importe quel plasmide de destination portant des sites correspondants. Notre cassette a été intégrée dans le vecteur donneur pCR8 par TA clonage.

La réaction d'excision consiste à mélanger le vecteur donneur avec un vecteur accepteur comportant les sites attR1 et attR2 encadrant une cassette ccdB. Le but est de transférer la cassette du premier vers le deuxième vecteur. Le site attL1 se recombine avec attR1 et attL2 se recombine avec attR2. Suite à cette réaction catalysée par un mélange de facteurs et enzymes (Int, IHF, Xis et l'intégrase) appelé LR clonase, le mélange est transformé en bactéries.

La réaction peut donner lieu à 4 types de plasmides dans les bactéries. Il peut premièrement s'agir du plasmide donneur de départ portant le transgène, avec une résistance à un antibiotique A. Il peut s'agir également du plasmide receveur qui comporte le ccdB et une résistance à un antibiotique B. Enfin il peut s'agir du plasmide donneur avec l'antibiotique A et qui a reçu la cassette ccdB en échange du DNA ou alors le plasmide d'expression attendu. Afin de ne sélectionner que les bactéries ayant incorporé ce dernier plasmide, il suffit d'étaler les bactéries électroporées sur un milieu contenant l'antibiotique B. Dans ce cas, les bactéries portant la résistance A ou la cassette ccdB ne survivent pas, il ne reste que le vecteur d'expression contenant la cassette d'intérêt.

a. La réaction d'excision

La recombinaison qui se produit entre le vecteur d'entrée pCR8-FRT-IRES-HA-A1 ou pCR8-A1 et le vecteur de destination pRosa26DEST et est réalisé par l'enzyme clonase.

- a. 1 à 7µl de vecteur d'entrée (50-150ng),
- b. 1µl du vecteur de destination (150ng/µl)
- c. Porter à un volume de 8µl avec du tampon TE pH8
- d. Ajouter 2µl de la LR clonase refroidie 2 minutes sur glace et vortexée au préalable
- e. Vortexer le tube
- f. Incuber le mélange à 25°C durant 1heure
- g. Ajouter 1µl de Protéinase K pour terminer la réaction et incuber 10minutes à 37°C

b. La transformation thermique

Transformer 1µl du mélange dans 50µl de cellules résistantes aux phages Ti Shot®OmniMAX™ 2 par choc thermique.

11. Culture de bactéries

1. Dans un Falcon stérile, ajouter 5 ml de milieu LB et 5µl de l'antibiotique adéquat 100mg/ml
- 2.ensemencer ce milieu avec une colonie isolée de bactéries
3. Incuber O/N, sous agitation, à la température convenant à la croissance de la souche

12. Isolation d'ADN plasmidique par lyse alcaline

1. Ensemencer les bactéries dans 5ml de milieu LB contenant un antibiotique et incubé O/N à la bonne température
2. Centrifuger 10 minutes à 2500rpm afin de culoter les bactéries
3. Décanter et resuspendre les bactéries dans 300µl de GTE
4. Vortexer et laisser 10 minutes à RT
5. Ajouter 450µl de NaOH/SDS pour lyser les bactéries
6. Retourner plusieurs fois le tube et laisser 10minutes dans la glace
7. Ajouter 360µl de KAc/HA qui précipite l'ADN chromosomique et retourner à nouveau plusieurs fois le tube
8. Centrifuger 10 minutes à 14000rpm pour culoter les débris cellulaires
9. Transférer le surnageant dans un nouveau tube et y ajouter un volume égal de phénol-chloroforme
10. Vortexer et centrifuger 15 minutes à 14000rpm
11. Reprendre la phase supérieure et y ajouter un volume de chloroforme
12. Vortexer et centrifuger 15 minutes à 14000rpm
13. Reprendre la phase supérieure
14. Ajouter 2volumes d'éthanol 100% et laisser 10 minutes à température ambiante
15. Vortexer et centrifuger 15minutes à 14000rpm puis décanter
16. Ajouter 500µl d'éthanol 70% pour rincer le culot
17. Vortexer et centrifuger à nouveau 10minutes à 14000rpm
18. Décanter et laisser sécher le culot
19. Reprendre le culot dans du TE

F. Techniques relatives à la manipulation de bactéries

1. Préparation de bactéries électrocompétentes

1. Ensemencer des bactéries contenant le plasmide d'intérêt dans du milieu LB avec l'antibiotique adéquat
2. Incuber O/N à 30°C
3. Diluer la culture bactérienne de manière à obtenir une DO de 0,1 à 600nm
4. Réincuber les bactéries à 30°C avec agitation jusqu'à obtention d'une DO entre 0,5 et 0,7 pour que les bactéries soient en phase exponentielle de croissance
5. Refroidir les bactéries dans la glace 10 minutes
6. Centrifuger 20 minutes à 4 200 rpm à 2°C
7. Décanter et resuspendre le culot dans de l'eau stérile froide
8. Centrifuger 20 minutes à 4 200 rpm
9. Décanter et resuspendre à nouveau le culot dans de l'eau stérile froide
10. Recentrifuger 20 minutes à 4 200 rpm à 2°C
11. Décanter immédiatement et resuspendre le culot dans le liquide résiduel
12. Ajouter 40ml de glycérol 10% à froid et mélanger.
13. Centrifuger à 2 800 rpm 10 minutes à 2°C

14. Décanter
15. Reprendre le culot dans un volume égal e glycérol 10% froid
16. Aliquoter en différents tubes de 100µl
17. Stocker à -70°C

2. Activation de l'expression de la recombinaise Cre

1. Transformer les bactéries compétentes portant le plasmide 705Cre avec le plasmide portant le transgène d'intérêt
2. Ajouter 1ml de LB dans le tube et incubé 1h30 à 30°C
3. Etaler les cellules sur des boîtes LB chloramphénicol (15µg/ml) et ampicilline
4. Incuber à 30°C pendant plus de 24heures
5. Le lendemain, piquer une colonie et la faire pousser dans 1ml de LB avec du chloramphénicol durant 2-3heures
6. Changer la température à 37°C et laisser pousser overnight
7. Préparer l'ADN des bactéries et réaliser des restrictions pour vérifier la délétion de la cassette floxée

3. Activation de l'expression de la Flippase

1. Transformer les bactéries compétentes portant le plasmide 705FLP avec le plasmide portant le transgène d'intérêt
2. Ajouter 1ml de LB dans le tube et incubé 1h30 à 30°C
3. Etaler les cellules sur des boîtes LB chloramphénicol (15µg/ml) et ampicilline
4. Incuber à 30°C pendant plus de 24heures
5. Le lendemain, piquer une colonie et la faire pousser dans 1ml de LB avec du chloramphénicol durant 2-3heures
6. Changer la température à 40°C pendant 20 minutes
7. Changer la température à 35°C toute la nuit
8. Préparer l'ADN des bactéries et réaliser des restrictions pour vérifier la délétion de la cassette floxée

G. Techniques relatives à la manipulation de cellules

1. Culture de cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires se cultivent sur des fibroblastes murins embryonnaires sur boîtes préalablement gélatinées.

- Recouvrir la boîte de culture ou les puits avec de la gélatine 0.1% durant 30 minutes à RT
- Aspirer la gélatine et semer des MEFs traitées à la Mytomicine C
- Incuber O/N à 37°C dans 5% CO₂
- Dégeler rapidement des cellules ES
- Incuber à 37°C, 5% CO₂
- Changer régulièrement le milieu avant qu'il ne soit épuisé (de couleur orangée)
- Passer les cellules lorsque celles-ci sont à confluence :
- Rincer les cellules par un petit volume de PBS
- Trypsiniser avec de la TVP (10x) et placer 5minutes à 37°C
- Détacher les cellules en secouant doucement et en frappant sur la boîte
- Neutraliser la TVP avec 1ml de milieu complet et resuspendre en cellules

- Réensemencer

Les cellules ES peuvent être congelées dans du milieu complet + 10% DMSO.

2. Transformation de cellules par choc électrique

- Trypsiniser les cellules ES cultivée sur une boîte de culture T75
- Laver les cellules par un petit volume de PBS
- Ajouter 3ml de TVP (10x) par T75
- Incuber 5 minutes à 37°C
- Détacher les cellules
- Ajouter 3 ml de milieu complet et resuspendre en cellules simples avec une pipette de 10ml
- Centrifuger les cellules pendant 5 minutes à 1200 rpm à RT
- Resuspendre le culot dans 300µl de PBS
- Linéariser le vecteur
- Extraire l'ADN au phénol/ Chloroform et Chloroform
- Précipiter à l'Ethanol
- Sécher le culot et redissoudre dans 300µl de PBS
- Tester la concentration d'ADN sur gels d'agarose ou mesure de la densité optique à 260nm
- Mélanger les cellules avec l'ADN ($\approx 75-100\mu\text{g}$) $\rightarrow \pm 600\mu\text{l}$
- Laisser 5' à RT
- Transférer le mélange dans une cuvette Biorad de 0,4cm
- Electroporer les cellules avec un Electroporateur Biorad (Biorad gene pulser model 1652078) :
Voltage 0,8kV
Capacitance : 4µF
- Laisser 5' à RT
- Suspender les cellules dans du milieu pour cellules ES et semer sur Petri (10cm) contenant des MEFs MMC néo
- Incuber O/N à 37°C / 5% CO₂

3. Sélection sur milieu contenant de la généticine

- Remplacer le milieu nutritif des cellules ES par un milieu sélectif contenant un antibiotique. Par exemple : G418 (généticine): 300µg/ml
- Nourrir les cellules avec du milieu sélectif tous les jours pendant 6 à 8 jours
- Après 6 à 8 jours, des colonies individuelles peuvent être observées

4. Repiquage des colonies sélectionnées

- Préparer une plaque 96 puits (fond en U) avec 15µl de PBS par puits en utilisant une pipette multi-canaux
- Piquer des séries de 48 colonies avec un tips très fin et transférer dans la plaque 96 puits
- Ajouter 15µl de TVP 10x dans chaque puits et incuber 10 minutes à 37°C
- Ajouter 100µl de milieu et resuspendre
- Transférer les colonies trypanisées dans une deuxième plaque 96 puits couverte de MEFs et 100µM de milieu pour cellules ES + LIF
- Cultiver les cellules O/N et rafraîchir régulièrement le milieu (200µl)
- Cultiver les cellules à confluence

- Laver les cellules au PBS et trypsiniser avec 50µl de TVP 10x (5' à 37°C)
- Ajouter 250µl de milieu complet et resuspendre
- Transférer deux portions de 100µl de cellules dans des plaques 96 puits couvertes de MEFs traitées à la MMC contenant 100µl de milieu
- Une plaque est cultivée à semi-confluence (2-3 jours) et préparée pour la congélation
- L'autre plaque est cultivée aussi longtemps que possible pour en isoler l'ADN

5. Congélation des cellules

- Préparer du milieu complet (sans LIF) avec 20% de DMSO à 0°C
- Laver les cellules au PBS et trypsiniser avec 30µl de TVP 10x
- Ajouter 75µl de milieu complet et resuspendre doucement
- Ajouter 100µl de milieu plus 20% de DMSO et resuspendre encore doucement
- Envelopper la plaque dans une serviette en papier et placer la boîte dans une frissette à -80°C (les cellules peuvent être stockées pour au moins 6 semaines)

6. Purification d'ADN génomique

- Laver 2x les cellules avec du PBS
- Ajouter 150µl de tampon de lyse contenant 100µg de protéinase K
- Incuber au moins 2 heures à 55°C
- Transférer le lysat dans des tubes eppendorf contenant 150µl isopropanol 100%
- Centrifuger
- Rincer à l'Éthanol 70%, sécher à l'air
- Dissoudre l'ADN dans 100µl de TE

7. Western blot

1) Préparation des protéines

Cultiver les cellules jusqu'à confluence dans une plaque 6 puits, ensuite, les rincer 2x au tampon PBS. Ajouter 150µl tampon de lyse NP40 + IP et racler les cellules. Récupérer le lysat dans un eppendorf et centrifuger pour se débarrasser des membranes à 4°C 10minutes à 10000rpm. Les protéines se trouvent dans le surnageant.

2) Dosage des protéines

Pour doser les protéines par mesure de Densité Optique, on réalise au préalable une courbe d'étalonnage avec des dilutions de BSA avec le kit :Pierce® BCA Protein Assay Kit. Ensuite, mesurer les DO de 2 dilutions de l'extrait protéique et reporter les valeurs de DO des extraits pour trouver les quantités de protéines.

3) Les gels de running et stacking

Le pourcentage d'acrylamide est inversement proportionnel à la taille de la protéine.

Running gel	Acrylamide 40% Tris/HCl 1.5M pH8.8 SDS 10% APS 10% TEMED H ₂ O	25% du volume total 1% du volume total 0.5% du volume total 0.1% du volume total Jusqu'au volume du gel
Stacking gel	Acrylamide 40% Tris/HCl 1.5M pH6.8 SDS 10% APS 10% TEMED H ₂ O	25% du volume total 1% du volume total 0.5% du volume total 0.1% du volume total Jusqu'au volume du gel

4) Electrophorèse

Dénaturer les protéines 5minutes à 100°C et charger les protéines (30ul) et le ladder 5ul sur le gel. Remplir la cuve de tampon de laehmi et brancher sur la source de tension.

Régler le voltage et l'ampérage selon le mode de migration souhaitée.

5) Transfert des protéines sur la membrane

Equilibrer le gel dans le tampon de transfert sous agitation durant 30minutes. Réaliser le montage adéquat au support et régler le voltage à 100 volts. Après environ 1h, les protéines se sont imprimées sur la membrane PVDF.

6) Bloquer les sites non spécifiques 30minutes dans 5% de PBS-Tween + lait

7) Hybridation de l'anticorps primaire puis secondaire

- Hybrider la membrane avec l'anticorps primaire à 4°C
- Laver 3x la membrane durant 15minutes dans du PBS-Tween
- Hybrider l'anticorps secondaire 60minutes à température ambiante
- Laver 3x la membrane durant 15minutes dans du PBS-Tween
- Rincer plusieurs fois et révéler la membrane

Résultats

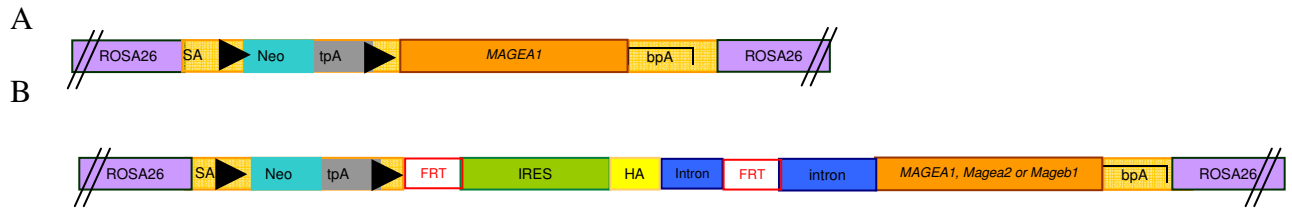


Figure II.1 : (A) **Vecteur de knock-in permettant l'obtention d'une souris exprimant le gène MAGEA1 humain de manière conditionnelle.** Les flèches représentent les sites Lox. Ceux-ci entourent une cassette qui arrête la polyadénylation, ainsi qu'une séquence de résistance à la néomycine (NéoR). (B) **Vecteur de knock-in permettant l'obtention d'une souris exprimant les gènes MAGEA1 humain, Magea2 ou Mageb1 murins de manière conditionnelle.** Le HA est une étiquette qui sera fusionnée à la protéine. Il se trouve entre des sites FRT recombinables sous l'action de la flippase. Un Ires a été introduit derrière le premier site. Les flèches représentent les sites Lox. Ceux-ci encadrent une cassette de résistance à la néomycine et un signal de polyadénylation. En mauve sont représentés les bras d'homologie avec le locus Rosa26.

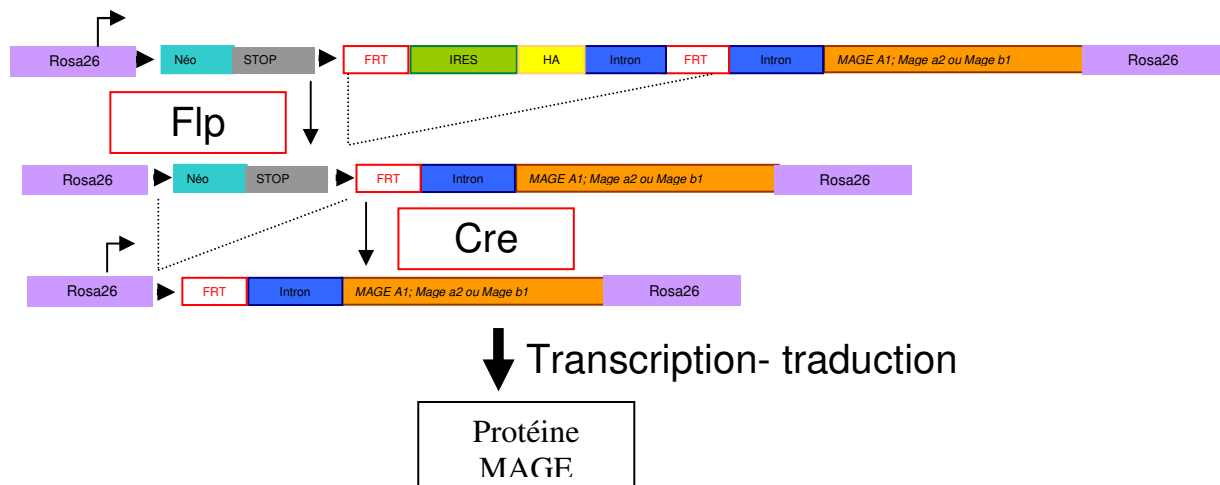


Figure II.2 : **Représentation schématique des événements de recombinaison permettant l'expression de la protéine MAGE native.** Sous l'action de la Flippase, les sites FRT recombinent et le HA est délété. Ensuite, la recombinaison Cre recombine les sites lox, ce qui délète le signal d'arrêt de la transcription et permet l'expression du transgène.

Résultats

A. Stratégie élaborée dans le but d'obtenir des souris exprimant MAGEA1 de manière conditionnelle

Dans le but d'étudier les conséquences d'une expression ectopique de gènes *MAGE*, nous avons entrepris de construire des lignées de souris exprimant *MAGEA1*, *Magea2* ou *Mageb1*, de manière inductible par la Cre recombinase. Ce système a déjà été utilisé et ne présente que peu d'expression basale. Ces lignées devraient permettre, après croisements avec différentes lignées de souris transgéniques Cre, de provoquer l'expression ectopique du gène *MAGE* dans différents tissus. L'apparition éventuelle de tumeurs dans ces tissus sera ensuite évaluée. Nous avons choisis le *MAGEA1* car il est l'archétype des gènes *MAGE* de type I, le *Magea2* murin car il est le plus proche des gènes humains de type I et le gène murin *Mageb1* car ce gène de type I est exprimé dans les tumeurs de souris.

Pour aboutir à cela, nous avons entrepris la construction de 2 transgènes en parallèle (figure II.1 a et b). L'un pour l'expression de *MAGEA1* inductible grâce à l'utilisation du système Cre/Lox (a) et l'autre pour l'expression inductible de la protéine *MAGEA1*, *Magea2* ou *Mageb1* fusionnée à une étiquette amovible (b).

Ces transgènes ont été (ou seront) introduits dans le génome des cellules ES de souris. Plus précisément, les transgènes ont été insérés par double recombinaison homologue (knock-in) en aval du promoteur ubiquiste Rosa26. Le locus Rosa26 est connu pour permettre une insertion sans que la souris ne subisse de conséquences phénotypiques liées à l'insertion elle-même. L'expression du transgène est rendue inductible par la présence, entre le promoteur Rosa26 et le gène *MAGE*, d'une cassette STOP flanquée de sites Lox. Cette cassette est constituée d'un gène de résistance à la néomycine pourvu de 3 signaux de polyadénylation. Le gène *Mage* n'est exprimé que si cette cassette a été excisée par la recombinase Cre.

Une construction d'un transgène *MAGEA1* semblable à la construction II.1.a a déjà été entreprise précédemment au laboratoire. Cependant, nous avons observé une délétion de 2 des 3 signaux de polyadénylation dans les cellules ES. Ces cellules ES exprimaient *MAGEA1* de manière constitutive probablement à cause de la délétion. Des souris chimériques ont été obtenues avec ces cellules ES. Ces souris se sont révélées incapables de transmettre le transgène à leur descendance alors qu'elles transmettaient l'allèle non recombiné (sauvage) de Rosa26. Il est probable que cette non-transmission soit liée à l'expression de *MAGEA1*. Cette expression pourrait soit être incompatible avec la spermatogenèse (après la première division méiotique) soit être incompatible avec le développement des embryons transgéniques. Quoiqu'il en soit, l'expression constitutive de *MAGEA1* semble incompatible avec le développement et nous a empêchés d'obtenir des souris transgéniques *MAGEA1*. Nous avons donc entrepris de construire de nouvelles lignées de cellules ES contenant un transgène *MAGEA1* authentiquement inductible (construction II.1.a). Outre le transgène *MAGEA1*, nous avons entrepris de construire des transgènes de gènes *Mage* de type I de souris (construction II.1.b). La raison de ce choix est qu'il est possible que la protéine humaine *MAGEA1* ne fonctionne pas normalement dans un environnement cellulaire de souris. En effet, les protéines *MAGE* de type I ne sont que peu conservées entre l'homme et la souris. La protéine *MAGE* de type I la plus conservée chez la souris est *Magea2*, avec 80% d'acides aminés identiques. Parmi les gènes *MAGE* murins de type I, notre choix s'est porté sur *Magea2* et *Mageb1*. *Magea2* en raison de sa conservation plus importante, *Mageb1* car il est

connu que son gène est exprimé dans des tumeurs de souris et que le laboratoire a entrepris la production de souris déficientes en cette protéine.

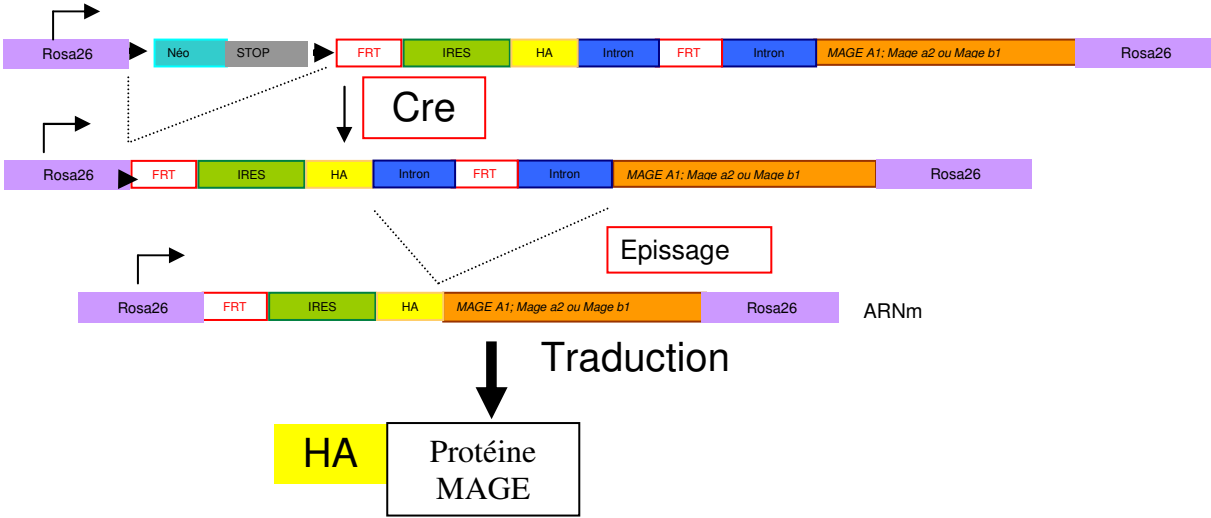


Figure II.3 : Représentation schématique des événements de recombinaison permettant l'expression de la protéine MAGE étiquetée. La transcription du transgène est possible après que la recombinaise Cre aie délété la cassette STOP. L'épissage qui se produit durant la maturation de l'ARN fera disparaître l'intron contenant le 2^{ème} site FRT. Le produit de la traduction sera une protéine MAGE étiquetée par HA.

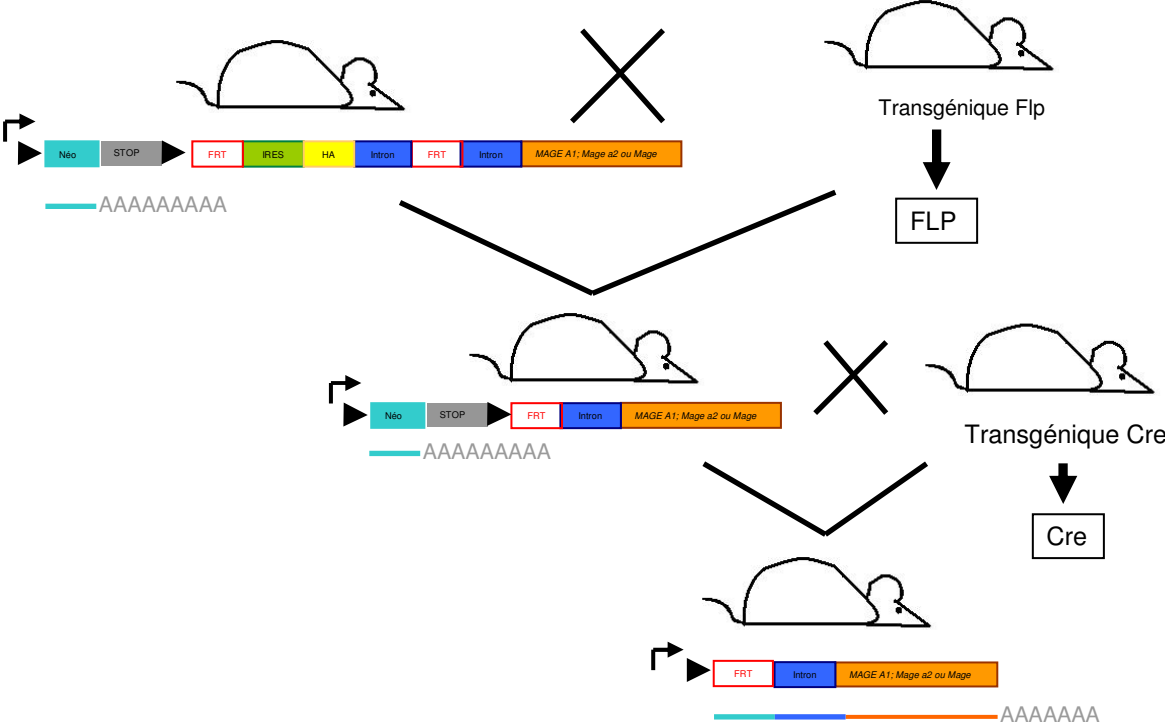


Figure II.4: Représentation schématique des croisements à réaliser pour obtenir une souris exprimant la protéine MAGEA native. La souris transgénique sera d'abord croisée avec une souris exprimant la recombinaise FLP de manière ubiquiste ou spécifique à la lignée germinale) afin d'obtenir des souris de génération F1 dont le HA est excisé. Ensuite la souris de la génération F1 sera croisée avec une souris exprimant la recombinaise Cre (de manière ubiquiste ou tissu spécifique). Nous obtiendrons des souris de génération F2 dans lesquelles la cassette stop est excisée et l'expression du transgène activée.

Il est important de pouvoir suivre l'expression de la protéine Mage spécifié par le transgène. Comme nous ne disposons pas d'anticorps spécifique contre les protéines Magea2 et Mageb1, nous avons choisi de marquer ces protéines par une étiquette HA reconnue par des anticorps disponibles. Cette étiquette peptidique est spécifiée par une courte séquence mise en fusion du côté N-terminal des protéines Mage.

Comme il est possible que la présence de l'étiquette interfère avec la fonction des protéines Mage, nous avons imaginé une manière de pouvoir enlever cette étiquette à la demande, en utilisant le système de recombinaison FRT/FLP. L'étiquette est spécifiée par le premier exon du transgène qui est entouré de séquences FRT de manière à pouvoir être excisé par FLP. Les séquences FRT contiennent 2 répétitions en ordre inverse de 13pb séparés par une séquence de 8pb. Il est donc probable qu'elles forment une structure secondaire relativement stable au niveau de l'ARN. Cette structure pourrait constituer un obstacle pour le ribosome et entraver la traduction. Pour prévenir ce possible effet inhibiteur du site FRT 5', nous avons choisi d'insérer une séquence IRES du côté 3' de ce site FRT. De cette manière, même si le site FRT entrave le passage du ribosome, la protéine MAGE devrait être traduite grâce au recrutement interne du ribosome.

Pour permettre l'expression de la protéine MAGEA native (non étiquetée), le transgène sera soumis à l'action de FLP. Cette recombinaison délète l'étiquette HA et l'IRES. La recombinase Cre peut ensuite induire l'expression du transgène (voir Figure II.2). Pour obtenir des protéines MAGEA étiquetées, seul un évènement de recombinaison des sites loxP est nécessaire (Figure II.3).

La construction II.1.b n'a été réalisée pour l'instant qu'avec MAGEA1 car nous disposons d'un anticorps dirigé contre ses protéines. Cette construction permettra de vérifier le fonctionnement du système FRT/FLP qui délète le tag sans lequel les protéines Magea2 et Mageb1 ne peuvent être révélées.

La figure II.4 montre les différents croisements qui seront entrepris en vue d'obtenir une souris exprimant des protéines non-étiquetées.

Etant donné les difficultés rencontrées par la méthode de restrictions-ligations pour l'assemblage des constructions, nous avons opté pour la stratégie de clonage par recombinaison Gateway^R.

Au cours de ce mémoire, nous avons construit les vecteurs d'expression conditionnelle de MAGEA1, activable par le système Cre/Lox et dont les protéines peuvent être pourvues ou non d'une étiquette HA amovible. Voici les étapes d'assemblage des transgènes (construction b).

B. Résultats

1. Obtention d'une séquence comportant les sites FRT et la séquence HA

Afin d'obtenir la construction qui sera introduite dans les cellules ES, une séquence de 293pb (figure II.5) a été synthétisée par la firme Eurogentec. Cette séquence contient de 5' en 3' : un site FRT, une séquence spécifiant l'étiquette HA et un intron dans lequel se trouve un site FRT. Cette séquence fournie est clonée dans le site EcoRI du plasmide pUC57. Nous appellerons ce plasmide pUC57-FRT-HA (Annexe 1). Il contient également des sites uniques de restriction qui permettront les clonages de l'IRES et du gène MAGE. Pour introduire la

séquence IRES après un site FRT, des sites SacII et BstXI ont été ajoutés. Ils se trouvent après

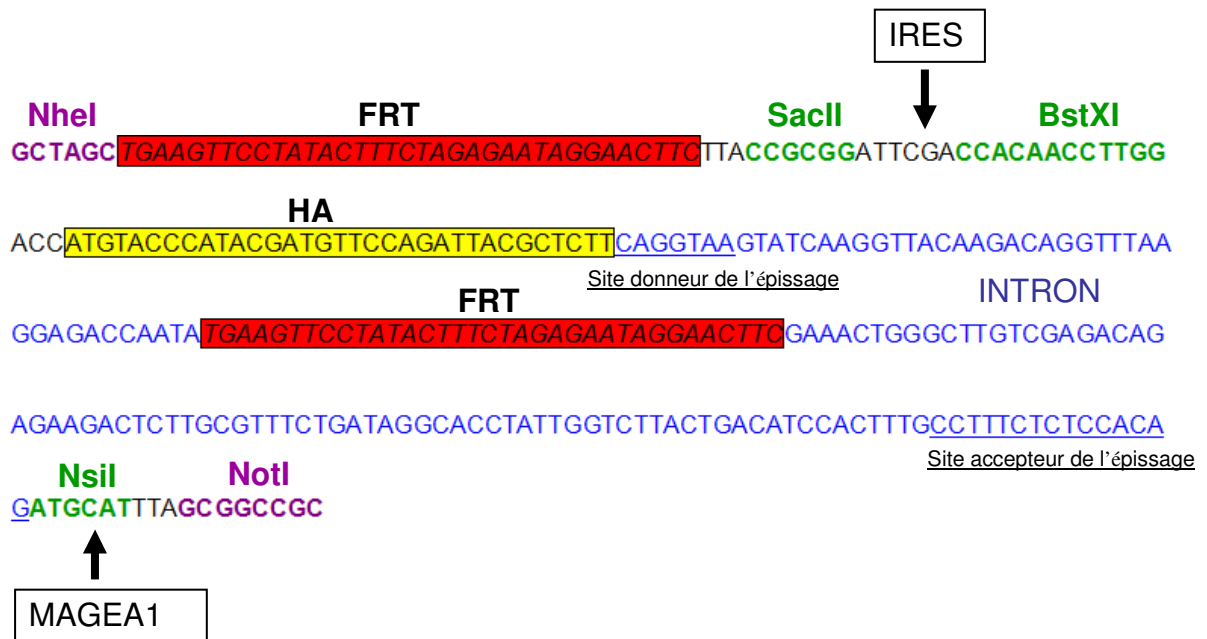


Figure II.5 : La séquence de 293pb a été synthétisée (Eurogentec) et insérée dans le site EcoRI de pUC57. Elle contient de 5' en 3' un site FRT, un HA et un intron dans lequel se trouve un 2^{ème} site FRT. Les sites SacII et BstXI servent au clonage orienté de la séquence IRES. Le site NsiI sert au clonage de la séquence du gène MAGEA.

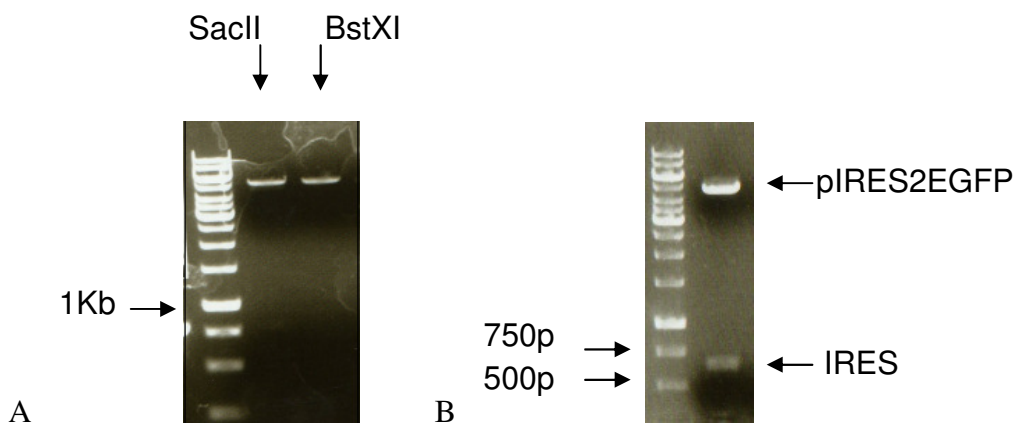


Figure II.6 : Photographie sous UV après électrophorèse en gel d'agarose de : (A) pIRES2EGFP linéarisé par SacII (piste 1) et par BstXI (Piste2). (B) pIRES2EGFP digéré par SacII et BstXI. La bande inférieure, de 584pb correspond à la séquence IRES. 1Kb = le marqueur de poids moléculaire.

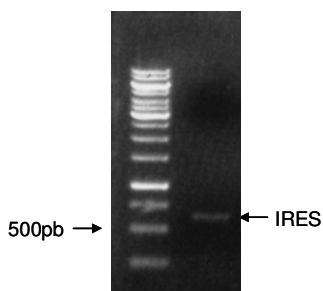


Figure II.7 : Photographie après électrophorèse en gel d'agarose de la séquence IRES purifiée à partir du gel figure II.6B. 1Kb = le marqueur de poids moléculaire.

le premier FRT et avant le HA et permettent l'insertion de la séquence IRES de manière orientée. (Un site SacII est présent dans la séquence du gène MAGEA1, c'est pourquoi le clonage de l'IRES devait avoir lieu en premier). Un site NsiI a été inséré après l'intron pour permettre l'insertion du gène MAGEA1. La stratégie globale de l'assemblage de la construction est représentée dans l'annexe 1.

2. Insertion de la séquence IRES en aval du premier site FRT

Nous disposons au laboratoire du vecteur pIRES2EGFP. La séquence IRES (Internal Ribosome Entry Site) d'origine virale (encephalomyocarditis virus, ECMV) en a été extraite grâce aux sites SacII et BstXI (II.6 a et b). Les produits de cette digestion ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose et la bande de 584pb correspondant au fragment IRES a été purifiée à partir du gel (Figure II.7). Ce fragment a été ligué avec le vecteur pUC57-FRT-HA préalablement linéarisé par SacII et BstXI (figure II.8). L'insertion a lieu en amont du HA et en aval du 1^{er} FRT. Des bactéries ont été transformées par le produit de cette ligation et cultivées sur un milieu contenant de l'ampicilline de manière à sélectionner les transformants. Afin d'identifier les clones résistants à l'ampicilline contenant le plasmide voulu (c'est-à-dire pUC57-FRT-HA avec l'IRES), nous avons criblé les colonies par PCR et par analyse de restriction. La PCR a été réalisée avec les amorces M13F et M13R, celles-ci s'hybrident sur le vecteur, de chaque côté du MCS (Annexe 2) (Figure II.9). Une restriction diagnostique a été réalisée au moyen des enzymes SacII et BstXI pour vérifier la présence de la séquence de l'IRES (figure II.10). Plusieurs clones avaient correctement incorporé la séquence. L'intégrité du plasmide a aussi été vérifiée par séquençage à l'aide d'amorces présentes sur le pUC57 : M13F et M13R. Le séquençage a mis en évidence une correcte reformation des sites SacII et BstXI ce qui atteste de la correcte ligation. Le plasmide recircularisé est appelé pUC57-FRT-IRES-HA dont la taille est de 3592pb.

3. Insertion des gènes MAGE derrière l'intron contenant le second site FRT

La partie codante de MAGEA1 a été amplifiée par PCR en utilisant comme matrice le plasmide pcDNA1-A1 contenant l'ADN de MAGEA1 (Figure II.11). Des amorces PCR ont été dessinées spécialement pour s'hybrider aux extrémités de la partie codante tout en ajoutant des sites de restrictions NsiI : NsiI-A1-S et NsiI-A1-AS (voir annexe 3). L'amplicon a été digéré par NsiI ainsi que pUC57-FRT-IRES-HA (Figure II.12). Avant la ligation, le vecteur a été déphosphorylé pour éviter qu'il ne se circularise sur lui même.

Après ligation et électroporation dans les bactéries, les clones Ap^R ont été criblés par PCR au moyen de M13F et M13R (Figure II.13).. Un clone positif a été identifié (il a produit un amplicon de 1.8Kb correspondant à la cassette FRT-HA-IRES-A1) Une restriction diagnostique a été effectuée par l'enzyme NsiI et a montré la présence du gène MAGE dans le plasmide pUC57-FRT-IRES-HA-A1 (figure II.14).

La partie codante des gènes MAGE excédant 900pb, leur amplification PCR, bien que réalisée par une polymérase de haute fidélité, pouvait introduire des mutations ponctuelles. Nous avons donc séquencé ce fragment pour vérifier qu'aucune mutation n'avait été introduite.

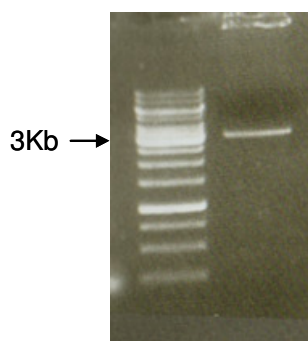


Figure II.8 : Photographie après électrophorèse en gel d'agarose de la restriction de pUC57-FRT-HA par SacII et BstXI. Le plasmide est correctement linéarisé par chacune des enzymes. La bande attendue est de 3000pb. 1Kb = le marqueur de poids moléculaire.

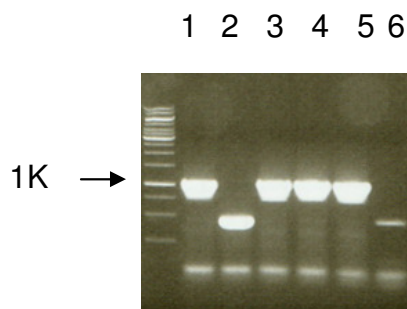


Figure II.9 : Photographie après migration en gel d'agarose du produit de la PCR de criblage des clones obtenus après l'électroporation de la ligation de pUC-FRT-HA avec l'IRES. Les amorces utilisées sont M13F et M13R. Les pistes 1, 3, 4 et 5 présentent une bande à 1Kb ce qui indique que ces clones ont intégré la séquence IRES.

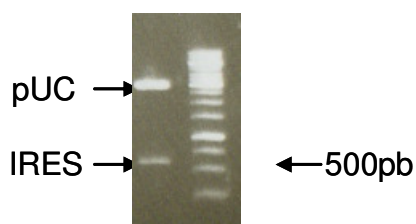


Figure II.10 : Photographie après électrophorèse sur gel d'agarose obtenue suite à la restriction diagnostique du vecteur pUC57-FRT-IRES-HA avec le couple SacII et BstXI. La bande de 584pb correspond à la séquence IRES.

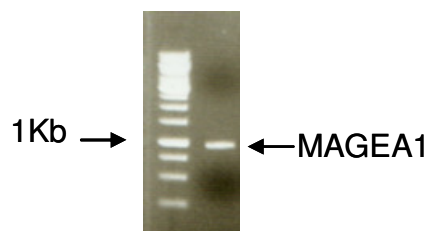


Figure II.11 : Photographie sous UV après électrophorèse en gel d'agarose de l'amplification par PCR de la séquence codante de MAGEA1 à partir du vecteur pCDNAI-A1. La bande observée a la taille attendue de 0.9Kb du gène MAGEA1. Les oligonucléotides utilisés sont NsiI-A1-S et NsiI-A1-AS.

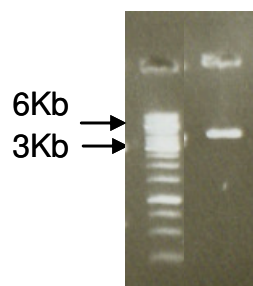


Figure II.12 : Photographie après électrophorèse en gel d'agarose montrant la linéarisation de pUC57-FRT-IRES-HA par NsiI.

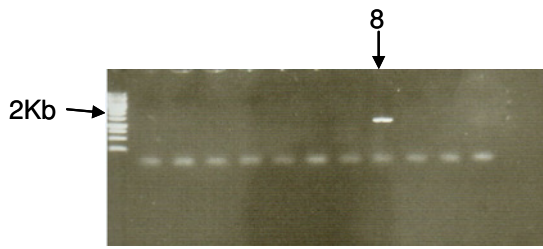


Figure II.13 : Photographie du gel obtenu après migration électrophorétique du résultat du criblage par PCR des clones pUC57- FRT-IRES-HA-A1. Les amorces utilisées sont M13F et M13R. L'amplicon attendu à la taille de 1.8kb.

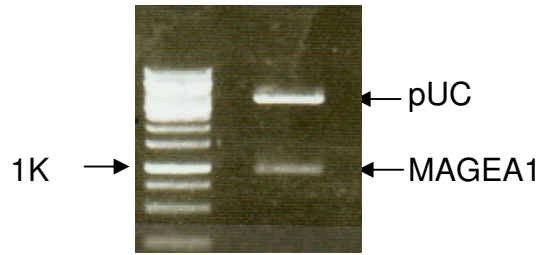


Figure II.14 : Photographie après électrophorèse en gel d'agarose de la restriction diagnostique de pUC57-FRT-IRES-HA-A1 par NsiI. La bande de 900pb correspond au fragment de MAGEA1.

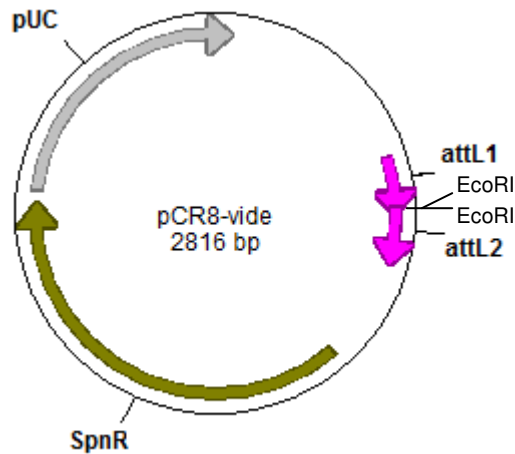


Figure II. 15 : **Représentation schématique du vecteur pCR8 vide.** Il s'agit d'un vecteur d'entrée du système de recombinaison Gateway™. Il comprend des sites attL1 et attL2 permettant la recombinaison avec les sites attR1 et attR2 du vecteur de destination.

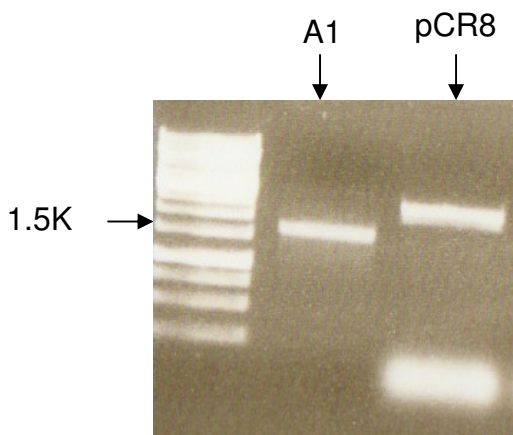


Figure II.16 : Photographie après électrophorèse en gel d'agarose de l'échelle de poids moléculaire (piste 1), de la purification Wizard de la séquence codante de MAGEA1 (A1) récupéré sur gel suite à la restriction de pcDNA1-A1 par EcoRI (piste 2). La bande correspondant à MAGEA1 à une taille de 1.5Kb. Et en piste 3 le produit de la restriction du vecteur pCR8 clivé par EcoRI et déphosphorylé.

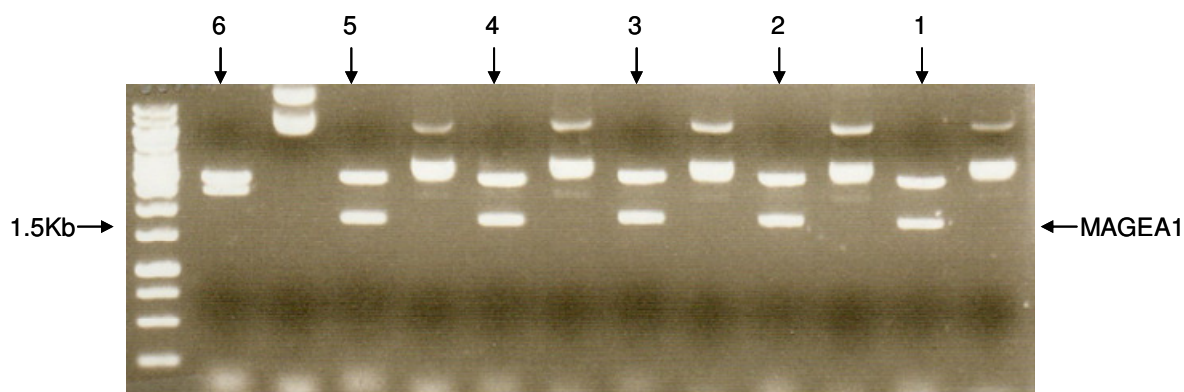


Figure II.17 : Photographie du gel d'électrophorèse montrant la migration des ADN de clones de pCR8-A1 restreints par EcoRI afin de montrer la présence de la séquence du MAGE. La séquence attendue mesure 1.5Kb. Le marqueur de poids moléculaire est l'échelle 1Kb de Fermentas. Les clones 1, 2, 3, 4 et 5 ont incorporé la séquence codante de MAGEA1. Les puits intermédiaire correspondent au clone non clivés.

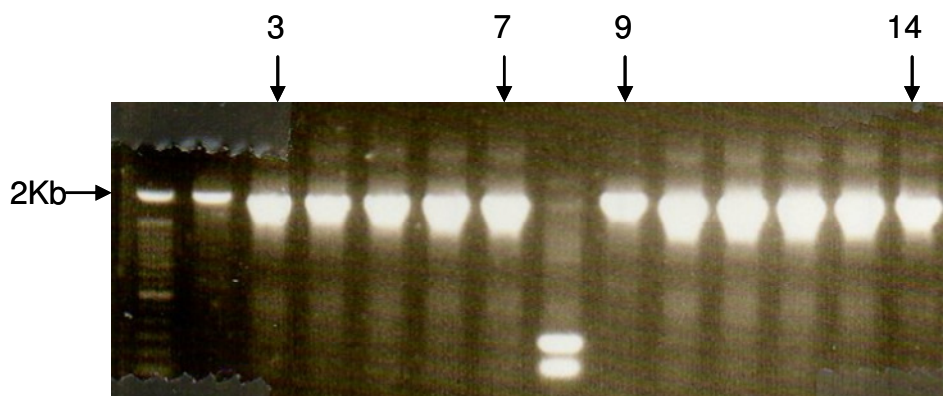


Figure II.18 : Photographie après migration en gel d'agarose des produits de la PCR de criblage permettant de mettre en évidence 11 clones pCR8-A1 ayant incorporé la construction entre les sites attL. Les amorces utilisées, pCR8F et pCR8R se trouvent sur le vecteur de part et d'autre du site d'insertion. Une bande de 2Kb est attendue. Les pistes 3 à 7 et 9 à 14 correspondent aux clones qui ont intégré une construction de 1.5Kb entre les bras d'homologie. L'échelle de poids moléculaire est 100Bp.

Clonage de MAGEA1 ou de la cassette FRT-IRES-HA-MAGEA1 dans pCR8, vecteur d'entrée du système gateway

3.1. Introduction de MAGEA1 non étiqueté dans pCR8

Le vecteur pCR8 donneur, est un vecteur qui permet la recombinaison avec un vecteur de destination via le système « gateway ». Il comporte les séquences de recombinaison attL entre lesquelles se trouvent des sites EcoRI (voir figure II.15). Ces sites sont ceux dans lesquels la construction va être insérée. Après clivage par EcoRI (figure II.16 piste 3), le vecteur a été déphosphorylé pour empêcher sa recircularisation. La séquence de MAGEA1 a été excisée du plasmide pCDNAI-A1 par restriction avec EcoRI et purifiée sur gel par Wizard (voir figure II.16 piste 2). Une ligation avec pCR8 linéarisé par EcoRI a permis l'obtention du vecteur d'entrée du système gateway : pCR8-MAGEA1. Le produit de ligation a servi à électroporer des bactéries *E. coli* qui ont été sélectionnées sur un milieu contenant de la spectinomycine. Une restriction diagnostique a été réasliée sur les clones obtenus afin de ressortir la séquence du MAGEA1. La figure II.17 montre que 5 clones sur 6 ont incorporé une séquence de la taille de MAGEA1. Une PCR réalisée avec des oligonucléotides s'hybridant de chaque côté du site d'insertion (pCR8F et pCR8R) a permis d'identifier des clones ayant intégré la séquence (Figure II.18). Un séquençage au moyen de pCR8F a permis de sélectionner des clones ayant incorporé la séquence de MAGEA1 dans le bon sens.

3.2. Introduction de la construction FRT-IRES-HA-MAGEA1 dans pCR8

Afin d'extraire la cassette FRT-IRES-HA-MAGE pour l'introduire dans pCR8, nous avons réalisé une amplification PCR de ce fragment (à partir du pUC57-FRT-IRES-HA-A1) avec les amorces FRT-S et MAGE-AS. Celles-ci comportent des sites EcoRI à leurs extrémités. C'est par une réaction de TA cloning que l'introduction de la construction dans pCR8 a été réalisée. Cette réaction met en jeu la topoisomérase. Pour pouvoir entrer dans la réaction de TA cloning, l'amplicon a été soumis à une polymérase qui ajoute des adénosines aux extrémités. La réaction TA cloning consiste en un échange de séquence entre les sites EcoRI du vecteur et la séquence entre les queues polyA. Le produit de ligation a été transformé dans des bactéries et sélectionné sur un milieu contenant de la spectinomycine. Les colonies obtenues sont criblées par PCR avec les amorces pCR8F et pCR8R (Figure II.19). Le sens d'insertion a été vérifié par PCR avec les amorces IRES-R, dans la séquence IRES et pCR8F dans le vecteur (voir figure II.20). Le séquençage a confirmé la séquence du clone sélectionné, il fut réalisé avec l'amorce pCR8F. Ce clone fut sélectionné pour le clonage suivant, nous le désignerons pCR8-FRT-IRES-HA-A1.

4. Introduction des cassettes FRT-IRES-HA-MAGE et MAGEA1 native dans pROSA26DEST

Le vecteur pRosa26DEST est un vecteur mis au point pour permettre l'introduction d'un transgène dans le génome murin. Plus précisément il porte des bras d'homologie permettant une double recombinaison homologue avec le locus Rosa26 de la souris. Ces bras flanquent des sites attR de clonage entre lesquels se trouve une cassette ccdB. Le système de recombinaison Gateway permet l'échange des les séquences se trouvant entre les sites attL du vecteur donneur et celle entre les sites attR du vecteur récepteur. Ce vecteur a été mis au point par *Hohenstein et al* en 2008 et a été récemment mis sur le marché.

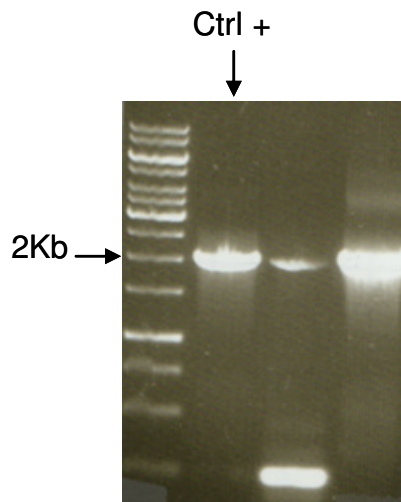


Figure II.19 : Photographie après migration en gel d'agarose des produits de la PCR de criblage de 2 clones pCR8-FRT-IRES-HA-A1 permettant de mettre en évidence les clones ayant incorporé le fragment FRT-IRES-HA-A1 entre les sites attL. Les amorces utilisées, pCR8F et pCR8R se trouvent sur le vecteur de part et d'autre du site d'insertion. Dans le cas où le vecteur a incorporé une séquence entre les sites attL, une bande de 1.8Kb est attendue. La piste 1 est l'échelle de poids moléculaire de 1Kb, la piste 2 présente le résultat de PCR d'un contrôle positif et la piste 4 présente un clone ayant incorporé une séquence de 1,8Kb, la taille attendue.

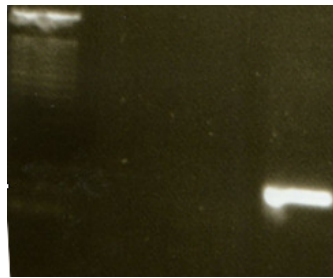


Figure II.20 : Photographie sous UV après migration en gel d'agarose de la PCR de criblage permettant de mettre en évidence 1 clone sur 2 (le dernier puits) ayant incorporé la séquence FRT-IRES-HA-A1 dans le bon sens. L'amorce pCR8F se trouve en amont du site d'insertion et l'amorce IRES-R se trouve en orientation anti-sens sur la construction.

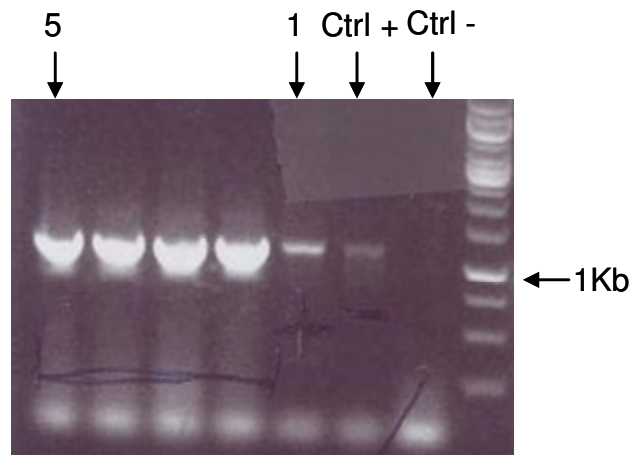


Figure II.21 : Photographie sous UV après migration en gel d'agarose de la PCR de criblage des clones pRosa26DEST-A1 avec les amorces A1 4582 et BghAS. La séquence amplifiée mesure un peu plus de 1Kb, ce qui correspond au profil obtenu.

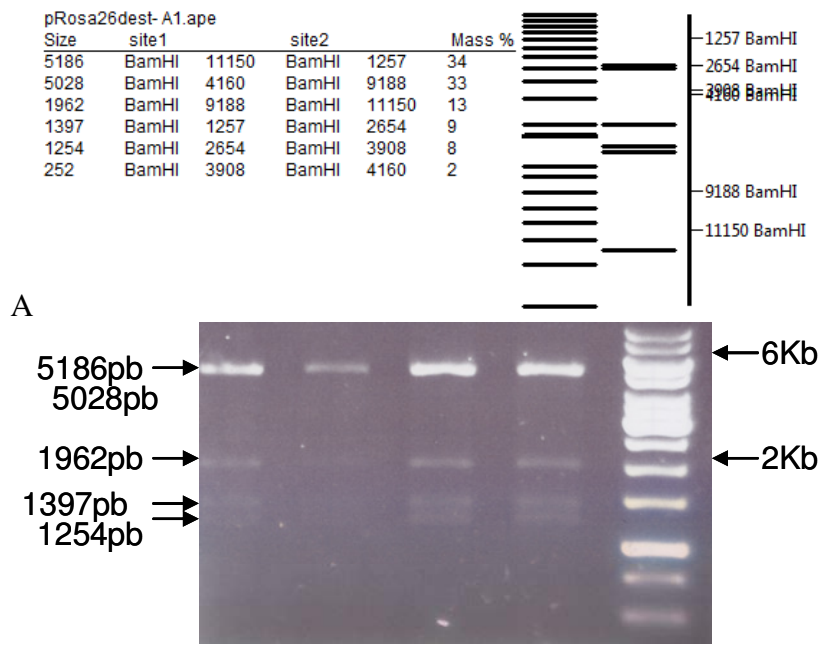


Figure II.22 : (A) Profil théorique de restriction du vecteur pRosa26DEST-A1 par BamHI. (B) Photographie sous UV après migration en gel d'agarose de la restriction diagnostique des clones pRosa26DEST-A1 par l'enzyme BamHI.

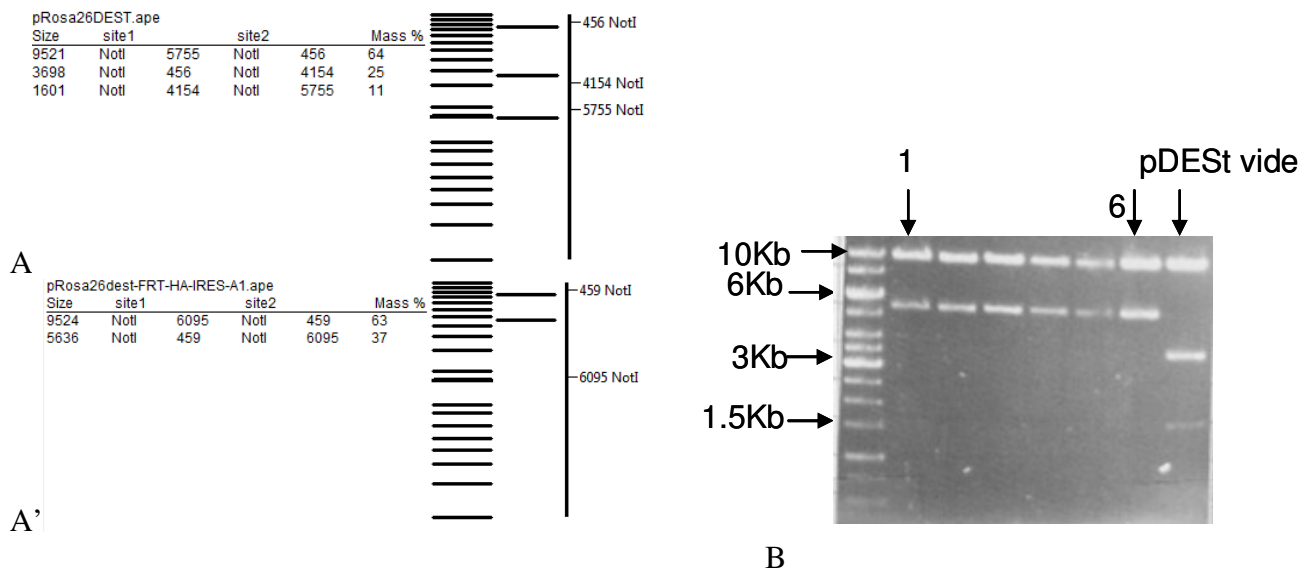


Figure II.23 : (A et A') Restriction diagnostique théorique par NotI du vecteur pRosa26DEST vide et du vecteur de destination portant la cassette FRT-IRES-HA-A1. (B) Photographie sous UV après migration en gel d'électrophorèse de la restriction diagnostique des ADN de pRosa26DEST-FRT-IRES-HA-A1 par NotI. Le dernier puits est le vecteur DEST vide. Les autres puits démontrent des clones ayant correctement incorporé la construction FRT-IRES-HA-A1.

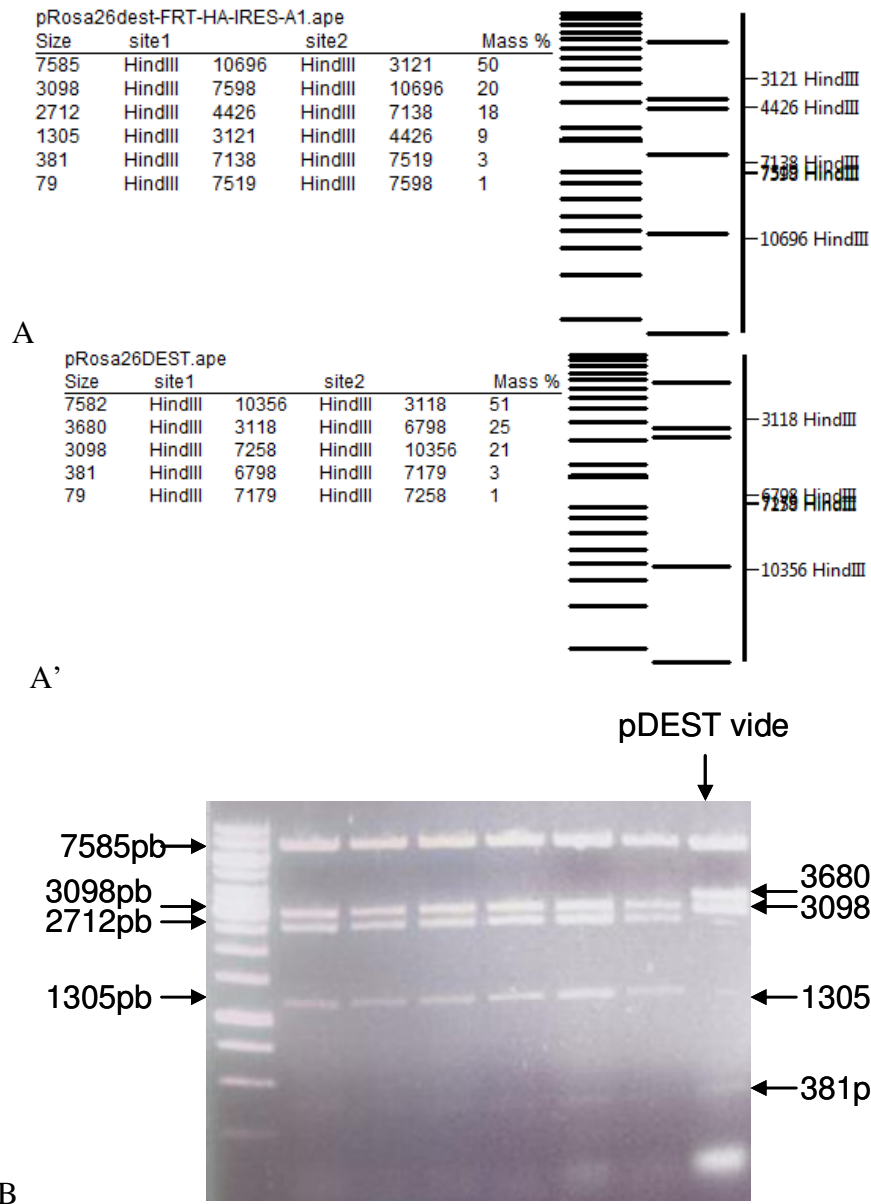


Figure II.24 : (Aet A') Représentations schématiques des profil de restriction attendus lors du clivage de pRosa26dest-FRT-IRES-HA-A1 ou pRosa26DEST vide par HindIII. (B) Photographie sous UV après migration en gel d'électrophorèse de la restriction diagnostique des ADN de pRosa26dest-FRT-IRES-HA-A1 par HindIII.

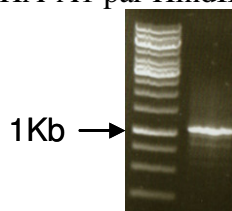


Figure II.25: Photographie sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose représentant l'amplification par PCR des 3 signaux de polyadénylation de la cassette STOP (750pb). Les amorces utilisées se trouvent se chaque coté du signal et sont STOP Forward et IRES reverse. La bande observée correspond à la taille attendue (les 750pb du signal PA et un bout du vecteur => >1Kb).

Les vecteurs donneur (pCR8-A1 ou pCR8-FRT-IRES-HA-A1) et accepteur (pRosa26DEST) ont été mélangés en présence de l'enzyme LR clonase. Les vecteurs obtenus sont pRosa26DEST-A1 et pRosa26DEST-FRT-IRES-HA-A1. Les colonies obtenues après électroporation et sélection sur ampicilline sont criblées afin de sélectionner les recombinants corrects.

Les clones pRosa26DEST-A1 sont criblés par PCR au moyen des amorces A1 4582 et Bgh AS (Figure II.21). La photographie après migration en gel d'agarose montre que les 4 clones testés ont bien incorporé une séquence correspondant à la taille de MAGEA1 dans le vecteur DEST. Les contrôles attestent du fonctionnement de la PCR. Une restriction diagnostique a également été réalisée, avec BamHI (Figure II.22). Les profils obtenus pour les 4 clones correspondent aux fragments attendus dans le cas de la contenance de la séquence A1.

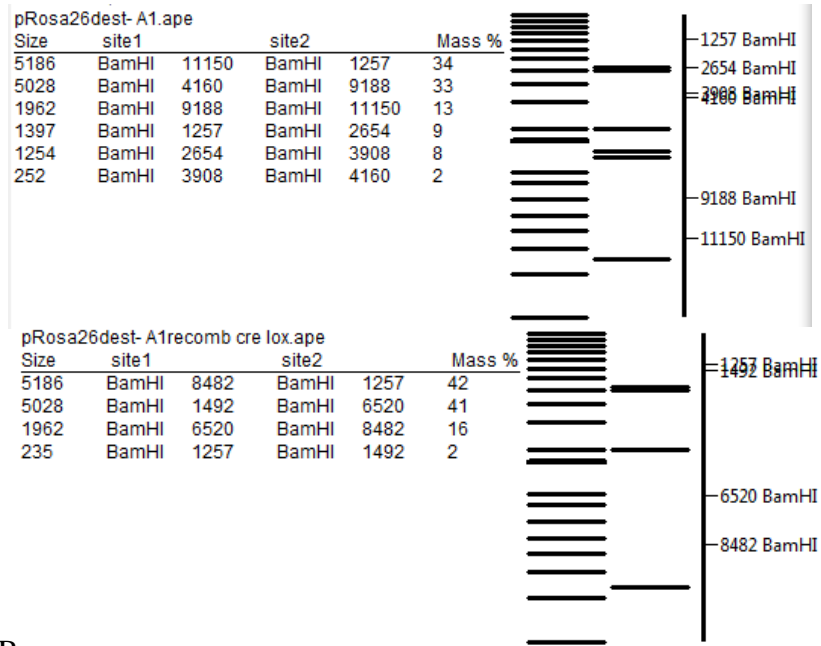
Les colonies contenant la construction MAGEA1 étiquetée ont été criblées par restriction diagnostique avec l'enzyme NotI qui clive 2 fois dans la séquence du pRosa26DEST-FRT-IRES-HA-A1 et une fois de plus dans pRosa26DEST- contenant la cassette ccdB (Figure II.23). Une seconde restriction diagnostique a été réalisée avec l'enzyme HindIII (Figure II.24). Les profils attendus pour les 2 restrictions suggèrent l'incorporation de la cassette FRT-IRES-HA-A1 dans le vecteur DEST. Ces clones ont aussi été séquencés pour vérifier l'orientation de l'insert (avec NsiI-A1-AS).

5. Vérification de l'intégrité de la cassette STOP

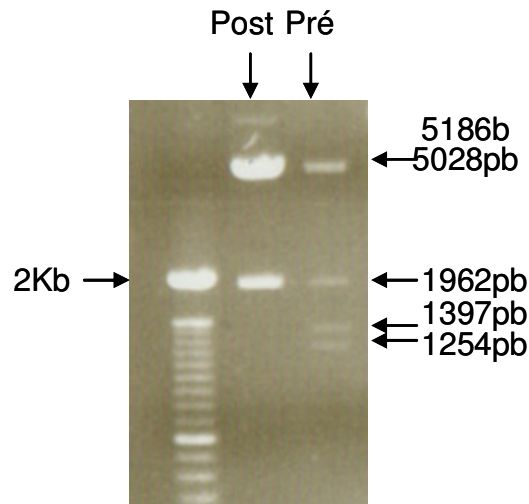
Ayant déjà rencontré des problèmes de recombinaison au sein de la cassette STOP, nous avons pris la précaution de vérifier son intégrité après le clonage dans pRosa26DEST. Le signal de polyadénylation est constitué de 3 répétitions d'environ 250pb. Des PCR diagnostiques permettant de mettre en évidence un amplicon correspondant aux 3 répétitions (750pb) ont été réalisées avec les amorces STOP forward et IRES reverse (Figure II.25). Comme le montre la figure du gel, une bande d'environ 800pb a été observée indiquant l'absence de délétion. Nous avons aussi vérifié l'intégrité de la séquence de polyadénylation par séquençage avec l'amorce A1 3891 AS. Les 3 répétitions étaient bien présentes.

6. Vérification de la fonctionnalité des systèmes de recombinaison Cre/Lox en bactéries

Avant l'introduction des transgènes dans les cellules ES, nous avons vérifié la fonctionnalité des recombinaisons des transgènes par Cre et FLP dans des bactéries E. coli. Nous avons préparé des bactéries compétentes contenant soit un plasmide d'expression de Cre soit un plasmide qui exprime FLP. Nous y avons introduit les plasmides pRosa26dest-IRES-A1 (dans les bactéries FLP et Cre) et pRosa26Dest-A1 (dans les bactéries Cre). La mise en évidence des évènements de recombinaison s'est faite par restrictions diagnostiques. Les profils de restriction ayant migrés sur un gel d'agarose montrent la délétion soit de la cassette Néo-STOP dans le cas de la recombinaison des sites loxP soit de l'IRES et du HA dans le cas de la recombinaison des sites FRT.



B



C

Figure II.26 : (A et B) Représentations schématiques des profils de restrictions par BamHI attendus avant et après recombinaison de pRosa26Dest-A1 par Cre. (C) Photographie sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN de pRosa26Dest-A1 avant et après recombinaison par Cre dans E. coli. 1Kb = échelle de poids moléculaire.

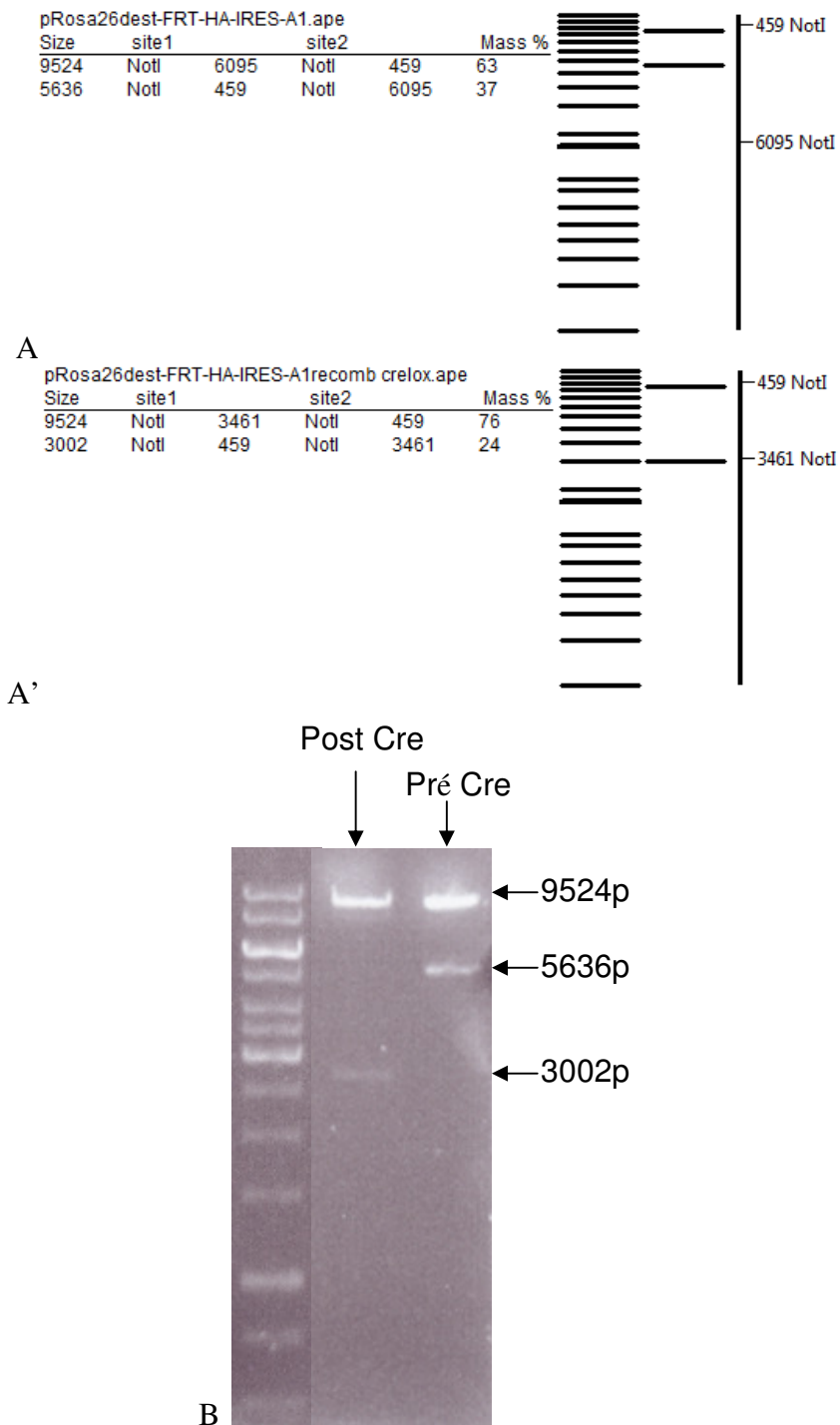


Figure II.27 : (A, A') Représentations schématiques des profils de restriction par NotI attendus de l'ADN pRosa26DEST-FRT-IRES-HA-A1 avant et après recombinaison par la Cre. (B) Photographie après électrophorèse en gel d'agarose des restrictions du vecteur pRosa26DEST-FRT-IRES-HA-A1 avant et après l'action de la Cre. Les bandes obtenues correspondent aux profils attendus.

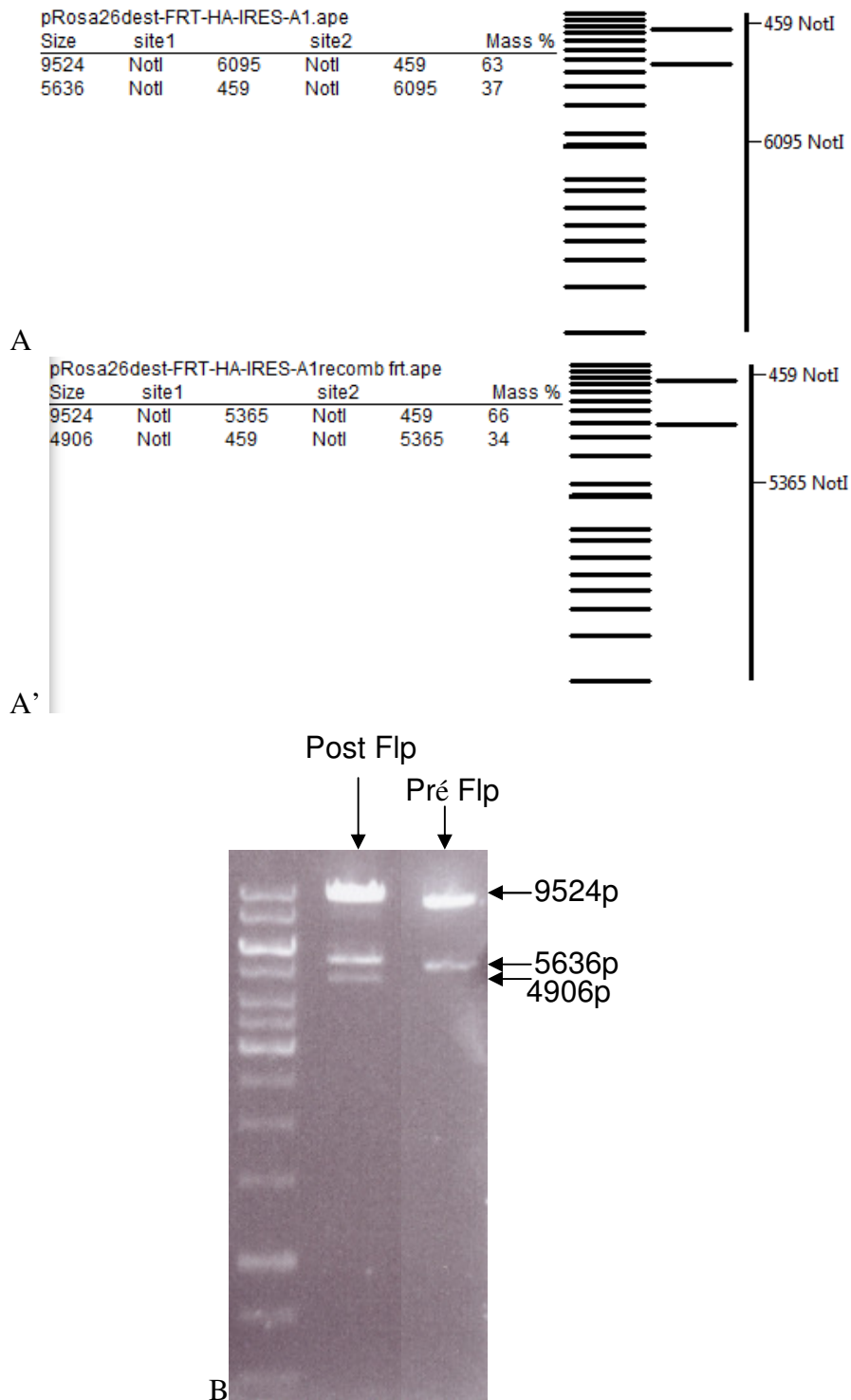


Figure II.28 : (A, A') Représentations schématiques des profils de restriction par NotI attendus de l'ADN pRosa26DEST-FRT-IRES-HA-A1 avant et après recombinaison par la Flp. (B) Photographie après électrophorèse en gel d'agarose des restrictions du vecteur pRosa26DEST-FRT-IRES-HA-A1 avant et après l'action de la Flp. La restriction ayant été réalisée sur une colonie de bactéries n'ayant pas toutes été sensibles à l'induction de l'expression de la flippase, nous observons une bande correspondant à de l'ADN non soumis à la flippase.

6.1. Test de recombinaison Cre/loxP du vecteur pRosa26DEST-A1

Afin de vérifier la délétion effective de la cassette STOP après recombinaison des sites loxP sous l'action de Cre, nous avons réalisé des restrictions diagnostiques. L'ADN de pRosa26DEST-A1 exposé ou non à la Cre a été clivé par BamHI (Figure II.26). Nous observons une concordance entre les profils attendus et observés ce qui permet de conclure que la recombinaison Cre/loxP a fonctionné.

6.2. Test de recombinaison Cre/loxP du clone pRosa26DEST-FRT-IRES-HA-A1

De même que pour pRosa26dest-A1, nous avons testé en bactérie la fonctionnalité de la recombinaison Cre/loxP : L'ADN du plasmide pRosa26DEST-FRT-IRES-HA-A1 exposé ou non à la Cre a été digéré par NotI. Les figures II.27A,A' et II.27B présentent les profils attendus et observés suite à cette restriction.

6.3. Test de recombinaison FRT/FLP du vecteur pRosa26dest-FRT-IRES-HA-A1

Pour mettre en évidence la recombinaison des sites FRT sous l'action de Flp, nous avons soumis l'ADN du vecteur pRosa26dest-FRT-IRES-HA-A à l'enzyme de restriction NotI 1. D'autre part, nous avons introduit ce plasmide dans la souche stb13 porteuse du vecteur d'expression de Flp. Nous avons induit l'expression de la Flp par une incubation à 40°C pendant 20minutes. Nous avons purifié l'ADN plasmidique et l'avons restreint par NotI. La figure II.28 A' montre le profil de restriction théorique à obtenir dans le cas de recombinaison FLP. Les bandes attendues de 9524pb et 4906pb pour l'ADN recombiné correspondent aux bandes observées. Une bande supplémentaire de 5636pb est également présente. Elle provient très probablement du clivage des plasmides de bactéries de la culture qui n'ont pas été recombinés par Flp.

7. Obtention de cellules ES exprimant MAGEA1 de manière conditionnelle

7.1. Electroporation, sélection et criblage des cellules ES

Des cellules ES de souris de la lignée E14 ont été électroporées en présence du vecteur pRosa26dest-A1 linéarisé par XhoI (Figure II.29). Ce vecteur porte dans la cassette STOP un gène de résistance à la néomycine. Les cellules électroporées ont été sélectionnées dans un milieu contenant de la généticine. Après 7 jours de sélection, 48 colonies de cellules résistantes ont été repiquées et amplifiées en vue des manipulations ultérieures.

7.2. Screening Criblage des clones de cellules ES par PCR

7.2.1. Extraction d'ADN

L'ADN de 48 clones a été extrait et nous avons vérifié qu'il était amplifiable par PCR en réalisant une PCR contrôle qui amplifiait un fragment du gène MAGEA1. Les clones de cellules ES NeoR peuvent être de 2 types. (1) Des clones dans lesquels le transgène s'est inséré dans le génome en un site indéterminé. (2) Des clones dans lesquels le transgène s'est inséré au locus Rosa26 par double recombinaison. Ce sont ces derniers qui nous intéressent.

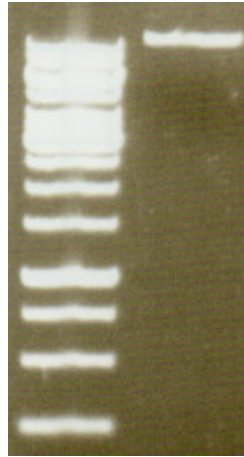


Figure II.29 : Photographie sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose de la linéarisation de pRosa26dest-A1 par XhoI avant d'électroporation en cellules (piste de droite). La taille attendue du vecteur est de 15079pb. La piste de gauche est le marqueur de poids moléculaire 1Kb.

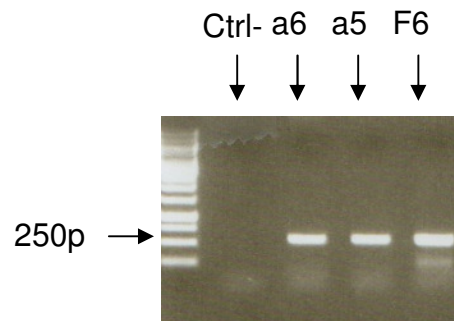


Figure II.30 : Photographie sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose de la PCR d'une partie du gène MAGED1. Cette amplification permet de vérifier que l'ADN des cellules ES (clones a5 et a6) est amplifiable. Les amorces utilisées sont D1S et ODB82. La bande obtenue correspond à la taille attendue de la portion amplifiée du Mage. F6 est un contrôle positif.

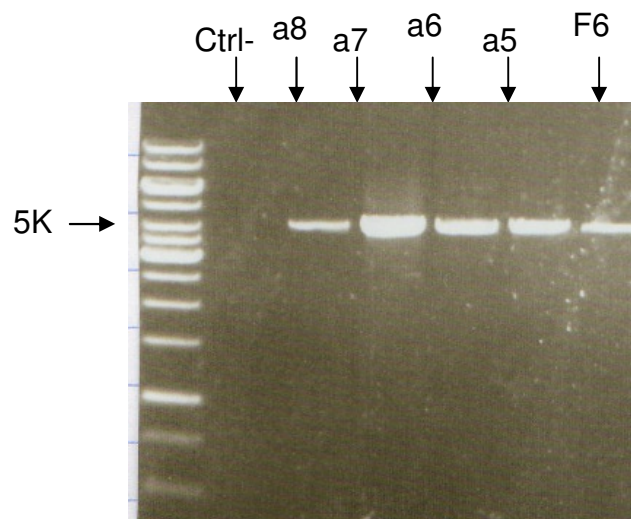


Figure II.31 : Photographie après l'électrophorèse sur gel d'agarose de la PCR réalisée sur l'ADN des cellules ES (clones a8, a7, a6 et a5) avec les amorces GenRosa3'AS et Rosa6327S qui amplifient une portion du bras d'homologie 3'. La bande obtenue correspond à la taille attendue. Cette PCR ayant fonctionné confirme que l'oligonucléotide GenRosa3'AS permet une amplification ADN. Le clone F6 est un contrôle positif.

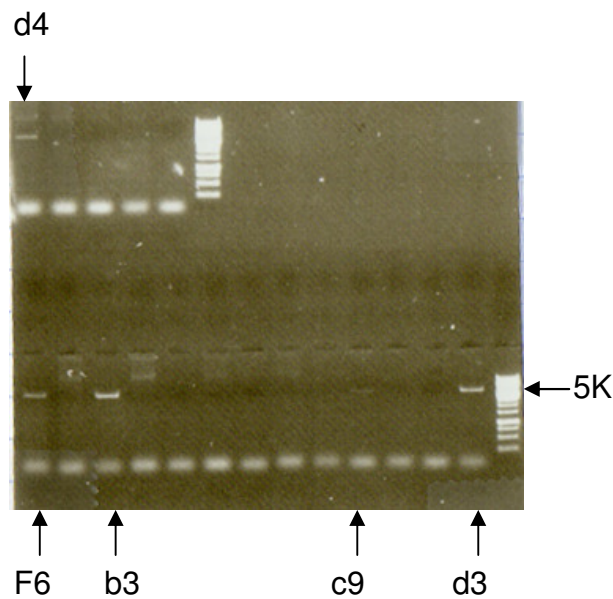


Figure II.32 : Photographie après l'électrophorèse en gel d'agarose de la PCR réalisée sur l'ADN des clones de cellules ES NeoR. L'amorce qui est spécifique au transgène est AD1 et GenRosa3'AS qui s'hybride du côté 3' du bras d'homologie. Ces amorces permettent l'amplification du bras d'homologie 3'. Les bandes observées dans les pistes 1 supérieure et 3et13 du gel inférieure ont la taille attendue. La première piste du gel inférieure correspond à l'amplification de l'ADN du clone positif F6.

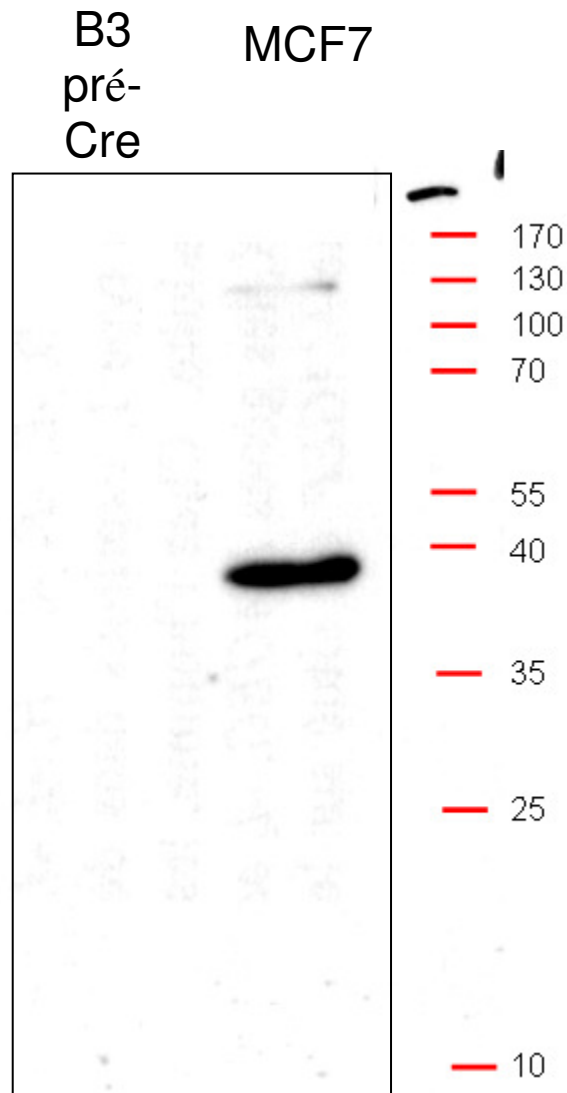


Figure II. 33 : Photographie du Western Blot effectué sur le lysat protéique du clone B3. La photographie révèle la présence de MAGEA1 de 40kDa dans le lysat des cellules MCF7 ce qui atteste du fonctionnement de l'expérience. Aucune protéine MAGEA1 n'est exprimée dans le lysat des clones B3 avant l'action de Cre.

Ces clones seront amplifiés par PCR à l'aide d'une amorce spécifique du transgène (AD1) et d'une amorce située dans le locus Rosa26, mais en dehors du transgène (GenRosa3' AS) (Annexe 4). Cette PCR amplifie le grand bras d'homologie (4.7Kb). Nous avons observé précédemment que l'amplification PCR du petit bras n'était pas possible sans doute à cause de la richesse en G-C de cette séquence.

7.2.2. Vérification que les ADN sont amplifiables

La PCR (Figure II.30), qui a permis de vérifier que les ADN de cellules étaient amplifiables a été réalisée avec les amorces D15 et ODB82. La figure montre une amplification de 0.5Kb, ce qui est effectivement la taille du produit attendu.

7.2.3. Vérification que l'amorce GenRosa3' permet une amplification PCR

Nous avons également testé l'amorce GenRosa3'A en réalisant une PCR au moyen des amorces GenRosa3'AS et Rosa6327 sur de l'ADN génomique de souris. Comme le montre la figure II.31, cette amplification a fonctionné.

En conclusion, nous avons montré qu'il était possible d'amplifier la région délimitée par AD1 et Rosa2-3'AS et que ces amorces étaient fonctionnelles. En sondant l'ADN des 48 colonies avec AD1 et GenRosa3'AS, nous avons identifié par PCR des clones positifs ayant intégré le transgène dans Rosa26 (Figure II.32).

7.3. Test de fonctionnalité de la séquence de polyadénylation STOP

Nous avons à ce stade obtenu des clones de cellule ES ayant intégré le transgène MAGEA1 au locus Rosa26. La question était alors de déterminer s'il était possible d'induire l'expression de MAGEA1 dans ces clones. Un Western Blot a été réalisé avec l'anticorps monoclonal anti-MAGEA1 (Clone 6C1 de chez Zymed : Full-length recombinant human MAGEA1) sur 2 clones (B3 et D4). Nous avons mis en évidence l'absence de protéine MAGEA1 détectables dans les lysats de ces clones (figure II.33). La figure montre qu'il n'y a pas de protéines MAGEA1 exprimées dans le lysat des clones transformés. Pour s'assurer du fonctionnement de cette manipulation, nous avons soumis au même protocole de révélation de protéines MAGEA1, un clone positif qui exprime les protéines. La mise en évidence de ces protéines dans le contrôle positif indique que l'expérience a fonctionné et que les clones qui possèdent la cassette stop n'expriment pas les protéines MAGEA1.

7.4. Test de l'induction de l'expression du gène MAGEA1 dans les cellules ES

L'objectif est de pouvoir activer l'expression de MAGEA1 dans les cellules. Pour permettre la transcription, la cassette stop doit être éliminée. Nous avons électroporé les cellules B3 et D4 avec le vecteur pGK-Cre puro qui permet l'expression de la recombinaise Cre et qui contient une cassette de résistance à la puromycine. Après l'électroporation, les cellules sont incubées pendant 24h en présence de puromycine pour sélectionner les cellules transfectées. La sélection est en cours.

Discussion

Discussion

Le fait que les MAGE de type I soient exprimés spécifiquement dans un grand nombre de tumeurs cancéreuses de divers histotypes (mélanomes, tumeurs gastro-intestinales, tumeurs du poumon, du sein, de la prostate, de la vessie, neuroblastomes ...) suggère que ces gènes pourraient être impliqués dans la transformation cancéreuse et/ou le développement des tumeurs (prolifération, résistance à l'apoptose, capacités invasives, néoangiogenèse, résistance aux drogues de chimiothérapie...). Comme ces gènes sont plus fréquemment exprimés dans les métastases que dans les tumeurs primaires, il est possible que leur expression soit associée à la dissémination de la tumeur. L'hypothèse que les MAGE de type I puissent avoir un effet oncogène est supportée par deux publications qui indiquent que des protéines MAGEA peuvent interférer avec l'activité de p53[18, 19].

Afin de tester cette hypothèse *in vivo*, le laboratoire a entrepris la production de lignées de souris permettant une expression ectopique contrôlée de plusieurs protéines MAGE de type I : le gène humain MAGEA1 et les gènes de souris *Mageb1* et *Magea2*. La stratégie choisie était de placer le transgène MAGE sous la dépendance d'un promoteur ubiquiste dans le locus ROSA26, par recombinaison homologue en cellules ES. Une cassette permettant de stopper la transcription (constituée d'un gène *NeoR* et de trois séquences de polyA répétées en tandem) est interposée entre le promoteur ROSA26 et le transgène MAGE. Cette cassette est flanquée de sites loxP pour permettre son excision par Cre. Au moment d'aborder ce travail, un transgène MAGEA1 avait été produit selon cette stratégie. Des cellules ES recombinées avaient été obtenues et des souris chimériques avaient été produites. Cependant, au cours de la confection du transgène, une délétion s'était produite au niveau de la cassette STOP (2 des 3 répétitions étaient manquantes) et l'expression de MAGEA1 était constitutive dans les cellules ES et aussi probablement dans les tissus transgéniques des chimères. Cette expression de MAGEA1 chez les chimères est probablement la cause de l'incapacité de ces animaux à transmettre le transgène MAGEA1 à leur descendance. Nous avons donc entrepris de construire à nouveau un transgène MAGEA1 dans l'espoir qu'il soit authentiquement inductible et permette la production d'une colonie d'animaux transgéniques. Pour éviter l'instabilité du transgène dans les bactéries, nous avons utilisé la souche d'*E. coli* Stbl3™ réputée permettre la propagation stable de plasmides contenant de longues séquences répétées (<http://products.invitrogen.com/ivgn/product/C737303>). Nous avons ainsi pu construire un transgène MAGEA1 avec une cassette STOP intacte. Ce transgène a été introduit dans des cellules ES et des clones recombinants contenant le transgène inséré au locus ROSA26 ont été obtenus. Ces clones n'expriment pas MAGEA1 ce qui indique que la cassette STOP est fonctionnelle. Nous sommes occupés à tester l'induction du transgène par la recombinaison Cre. Pour la construction de ce transgène, nous avons bénéficié de la disponibilité récente d'un plasmide permettant d'insérer le transgène (MAGEA1 en l'occurrence) en une seule étape et en utilisant le système Gateway, en aval d'une cassette STOP placée entre deux bras d'homologie ROSA26. Ce système de clonage a parfaitement fonctionné et s'est révélé beaucoup plus aisé que les assemblages réalisés par ligation. Outre le transgène MAGEA1, nous projetons de construire des transgènes contenant les gènes de souris *Magea2* et *Mageb1*. Comme nous ne disposons pas d'anticorps permettant de suivre l'expression de ces protéines dans les animaux transgéniques, nous avons ajouté une étiquette HA du côté N-ter. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que cette étiquette interfère avec la fonction des protéines MAGE. Nous avons donc imaginé un système permettant d'ôter ces étiquettes à la demande, en utilisant le système de recombinaison site spécifique FLP-FRT. Pour tester le fonctionnement de ce système, nous avons construit un transgène MAGEA1 pourvu de cette étiquette amovible HA. A ce stade, le transgène est construit. Nous sommes en train de tester

la bonne délétion de l'étiquette par FLP dans des bactéries E. coli exprimant cette recombinase.

Perspectives

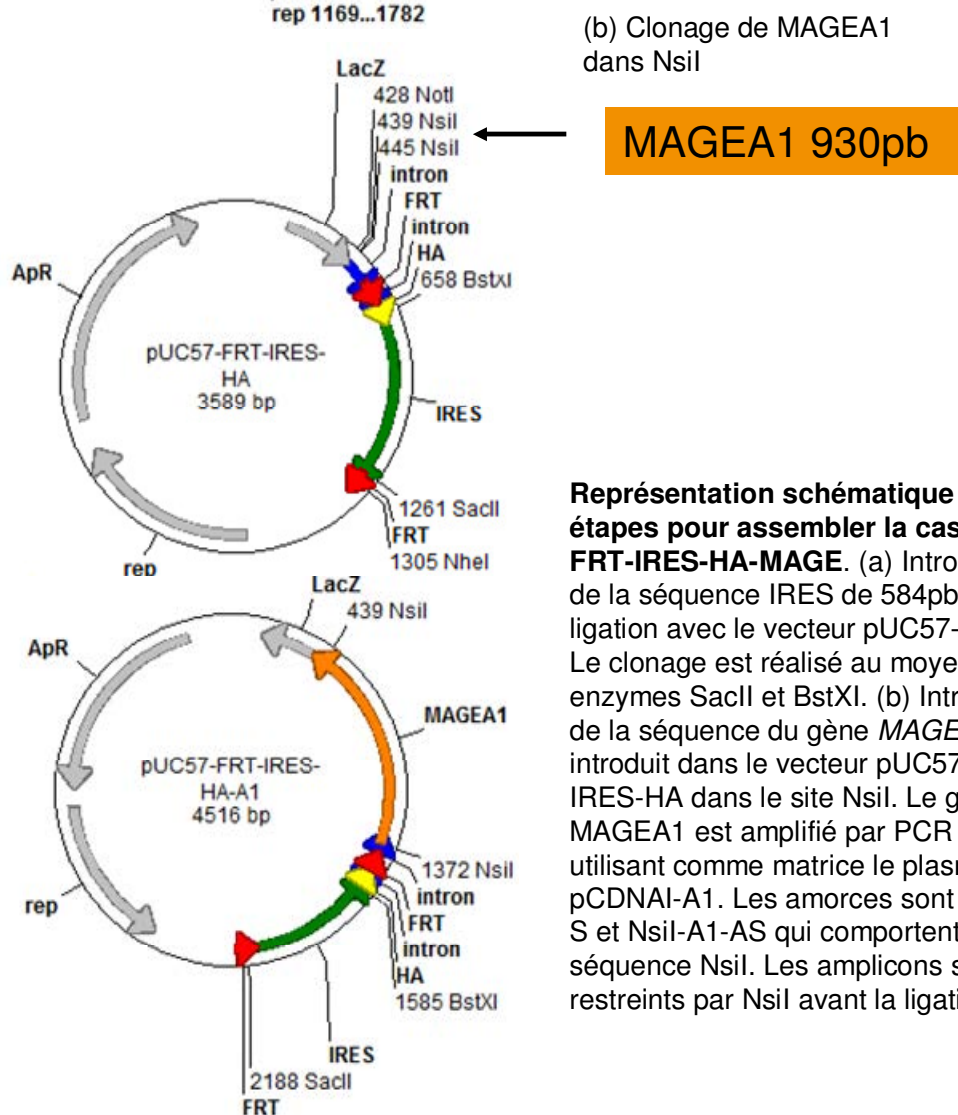
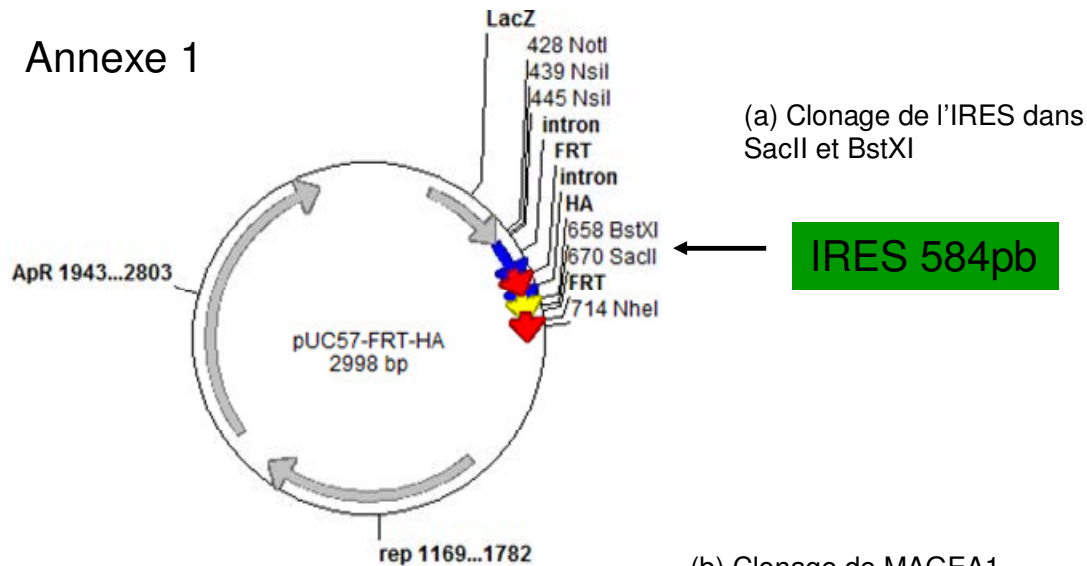
Perspectives

Le système de l'étiquette amovible que nous avons imaginé est original et si nous montrons qu'il fonctionne, il pourrait avoir des applications débordant du cadre de ce projet. Il pourrait aussi servir à produire de façon contrôlée diverses protéines de fusion utiles en recherche fondamentale ou appliquée. Le fonctionnement de l'étiquette amovible sera évalué dans des cellules ES transgéniques. Celles-ci seront exposées à FLP (par expression transitoire après électroporation), puis à Cre, pour activer le transgène. Nous pourrions ainsi vérifier si l'exposition à FLP aboutit à la production d'une protéine MAGEA1 native (reconnue par l'anticorps anti-MAGEA1 mais pas par l'anticorps anti-HA). Au contraire, en absence d'exposition à FLP, les protéines MAGEA1 étiquetées produites devraient être reconnues par les deux anticorps.

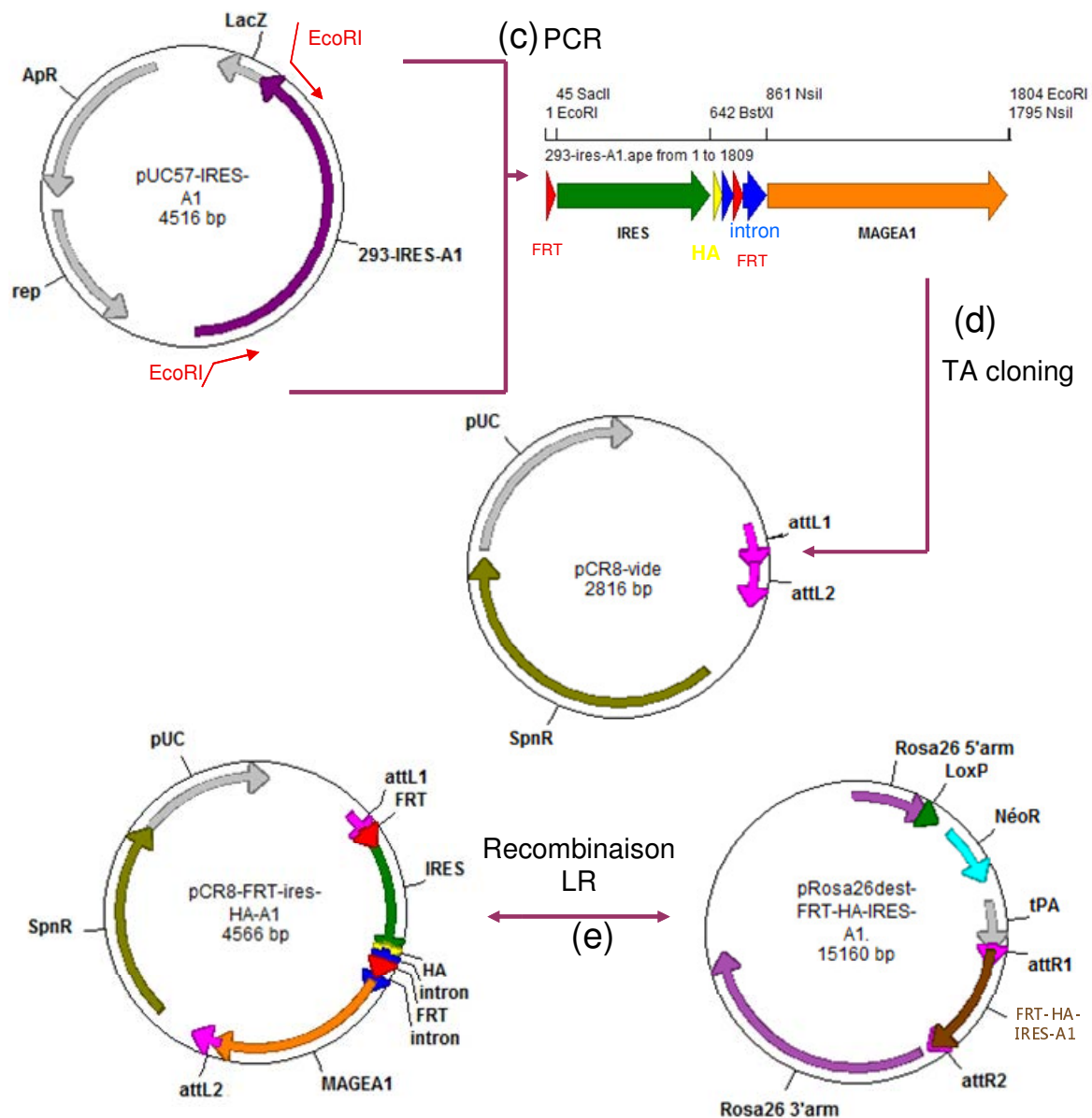
La production de souris exprimant des Mage de type I de façon ectopique devrait permettre de mettre en évidence une éventuelle participation de ces gènes à l'initiation et/ou au développement de tumeurs. L'expression de MAGE (A1, a2 ou b1) sera induite in vivo, en croisant les souris porteuses des transgènes conditionnels avec des souris transgéniques exprimant Cre de façon ubiquiste ou tissu-spécifique. Grâce au variant de Cre activable par le Tamoxifène (CreERT2), il sera aussi possible d'induire l'expression au moment choisi (par administration de Tamoxifène). Nous disposons déjà d'une souris exprimant CreERT2 de manière « ubiquiste » (don de l'Institut Clinique de la souris, Prof. Johan Auwerx, Illkirsh, France). Les tissus ciblés de manière prioritaire seront les mélanocytes (mélanomes, souris Tyr:: CreERT2), l'épithélium de la prostate (souris PB-Cre4) et l'épithélium mammaire (souris WAP-Cre). L'apparition de tumeurs chez les souris exprimant MAGEA1 sera monitorée. Si des tumeurs apparaissent, elles seront analysées de façon anatomopathologique et leur profil d'expression génique global pourra être déterminé par la technique des damiers à ADN (plateforme Affymetrix UCL). Ceci devrait permettre de déterminer quelles modifications du transcriptome sont associées à l'expression de MAGEA1 dans les tumeurs. Si les souris qui expriment MAGEA1 ne développent pas spontanément plus de tumeurs que des souris contrôles, nous déterminerons si l'ajout d'éléments oncogènes potentialise le développement de tumeurs. Deux types de mutagènes seront utilisés : (1) mutagenèse chimique au DMBA et (2) mutagenèse dirigée par croisement avec des souris transgéniques exprimant des oncogènes (p. ex. H-Ras^{G12V}) ou déficiente pour des gènes suppresseurs de tumeurs (p. ex. p16 INK4a et p19Arf). S'il s'avère que les Mage de type I sont effectivement impliqués dans la tumorigenèse, cela pourrait avoir un impact important en cancérologie. On peut même imaginer que ces protéines Mage puissent constituer des cibles thérapeutiques. Comme ces protéines sont spécifiques des cellules cancéreuses, les tissus sains (à l'exception des cellules de la lignée germinale) seraient préservés par ces thérapies anti-Mage.

Annexes

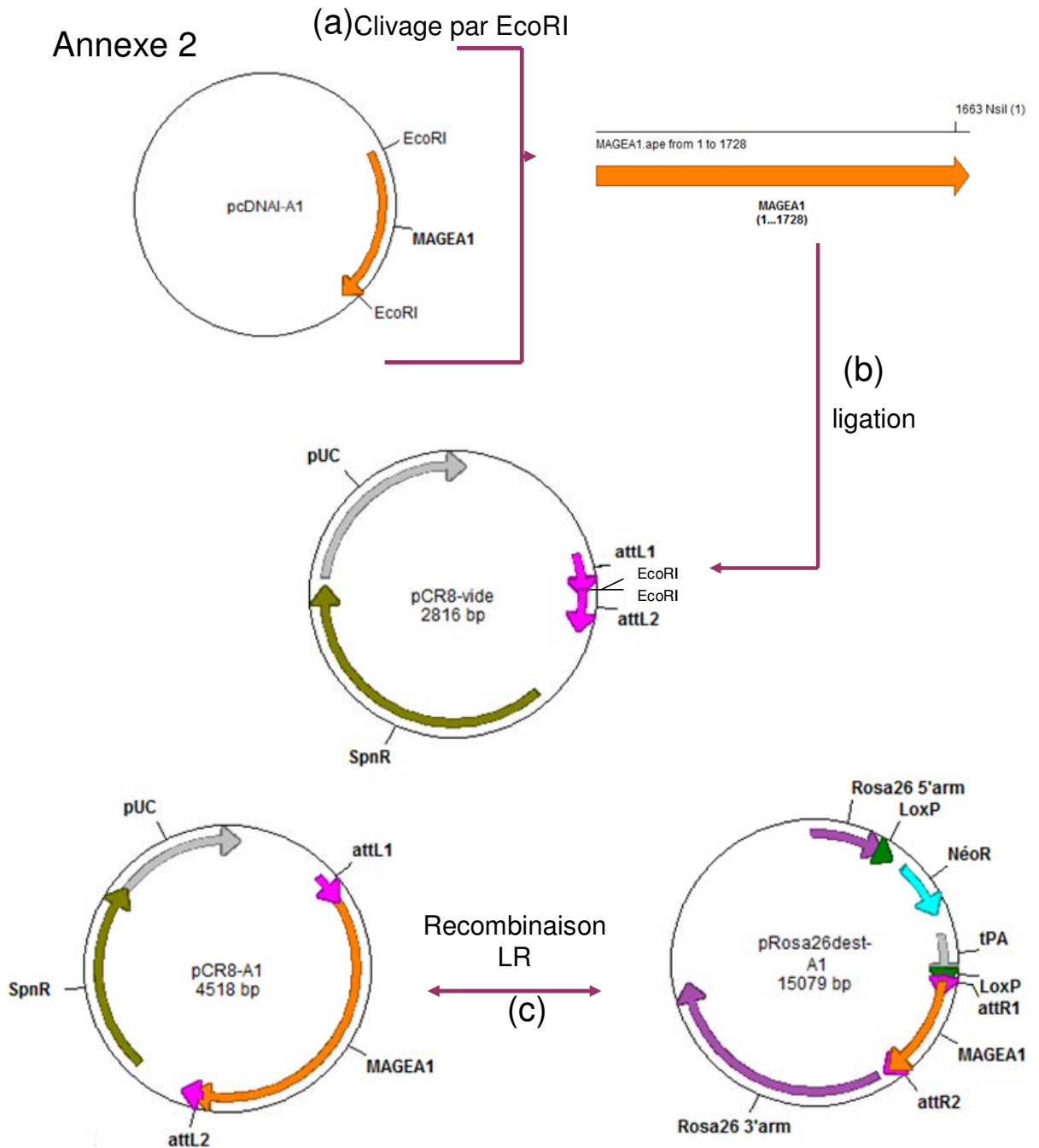
Annexe 1



Représentation schématique des étapes pour assembler la cassette FRT-IRES-HA-MAGEA1. (a) Introduction de la séquence IRES de 584pb par ligation avec le vecteur pUC57-FRT-HA. Le clonage est réalisé au moyen des enzymes SacII et BstXI. (b) Introduction de la séquence du gène *MAGEA1*. Il est introduit dans le vecteur pUC57-FRT-IRES-HA dans le site NsiI. Le gène *MAGEA1* est amplifié par PCR en utilisant comme matrice le plasmide pCDNA1-A1. Les amorces sont Nsil-A1-S et Nsil-A1-AS qui comportent une séquence Nsil. Les amplicons sont restreints par Nsil avant la ligation.

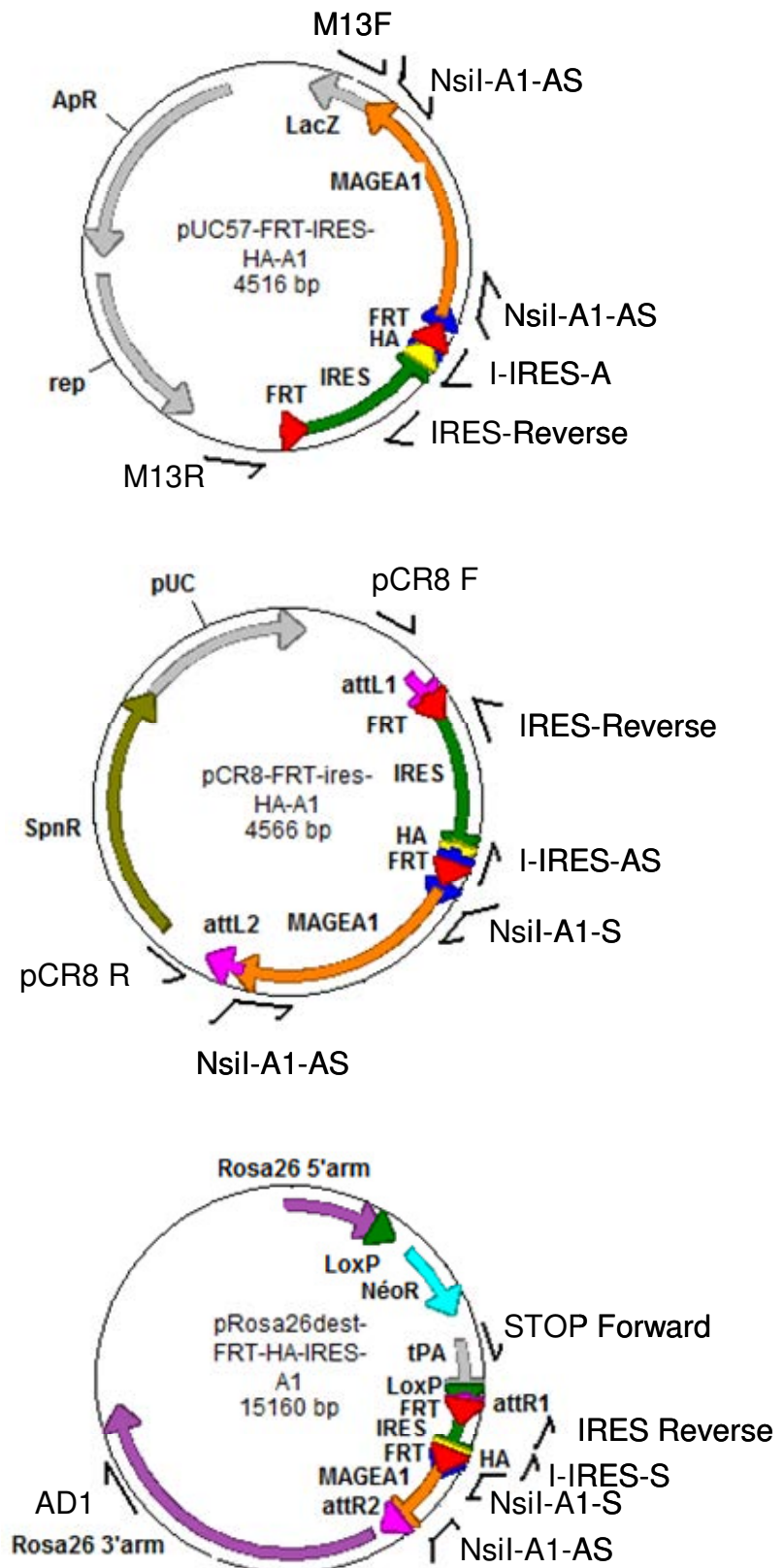


Représentation schématique des clonages effectués pour assembler la cassette FRT-IRES-HA-MAGE. (c) Amplification PCR de la cassette FRT-IRES-HA-A1 par les amorces EcoRI-FRT et EcoRI-A1. Lors de cette étape, les amplicons se voient ajouter des queues polyA à ses extrémités (d) Réaction de TA cloning qui place la cassette FRT-IRES-HA-A1 entre les bras attL1 et attL2 du vecteur pCR8 sous l'action de la topoisomérase. (e) Réaction de recombinaison du système Gateway entre le vecteur donneur pCR8-FRT-IRES-HA-A1 et pRosa26DEST contenant la cassette ccdB.

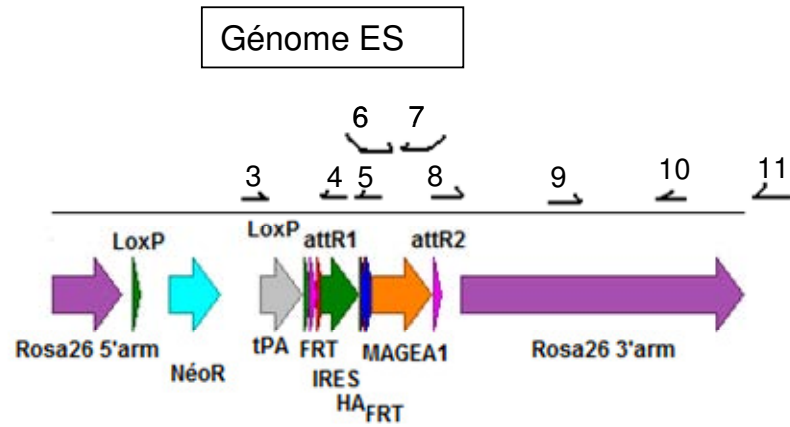


Annexe 3

Représentation schématique des sites d'hybridation des amorces utilisées lors des étapes de clonage et de vérification.



Annexe 4



1 = D1S

2 = ODB 82

3 = STOP Forward

4= IRES Revers

5 = I-IRES-S

6 = Nsil-A1-S

7 = Nsil-A1-AS

8 = AD1

9 = Rosa6327S

10 = Rosa 49AS

11 = GenRosa3'AS

Représentation schématique des sites d'hybridation des amorces utilisées lors des étapes de clonage et de vérification.

bibliographie

Bibliographie

1. Chomez, P., et al., *An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family*. *Cancer Res*, 2001. **61**(14): p. 5544-51.
2. De Plaen, E., et al., *A new family of mouse genes homologous to the human MAGE genes*. *Genomics*, 1999. **55**(2): p. 176-84.
3. Traversari, C., et al., *A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E*. *J Exp Med*, 1992. **176**(5): p. 1453-7.
4. van der Bruggen, P., et al., *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma*. *Science*, 1991. **254**(5038): p. 1643-7.
5. Barker, P.A. and A. Salehi, *The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease*. *J Neurosci Res*, 2002. **67**(6): p. 705-12.
6. De Backer, O., et al., *Structure, chromosomal location, and expression pattern of three mouse genes homologous to the human MAGE genes*. *Genomics*, 1995. **28**(1): p. 74-83.
7. De Smet, C., et al., *Involvement of two Ets binding sites in the transcriptional activation of the MAGE1 gene*. *Immunogenetics*, 1995. **42**(4): p. 282-90.
8. 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*, 1996. **93**(14): p. 7149-53.
9. De Smet, C., et al., *DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(11): p. 7327-35.
10. Feinberg, A.P. and B. Tycko, *The history of cancer epigenetics*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(2): p. 143-53.
11. Van Der Bruggen, P., et al., *Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells*. *Immunol Rev*, 2002. **188**: p. 51-64.
12. Rotzschke, O., et al., *Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells*. *Nature*, 1990. **348**(6298): p. 252-4.
13. Xiao, J. and H.S. Chen, *Biological functions of melanoma-associated antigens*. *World J Gastroenterol*, 2004. **10**(13): p. 1849-53.
14. Rimoldi, D., et al., *cDNA and protein characterization of human MAGE-10*. *Int J Cancer*, 1999. **82**(6): p. 901-7.
15. Jurk, M., et al., *MAGE-11 protein is highly conserved in higher organisms and located predominantly in the nucleus*. *Int J Cancer*, 1998. **75**(5): p. 762-6.
16. Takahashi, K., et al., *Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis*. *Cancer Res*, 1995. **55**(16): p. 3478-82.
17. Laduron, S., et al., *MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(14): p. 4340-50.
18. Monte, M., et al., *MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(30): p. 11160-5.
19. Yang, B., et al., *MAGE-A, mMAGE-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines*. *Cancer Res*, 2007. **67**(20): p. 9954-62.
20. Minc, E., et al., *Localization and phosphorylation of HP1 proteins during the cell cycle in mammalian cells*. *Chromosoma*, 1999. **108**(4): p. 220-34.

21. Bertrand, M., et al., *Comparative expression analysis of the MAGED genes during embryogenesis and brain development*. Dev Dyn, 2004. **230**(2): p. 325-34.
22. Chu, C.S., et al., *NRAGE suppresses metastasis of melanoma and pancreatic cancer in vitro and in vivo*. Cancer Lett, 2007. **250**(2): p. 268-75.
23. Di Certo, M.G., et al., *NRAGE associates with the anti-apoptotic factor Che-1 and regulates its degradation to induce cell death*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 11): p. 1852-8.
24. Wen, C.J., et al., *hNRAGE, a human neurotrophin receptor interacting MAGE homologue, regulates p53 transcriptional activity and inhibits cell proliferation*. FEBS Lett, 2004. **564**(1-2): p. 171-6.
25. Jordan, B.W., et al., *Neurotrophin receptor-interacting mage homologue is an inducible inhibitor of apoptosis protein-interacting protein that augments cell death*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 39985-9.
26. Bertrand, M.J., et al., *NRAGE, a p75NTR adaptor protein, is required for developmental apoptosis in vivo*. Cell Death Differ, 2008. **15**(12): p. 1921-9.
27. Kuwajima, T., et al., *Necdin interacts with the Msx2 homeodomain protein via MAGE-D1 to promote myogenic differentiation of C2C12 cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(39): p. 40484-93.
28. Masuda, Y., et al., *Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptional function*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 5331-8.
29. Sasaki, A., et al., *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, 2002. **277**(25): p. 22541-6.
30. Zhang, H., et al., *Heterodimerization of Msx and Dlx homeoproteins results in functional antagonism*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(5): p. 2920-32.
31. Lessmann, V., K. Gottmann, and M. Malcangio, *Neurotrophin secretion: current facts and future prospects*. Prog Neurobiol, 2003. **69**(5): p. 341-74.
32. Salehi, A.H., et al., *NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis*. Neuron, 2000. **27**(2): p. 279-88.
33. Andrieu, D., et al., *Expression of the Prader-Willi gene Necdin during mouse nervous system development correlates with neuronal differentiation and p75NTR expression*. Gene Expr Patterns, 2003. **3**(6): p. 761-5.
34. Nakada, Y., et al., *The human chromosomal gene for necdin, a neuronal growth suppressor, in the Prader-Willi syndrome deletion region*. Gene, 1998. **213**(1-2): p. 65-72.
35. Lau, J.C., M.L. Hanel, and R. Wevrick, *Tissue-specific and imprinted epigenetic modifications of the human NDN gene*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(11): p. 3376-82.
36. Kuwako, K., et al., *Disruption of the paternal necdin gene diminishes TrkA signaling for sensory neuron survival*. J Neurosci, 2005. **25**(30): p. 7090-9.
37. Uetsuki, T., et al., *Structure and expression of the mouse necdin gene. Identification of a postmitotic neuron-restrictive core promoter*. J Biol Chem, 1996. **271**(2): p. 918-24.
38. Tompers, D.M. and P.A. Labosky, *Electroporation of murine embryonic stem cells: a step-by-step guide*. Stem Cells, 2004. **22**(3): p. 243-9.
39. Beard, C., et al., *Efficient method to generate single-copy transgenic mice by site-specific integration in embryonic stem cells*. Genesis, 2006. **44**(1): p. 23-8.
40. Soriano, P., *Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain*. Nat Genet, 1999. **21**(1): p. 70-1.
41. Srinivas, S., et al., *Cre reporter strains produced by targeted insertion of EYFP and ECFP into the ROSA26 locus*. BMC Dev Biol, 2001. **1**: p. 4.
42. Hohenstein, P., et al., *High-efficiency Rosa26 knock-in vector construction for Cre-regulated overexpression and RNAi*. Pathogenetics, 2008. **1**(1): p. 3.

43. Abremski, K., et al., *Bacteriophage P1 Cre-loxP site-specific recombination. Site-specific DNA topoisomerase activity of the Cre recombination protein.* J Biol Chem, 1986. **261**(1): p. 391-6.
44. Raymond, C.S. and P. Soriano, *High-efficiency FLP and PhiC31 site-specific recombination in mammalian cells.* PLoS One, 2007. **2**(1): p. e162.