



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Contribution à la caractérisation des propriétés oncogénique du gène MAGEA1 humain et évaluation de sa fonction dans un contexte murin

Vermeulen, Maxime

Award date:
2015

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.

UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

**Contribution à la caractérisation des propriétés oncogénique de MAGEA1 et
évaluation de sa fonction dans un contexte murin**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire
Maxime Vermeulen
Janvier 2015**

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

Contribution à la caractérisation des propriétés oncogénique du gène MAGEA1 humain et évaluation de sa fonction dans un contexte murin

Vermeulen Maxime

Résumé

Les gènes et protéines MAGEA (Melanoma Antigen Gene A) sont exprimés dans différents histotypes de tumeurs mais sont silencieux dans les cellules normales à l'exception des cellules germinales mâles. Plusieurs études suggèrent que leur expression pourrait fournir un avantage aux cellules cancéreuses. En effet, celle-ci a été associée avec des stades plus avancés de la pathologie, le développement de métastases et une résistance accrue aux traitements chimiothérapeutiques. Au niveau moléculaire, plusieurs protéines MAGEA réduisent l'activité et le niveau du suppresseur de tumeur p53. Afin d'évaluer le rôle de MAGEA1 dans l'oncogenèse, un modèle de souris transgénique exprimant la protéine MAGEA1 humaine de manière inductible a été développé dans notre laboratoire. L'objectif de ce travail était de caractériser l'expression de MAGEA1 dans les tissus de ces souris et de vérifier sa capacité à exercer ses fonctions dans un contexte cellulaire de souris. Ceci a été réalisé en étudiant l'effet de l'expression de MAGEA1 sur le niveau et sur l'activité de p53 dans plusieurs types cellulaires. En parallèle, la capacité de MAGEA1 à conférer une résistance à plusieurs agents chimiothérapeutiques a été évaluée dans des cellules où l'expression de la protéine a été forcée ainsi que dans des cellules primaires dérivées des souris transgéniques. Finalement, un projet visant à déterminer, *in-vivo*, le rôle de MAGEA1 dans l'oncogenèse a été initié en croisant des souris exprimant MAGEA1 de manière ubiquitaire avec des souris générant spontanément des mélanomes.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2015

Promoteur: Olivier De Backer

Tout d'abord, je tiens à remercier mon promoteur, le professeur Olivier De Backer pour la confiance qu'il m'a accordé lors de mon accueil dans son unité et pour le temps qu'il m'a consacré au cours de cette année.

Je remercie également François pour son encadrement depuis le début de ce mémoire jusqu'à son départ ainsi qu'Elise, pour sa patience au cours des corrections mais aussi pour ses conseils avisés.

Je tiens à remercier tout spécialement Olivia, pour tous les petits détails techniques qu'elle a pu m'enseigner mais surtout pour sa patience et sa bonne humeur de tous les jours. Je remercie aussi Coco et Domi pour tout ce qu'elles ont pu me montrer au cours de cette année ainsi que Typhanie et Cédric pour leurs conseils expérimentaux. Dans l'ensemble, je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire de génétique, non seulement pour tout ce qu'ils m'ont appris mais surtout pour leur gentillesse durant cette année.

Merci également à mes collègues et amis de BBMC, Lucie, Caroline et Olivier ainsi qu'à toute l'équipe du professeur Jean-Pierre Gillet sans qui les temps de midi n'auraient pas été pareil.

Je remercie aussi C. Michiels, B. Flamion, J-P. Gillet et D. Coupeau pour le temps qu'ils ont accordé à la lecture de ce mémoire.

Finalement, je tiens à remercier ma compagne Cécilia ainsi que ma famille qui m'ont soutenu et poussé à donner le meilleur de moi-même tout au long de ce projet.

Table des matières

I.	Introduction.....	6
1.	Découverte des gènes MAGE.....	6
2.	La famille des gènes MAGE.....	6
3.	Evolution et conservation des gènes MAGE.....	7
4.	Gènes MAGE-I.....	8
4.1.	Régulation transcriptionnelle.....	8
4.2.	Expression des gènes MAGE-I dans la lignée germinale mâle.....	9
5.	Fonction des protéines MAGE-I.....	10
5.1.	Contrôle transcriptionnel.....	10
5.2.	Altération des fonctions de p53.....	11
5.3.	MAGE-I et réponse à l'hypoxie.....	14
5.4.	Interaction entre MAGEA11 et le récepteur aux androgènes.....	15
5.5.	Rôle pro-apoptotique des MAGEA.....	15
6.	Implication des gènes MAGE-I dans l'oncogenèse.....	16
7.	Objectifs.....	17
II.	Matériel et méthode.....	18
	<i>Culture cellulaire.....</i>	18
	<i>Génération de particules lentivirales pour l'expression stable de MAGEA1 dans les cellules Hep3B.....</i>	18
	<i>Génération de particules rétrovirales et insertion de la séquence codante de MAGEA1 dans des NIH3T3.....</i>	19
	<i>Génotypage des souris.....</i>	19
	<i>Western-blot.....</i>	20
	Extraction de protéines à partir de cellules.....	20
	Extraction de protéines à partir de tissus.....	20
	Dosage des protéines.....	20
	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide et transfert sur membrane PVDF.....	21
	<i>Extraction de splénocytes primaires.....</i>	21
	<i>Mesure de viabilité cellulaire.....</i>	22
	Test MTT.....	22
	Test MTS.....	22
	<i>Transfection des NIH3T3 par les plasmides p11-4p53, pcDNA1-A1, p21-luc, pRL-Tk et pcDNA3.....</i>	22
	<i>Mesure de l'induction de p21 dans les NIH3T3.....</i>	23
	<i>Transfection des Hep3B par les plasmides p11-4-p53 et pcDNA1-A1.....</i>	23

III. Résultats	25
1) Souris transgéniques	25
2) MAGEA1 et p53	27
3) MAGEA1 et chimiorésistance	34
IV. Perspectives et conclusion	38
V. Références	42

I. Introduction

1. Découverte des gènes MAGE

C'est en 1991 que le gène MAGE-1, renommé depuis MAGEA1, fût identifié par sa capacité à diriger l'expression d'un antigène présenté à la surface de cellules de mélanomes [1]. Les antigènes de surfaces spécifiques des tumeurs suscitent un intérêt grandissant en raison de leur capacité à induire une protection immunitaire anti-tumorale dans des modèles de cancer chez la souris [2]. Ces antigènes de surface sont des peptides reconnus par des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). MAGEA1 code pour une protéine dont la dégradation produit un peptide de ce type.

MAGEA1 est composé de trois exons, les deux premiers sont non codants et le troisième spécifie une protéine de 320 acides aminés. Le séquençage du gène humain a permis d'identifier plus de 60 autres gènes homologues formant la famille des gènes MAGE [3]. Les protéines MAGE partagent un domaine d'environ 200 acides aminés nommé MHD (*MAGE Homology Domain*) dont la fonction est mal connue. Récemment, une étude a montré que le MHD permet aux protéines MAGE d'interagir avec des E3 ubiquitine ligases et de moduler leur activité [4]

2. La famille des gènes MAGE

En fonction de leur profil d'expression dans les tissus, les gènes MAGE peuvent être répartis en deux grandes familles : les MAGE de type I (MAGE-I) et ceux de type II (MAGE-II). Les membres de chacune des deux familles se répartissent en sous-familles en fonction de la ressemblance de leur séquence et de leur proximité physique sur les chromosomes (**Figure 1**) [3][5].

Les gènes MAGE-I sont souvent exprimés dans les cellules cancéreuses mais sont silencieux dans les cellules normales, excepté dans certaines cellules de la lignée germinale. Certains sont aussi exprimés dans le placenta. Pour cette raison, on les qualifie parfois de « cancer testis antigens » ou de « cancer germline antigens ».

Le gène MAGEA1 fait partie d'un groupe de 12 gènes (MAGEA1 à 12) organisés en chapelet dans la région Xq28 qui forment la sous famille MAGEA. Deux autres sous-familles de MAGE-I, les MAGEB (18 gènes) et les MAGEC (7 gènes), ont été identifiés sur le chromosome X, respectivement dans les régions p21 et q27-28. La structure de ces gènes est semblable à celle de MAGEA1 avec un seul exon codant.

Contrairement aux MAGE-I, les MAGE-II (15 gènes chez l'homme) sont exprimés dans de nombreux tissus normaux adultes et embryonnaires. Certains d'entre eux sont localisés sur des autosomes. Certains MAGE-II (les MAGED) ont plusieurs exons codants. Une autre différence est que les extrémités C- et/ou N-terminales des protéines MAGE-II sont plus longues que celles des MAGE-I [6]. La fonction des protéines MAGE-II n'est pas encore

bien établie. Certaines d'entre elles telles que NECDIN et MAGED1 sont impliquées dans la régulation de la prolifération, de la survie et de la différenciation dans le système nerveux [7][8][9][10].

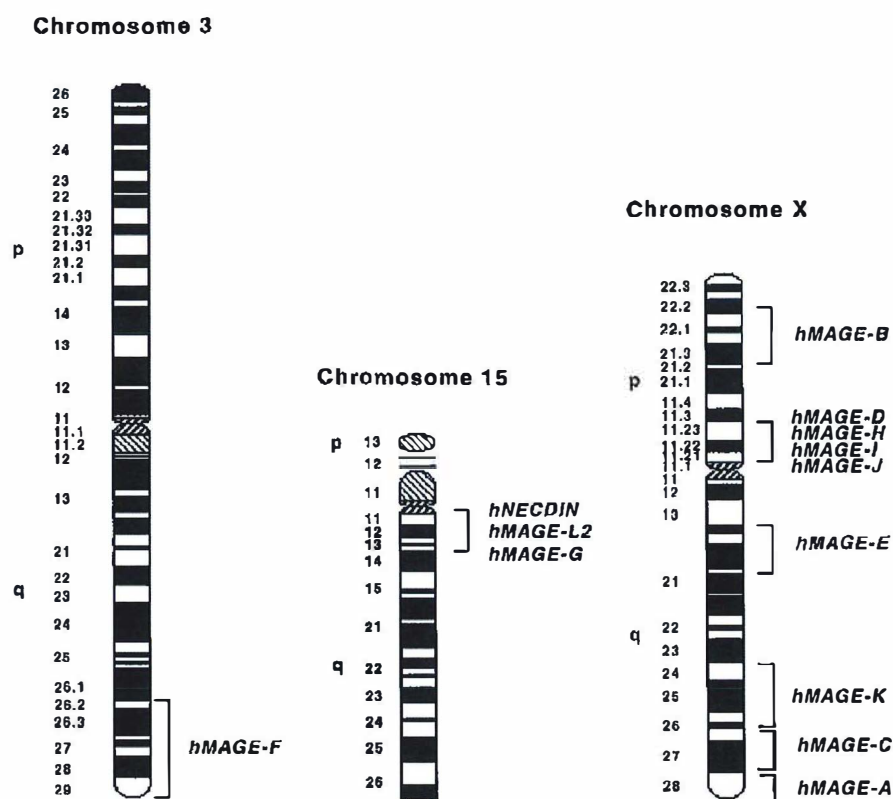


Figure 1 : Localisation chromosomique des gènes MAGE humains[3].

3. Evolution et conservation des gènes MAGE

Les premiers gènes MAGE de souris (Mage-b1, -b2 et -b3) ont été identifiés par De Backer et al. en utilisant une sonde correspondant à une partie du gène MAGEA1 humain [11][12]. D'autres gènes Mage de la souris ont été identifiés par la suite et forment les familles Mage-a et Mage-b [3]. La structure et la localisation des gènes Mage de souris sont semblables à celle des gènes humains : la majorité des gènes sont localisés sur le chromosome X et comportent une ORF entièrement comprise dans le dernier exon. Comme chez l'homme, certains gènes Mage de souris sont exprimés spécifiquement dans divers types de cellules cancéreuses et dans certaines cellules de la lignée germinale mâle [13].

Entre l'homme et la souris, les gènes MAGE-I sont peu conservés (beaucoup moins que la moyenne des gènes) (**Tableau**) [14]. Les gènes de souris les plus proches de MAGEA1 sont Mage-a6 (58% d'identité de séquence nucléotidique) Mage-a5 et Mage-a8 (42% de similarité de séquence d'acide aminés). A l'exception des MAGED (contenant treize exons dont onze codant la protéine) les autres gènes MAGE présentent une structure moins complexe dont la séquence codante se situe dans un seul exon. Ceci suggère qu'un gène

MAGE a subi des événements de rétrotranspositions qui sont à l'origine des autres sous-familles de gènes MAGE [12]. L'émergence et l'expansion des MAGE-I n'est observée que chez les mammifères euthériens après leur séparation des marsupiaux alors que les gènes MAGE-II étaient déjà présents plus tôt au cours de l'évolution [15][16].

Percentage Identity of the Human *MAGE* and Murine *Mage* Coding Sequences and Putative Protein Sequences

	<i>Mage-a1</i>	<i>Mage-a2</i>	<i>Mage-a3</i>	<i>Mage-a4</i>	<i>Mage-a5</i>	<i>Mage-a6</i>	<i>Mage-a8</i>
<i>MAGE-A1</i>	57 (39) ^a	57 (39)	57 (41)	53 (38)	55 (42)	58 (41)	55 (42)
<i>MAGE-A2</i>	54 (39)	54 (39)	54 (39)	48 (39)	54 (40)	54 (41)	54 (40)
<i>MAGE-A3</i>	41 (39)	40 (39)	42 (39)	48 (38)	42 (39)	54 (41)	41 (38)
<i>MAGE-A4</i>	54 (40)	55 (39)	54 (41)	52 (40)	56 (41)	55 (42)	55 (41)
<i>MAGE-A6</i>	41 (39)	41 (39)	43 (39)	49 (38)	43 (39)	54 (41)	41 (38)
<i>MAGE-A8</i>	51 (44)	52 (43)	55 (43)	52 (38)	45 (45)	45 (40)	44 (43)
<i>MAGE-A9</i>	52 (39)	52 (39)	51 (38)	54 (37)	55 (41)	52 (41)	51 (39)
<i>MAGE-A10</i>	58 (46)	58 (46)	59 (47)	60 (48)	61 (47)	59 (48)	54 (47)
<i>MAGE-A11</i>	47 (41)	47 (41)	56 (42)	54 (41)	47 (42)	58 (43)	47 (41)
<i>MAGE-A12</i>	54 (38)	54 (38)	54 (39)	51 (39)	54 (39)	51 (40)	54 (40)
<i>MAGE-B1</i>	46 (34)	47 (34)	46 (34)	50 (33)	46 (38)	45 (35)	46 (34)
<i>MAGE-B2</i>	45 (34)	46 (34)	51 (35)	46 (32)	51 (36)	46 (36)	51 (36)
<i>MAGE-B3</i>	46 (37)	45 (37)	44 (38)	43 (34)	45 (38)	44 (38)	54 (38)
<i>MAGE-B4</i>	51 (41)	51 (41)	51 (41)	52 (40)	49 (42)	48 (42)	50 (41)
<i>MAGE-C1</i>	56 (44)	56 (44)	55 (46)	38 (46)	50 (44)	54 (45)	55 (43)
<i>Mage-b1/2</i>	34 (33)	34 (33)	35 (35)	31 (35)	35 (35)	35 (35)	34 (33)
<i>Mage-b3</i>	34 (34)	35 (33)	35 (35)	43 (35)	35 (36)	35 (35)	34 (34)
<i>dam1^b</i>	35 (35)	34 (35)	34 (36)	50 (37)	36 (36)	33 (35)	40 (35)
<i>Mage-a1</i>	100	99 (98)	97 (95)	84 (70)	97 (96)	97 (93)	97 (95)
<i>Mage-a2</i>		100	98 (96)	84 (69)	98 (97)	96 (92)	98 (95)
<i>Mage-a3</i>			100	83 (69)	97 (95)	96 (93)	97 (94)
<i>Mage-a4</i>				100	85 (71)	83 (65)	84 (69)
<i>Mage-a5</i>					100	96 (93)	97 (96)
<i>Mage-a6</i>						100	96 (93)
<i>Mage-a8</i>							100

Tableau présentant le pourcentage de similarité entre les séquences en nucléotides et en acides aminés entre les gènes MAGE murins ainsi qu'avec leurs orthologues humains[14].

4. Gènes MAGE-I

4.1. Régulation transcriptionnelle

Afin de déterminer la façon dont l'expression des gènes MAGE-I est régulée, une étude du promoteur de MAGEA1 a été réalisée par le groupe de C. De Smet. Des sites de liaison pour des facteurs de transcription de la famille Ets ont été identifiés [17]. Ces facteurs Ets sont exprimés et actifs de manière ubiquitaire et leur implication ne peut pas expliquer l'expression spécifique de MAGEA1 dans les cellules germinales et cancéreuses. Un facteur essentiel du contrôle de l'expression de MAGEA1 est le statut de méthylation de son promoteur. Deux régions principales contrôlant l'activation transcriptionnelle de MAGEA1 sont localisées à proximité d'ilots CpG qui, lorsqu'ils sont méthylés, inhibent la liaison des facteurs Ets à l'ADN. L'expression de MAGEA1 peut être induite dans des cellules cancéreuses ou normales par un traitement avec l'agent déméthylant 5-aza-2-déoxycytidine. L'analyse du niveau de méthylation de l'ADN a montré que les cellules tumorales exprimant MAGEA1 avaient un niveau de méthylation des CpG de 29% alors qu'il était de 52% dans les cellules tumorales n'exprimant pas MAGEA1. La déméthylation de la région promotrice de MAGEA1 serait ainsi le mécanisme responsable de son expression dans les cellules cancéreuses. Il semble que ce mécanisme de régulation soit

identique pour les autres MAGE-I [18][19]. C. De Smet et al. ont également montré que l'hypométhylation de la région promotrice de MAGEA1 dans les cellules cancéreuses serait le résultat d'un processus de déméthylation transitoire suivi d'une inhibition de la reméthylation par certains facteurs de transcriptions [20].

En 2006, Schwarzenbach et al. ont montré que, outre la méthylation, la régulation de l'expression de plusieurs gènes MAGE-I était aussi contrôlée par l'acétylation des histones [21]. En effet, un traitement des cellules par la trichostatine A, un inhibiteur d'histones déacétylase (HDAC), augmentait l'induction de MAGEA1, -A2, -A3 et -A12 provoquée par la déméthylation de l'ADN.

L'existence de mécanismes de régulation post transcriptionnels des gènes MAGEA a été mise en évidence par Weeraratne et al qui ont montré que miR34-a peut cibler une région 3' non traduite des gènes MAGEA et induire une diminution des protéines qu'ils spécifient [22].

4.2. Expression des gènes MAGE-I dans la lignée germinale mâle

Leur profil d'expression indique que les gènes MAGE pourraient avoir un rôle dans la spermatogenèse. Au cours de celle-ci, les spermatogonies subissent des divisions rapides. Ces spermatogonies se différencient en spermatocytes primaires (diploïdes) puis, au cours de la méiose, en spermatocytes secondaires (haploïdes) qui se divisent à leur tour pour produire des spermatides. Au cours de la spermiogenèse, les spermatides subissent des modifications et deviennent des spermatozoïdes matures qui seront libérés dans la lumière des tubules séminifères.

En 1995, Vennström et al. ont montré par hybridation *in-situ* que les gènes Mage-b étaient exprimés par les spermatides [23]. Une autre étude a montré l'expression des gènes Mage de souris diffère en fonction des stades de maturation des cellules spermatogéniques [24].

Chez l'homme, les protéines MAGEA1 et MAGEA4 sont présentes dans le noyau et dans le cytoplasme des spermatogonies et des spermatocytes primaires [25].

Ces observations suggèrent l'existence d'un rôle des gènes MAGE-I au cours de la spermatogenèse et que les protéines des différentes sous-familles sont impliquées dans des étapes distinctes de ce processus.

5. Fonction des protéines MAGE-I

5.1. Contrôle transcriptionnel

En 2004, grâce à la technique du double hybride, l'équipe de E. De Plaen et T. Boon a montré que MAGEA1 est capable d'interagir avec la protéine adaptatrice SKIP. Cette protéine est impliquée dans diverses voies de signalisation et joue le rôle d'adaptateur entre des facteurs de transcription (qui se lient à l'ADN) et des protéines activant ou réprimant la transcription.

Une des voies de signalisation dans laquelle SKIP est impliquée est la voie Notch1. Cette protéine est un récepteur transmembranaire important pour la communication intercellulaire au cours du développement. Lors de la liaison d'un ligand au récepteur Notch, ce dernier subit un double clivage suite à l'action de deux protéases. Le fragment cytoplasmique de Notch, Notch1 IC, migre alors vers le noyau où il joue un rôle d'activateur transcriptionnel en s'associant notamment avec la protéine de liaison à l'ADN CBF1 (C-promoter binding factor 1). CBF1 a normalement un rôle d'inhibiteur de la transcription via son interaction avec SKIP et un complexe corépresseur contenant des HDACs (histones deacetylases) (**Figure 2 i**). Lors du clivage de Notch, cette inhibition est levée suite à l'interaction de Notch1 IC avec SKIP et se poursuit par le recrutement d'un complexe contenant des HAcS (histones acetyltransferases) et d'autres co-activateurs transcriptionnels, menant à une augmentation de l'activité transcriptionnelle des gènes cibles de Notch [26] (**Figure 2 ii**).

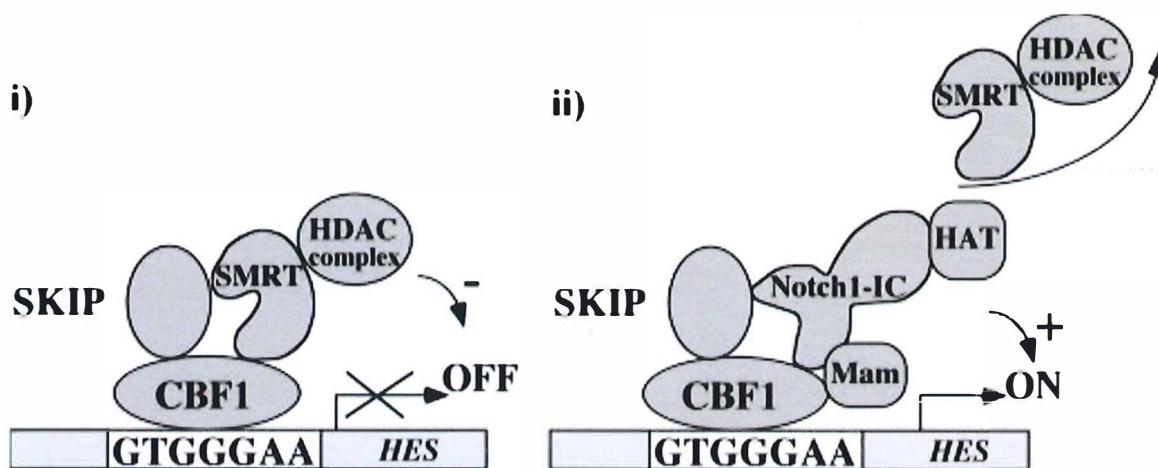


Figure 2 : Représentation schématique de l'activation de ses gènes cible par Notch1 [26].

Il semble que l'activation transcriptionnelle exercée par Notch1 IC puisse être inhibée par MAGEA1 qui dissocierait la liaison entre Notch1 IC à SKIP ou masquerait le domaine d'activation de Notch1 IC. En plus de sa faculté à lier la protéine adaptatrice SKIP, MAGEA1 serait capable de recruter HDAC1, ce qui entrainerait une modification de la conformation chromatinienne [26].

5.2. Altération des fonctions de p53

Différentes études ont montré que les protéines MAGE-I interfèrent avec p53 par plusieurs mécanismes. Avant de parler de la relation MAGE-p53, il est nécessaire de passer en revue les fonctions de cette protéine.

Le facteur de transcription p53 spécifié par le gène TP53 est muté dans plus de 50% des cancers. p53 est impliquée dans des processus importants pour le maintien de l'intégrité génomique et joue un rôle dans les mécanismes de réparation de l'ADN, dans le contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la sénescence. Divers types de stress peuvent activer cette protéine tels que les dommages à l'ADN, l'hypoxie ou l'activation d'oncogènes [27].

En absence de stress, p53 est maintenu à un faible niveau dans les cellules normales suite à son ubiquitination par l'ubiquitine ligase Mdm2 suivie de sa dégradation par la voie du protéasome. Son temps de demi-vie est alors évalué à maximum vingt minutes en fonction du type cellulaire. En condition de stress, ce temps de demi-vie augmente et peut être de plusieurs heures. En effet, lorsqu'une cellule subit un stress, celui-ci active des protéines capables d'augmenter la demi-vie de p53 soit en lui apportant directement des modifications soit en inhibant son ubiquitination par Mdm2. Cette dernière est considérée comme la principale protéine responsable de la régulation de p53 mais d'autres ubiquitine ligase E3 ont été identifiées et jouent un rôle dans le contrôle de la stabilité et de la dégradation de p53 [28].

Lorsque l'action de ces ubiquitine ligases est abolie, p53 s'accumule dans la cellule et subit des modifications supplémentaires telles que des acétylations et des phosphorylations à des sites spécifiques permettant sa stabilisation et augmentant sa capacité de liaison à l'ADN. Une fois lié à une séquence cible, p53 recrute des cofacteurs et entraîne une activation ou une répression de la transcription qui favorisera l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la sénescence ou l'apoptose [29]. Par ces mécanismes, p53 protège les cellules de la transformation cellulaire, ce qui explique qu'une perte de fonction de p53 fournisse un avantage décisif à la progression des tumeurs.

Dans une cellule normale, il y a un équilibre entre le taux de protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, NOXA,...) et anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL). Lorsqu'il est activé, p53 augmente l'activité transcriptionnelle de gènes pro-apoptotiques et réprime celle de gènes anti-apoptotiques. Suite au déséquilibre, les facteurs pro-apoptotiques Bak et Bax s'oligomérisent et forment des pores dans la membrane mitochondriale permettant la libération du cytochrome c depuis l'espace intermembranaire de la mitochondrie et le déclenchement de l'apoptose via la voie intrinsèque. p53 peut aussi activer la voie extrinsèque du processus apoptotique en augmentant la transcription du gène Fas [30].

Finalement, p53 peut former un complexe avec les molécules anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL. Par ce mécanisme ne faisant pas intervenir ses propriétés de facteur de

transcription, p53 permet la libération du cytochrome c et le déclenchement du processus d'apoptose [31].

5.2.1. Recrutement d'histones déacétylases

Nous avons vu que MAGEA1 est capable de réprimer certains gènes en recrutant des HDACs [26]. En 2006, Monte et al. ont montré que MAGEA2 est capable de s'associer avec p53 et de réduire ses fonctions d'activateur transcriptionnel en recrutant l'histone déacétylase 3 (HDAC3). Cette dernière serait responsable d'une inactivation des fonctions de transactivations de p53 en déacétylant p53 lui-même ainsi que les histones situées à proximité des séquences d'ADN liées par p53 [32]. MAGEA2 serait ainsi capable, en recrutant des HDAC au niveau de sites de liaisons de p53, de transformer ce dernier en répresseur transcriptionnel.

5.2.2. Interaction directe avec p53

Dans une autre étude, Marcar et al. ont montré que plusieurs protéines MAGEA (-2 et -6) peuvent interagir directement avec p53 au niveau de son domaine de liaison à l'ADN. La répression des gènes MAGEA dans des cellules cancéreuses entraînait une augmentation de l'expression de plusieurs cibles de p53 telles que p21 et PUMA. Il semble donc que les protéines MAGE-I soient capables d'inhiber les fonctions transcriptionnelles de p53 en empêchant sa liaison aux promoteurs de ses gènes cibles [33].

5.2.3. Interaction avec des ubiquitines ligases E3 à domaines RING

Une étude consacrée à des protéines MAGE-I murines et humaines a montré que certaines d'entre elles sont capables d'interagir avec la protéine KAP1 (KRAB-associated protein) aussi connu sous le nom de TRIM28 [34]. Cette protéine a la capacité de se lier aux protéines de la famille des KRAB-zinc finger proteins (KRAB-ZFP) qui sont connues pour leur rôle dans la répression de la transcription [35]. Même si elles possèdent un domaine de liaison à l'ADN, les KRAB-ZFP ont besoin de corépresseurs pour assurer la répression de leurs gènes cibles. KAP1, via son domaine RING, peut se lier aux KRAB-ZFP et jouer le rôle de corépresseur.

Lorsqu'une KRAB-ZFP reconnaît la séquence de l'une de ses cibles, elle s'y lie et recrute KAP1 qui va former une sorte d'échafaudage permettant la formation d'un complexe de répression formé d'histones déacétylases, d'histones méthylases et d'autres protéines provoquant la condensation de la chromatine et donc une diminution de l'activité transcriptionnelle [36].

KAP1 est également capable d'interagir avec Mdm2 qui possède aussi un domaine RING. Comme nous l'avons vu plus haut, cette protéine joue un rôle majeur dans la régulation des fonctions de p53 principalement en provoquant sa dégradation par le protéasome suite à son ubiquitination. Mdm2 est également capable de bloquer les fonctions de p53 en masquant son domaine de transactivation, en empêchant son acétylation ou en recrutant des HDAC

responsables de sa déacétylation. KAP1 est ainsi capable de moduler les fonctions de p53 via son interaction avec Mdm2. Notamment, KAP1 inhibe l'acétylation de p53 en recrutant des HDAC au complexe p53/Mdm2/KAP1, diminuant ainsi la capacité de p53 à se lier aux promoteurs de ses gènes cibles [37]. KAP1 peut cependant interagir avec p53 indépendamment de Mdm2 [4].

La répression de l'expression de MAGE-I par interférence ARN dans des cellules de mélanomes entraîne une diminution de la formation de complexes p53-KAP1, de la prolifération, de la viabilité et induit l'apoptose. Aucun effet sur la viabilité n'a été constaté après répression des MAGE dans les cellules cancéreuses HTC116 qui sont déficientes en p53 indiquant que l'inhibition de l'apoptose par les protéines MAGE-I est due à leur effet sur p53 [34].

Plus récemment, les interactions entre les protéines MAGE et les protéines E3 ligases à domaine RING ont été mieux définies. En 2010, Doyle et al. ont étudié les interactions entre quatorze protéines MAGE et cinq E3 ligases à domaine RING. Les protéines MAGE se lient aux protéines à domaine RING via leur MHD mais de façon inattendue, cette interaction n'implique pas le domaine RING. Différentes associations MAGE/RING ont été identifiées. Par exemple, MAGEA2, -A3, -A6 et -C2 sont capables d'interagir avec KAP1 ; MAGEB18 interagit avec LNX1 ; MAGEF1 et MAGEG1 interagissent avec NSE1 [4].

Les protéines à domaines RING constituent une grande famille d'ubiquitine ligase E3. Ces protéines sont bien connues pour leur rôle dans la cascade d'ubiquitination. Cette dernière se déroule en plusieurs étapes. Dans un premier temps, l'ubiquitine est activée par une première enzyme (E1), l'enzyme d'activation de l'ubiquitine. Une enzyme de conjugaison (E2) permet ensuite le transfert de l'ubiquitine activée sur une cible grâce à son interaction avec une ubiquitine ligase (E3). La polyubiquitination de la protéine cible permet sa reconnaissance et sa dégradation par le protéasome. Les travaux de Doyle et al. ont démontré que MAGEG1 et MAGEC2 augmentent l'activité E3 ligase de NSE1 et de KAP1 respectivement. NSE1 possède uniquement une activité d'auto-ubiquitination, l'augmentation de son activité E3 ligase entraîne une augmentation de son ubiquitination et de sa dégradation. En revanche, l'augmentation de l'activité ubiquitine ligase de KAP1 par MAGEC2 est responsable d'une augmentation de sa propre ubiquitination mais aussi de l'ubiquitination et de la dégradation de sa cible p53 par le protéasome [38]. Cette découverte est en accord avec les observations précédentes associant l'expression des gènes MAGE-I avec une augmentation de la viabilité et une réduction de l'apoptose dépendante de p53.

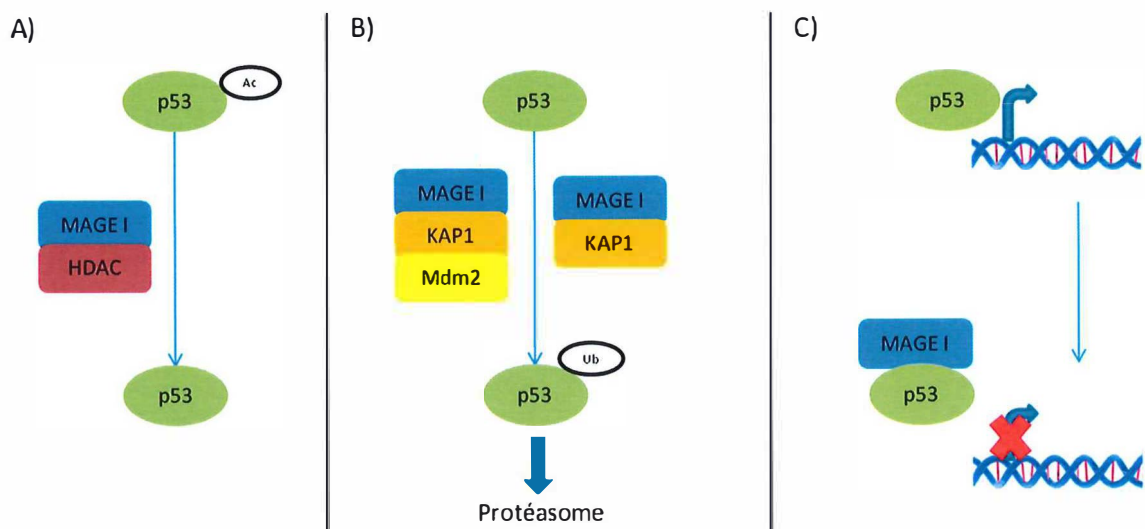


Figure 3 : Action des protéines MAGE-I sur les fonctions de p53. (A) Recrutement d'HDAC par les protéines MAGE-I induisant l'inactivation des fonctions de transactivation de p53 suite à la déacétylation de p53 et des histones à proximité des régions d'ADN liées par p53. (B) Le renforcement de l'activité ubiquitine ligase de KAP1 par les protéines MAGE-I augmente l'ubiquitination et la dégradation de p53 par le protéasome. KAP1 peut aussi coopérer avec Mdm2 pour stimuler cette ubiquitination. (C) Les protéines MAGE-I peuvent empêcher l'interaction de p53 avec ses gènes cibles en se fixant à son site de liaison à l'ADN.

5.3. MAGE-I et réponse à l'hypoxie

Lors du développement d'une tumeur, il arrive un moment où les cellules situées au centre de la masse sont à une distance trop importante des vaisseaux sanguins pour recevoir une oxygénation correcte, on parle dès lors d'hypoxie. Pour faire face à ce manque d'oxygène, les cellules sont capables de s'adapter en activant la transcription de gènes impliqués dans des processus importants tels que la stimulation de l'angiogenèse et du métabolisme du glucose. Par exemple, en cas de privation d'oxygène, le facteur de transcription HIF est capable d'activer la transcription du VEGF (Vascular Endothelial cell Growth Factor), permettant le recrutement et la prolifération de cellules endothéliales afin d'augmenter la vascularisation du site hypoxique [39].

Le facteur HIF se présente sous la forme d'un hétérodimère composé d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Les sous-unités β sont présentes de manière constitutive dans la cellule, en revanche, les sous-unités α subissent une régulation qui dépend de la quantité d'oxygène disponible. En condition de normoxie, l'hydroxylation de deux résidus localisés sur les sous-unités α par des enzymes PHD (prolyl hydroxylases) permet leur interaction avec l'ubiquitine ligase VHL (Von Hippel Lindau), ce qui entraîne leur dégradation par le protéasome. En cas d'hypoxie, les sous-unités α sont stabilisées et transloquées dans le noyau où elles s'hétérodimérisent avec les sous-unités β et activent la transcription de gènes cibles. Aprelikova et al. ont montré que MAGEA9 et MAGEA11 sont capables d'interagir avec la PHD2. En inhibant l'activité de PHD2, MAGEA11 pourrait contribuer à la stabilisation des sous-unités α permettant l'activation du facteur HIF et une activation de la réponse hypoxique [40]. Par ce mécanisme, MAGEA11 pourrait ainsi contribuer au switch

angiogénique caractéristique de la croissance tumorale. De plus, le facteur HIF est impliqué dans la régulation des processus prolifératifs et invasifs des cellules ce qui implique qu'une augmentation de son activité pourrait s'associer avec un avantage pour les cellules malignes [39]

5.4. Interaction entre MAGEA11 et le récepteur aux androgènes

Le récepteur aux androgènes (RA) est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de gènes importants pour le développement et le maintien des fonctions sexuelles mâle. Son activation dépend principalement d'une interaction avec deux hormones androgènes : la testostérone et la dihydrotestostérone (DHT). Une fois activé par un de ses ligands, le RA est transloqué vers le noyau où il module la transcription de ses gènes cibles. Deux domaines du récepteur doivent interagir pour assurer la fonction transcriptionnelle. Le premier nommé AF1 correspond au domaine d'activation et est situé dans la partie N-ter. Le second, AF2, est situé dans la partie C-ter et contient une séquence permettant l'interaction avec des co-activateurs mais également avec le domaine AF1. L'interaction N-ter/C-ter est importante pour la stabilisation de la liaison du récepteur à l'ADN et pour la stabilité de la liaison ligand-RA. Cette interaction est donc nécessaire pour assurer l'activité transcriptionnelle maximale du récepteur [41].

Suxia et al. ont montré que MAGEA11 peut servir de protéine corégulatrice et modifier l'interaction N-ter/C-ter du RA. En effet, MAGEA11 est capable de se lier à la région N-ter du récepteur et d'augmenter son activité transcriptionnelle en augmentant l'exposition de la région AF2 à des protéines co-activatrices. MAGEA11 pourrait aussi être ubiquitinylé et phosphorylé lors de l'activation de la voie de signalisation dépendante de l'EGF, ce qui permettrait la stabilisation du complexe RA-MAGEA11-DHT et entraînerait une augmentation de l'activité transcriptionnelle du RA. De cette manière, MAGEA11 pourrait jouer un rôle dans la progression de cancers prostatiques dépendant des androgènes [42].

5.5. Rôle pro-apoptotique des MAGEA

La protéine gankyrine est surexprimée dans les hépatocarcinomes. Cette protéine provoque la dérégulation du cycle cellulaire en accélérant la phosphorylation et la dégradation de la protéine Rb [43]. La gankyrine interagit aussi avec MDM2 et augmente la dégradation de p53 via la voie du protéasome [44]. De part ces activités, cette protéine semble jouer un rôle important dans la progression des hépatocarcinomes.

Par double hybride, Nagao et al ont montré qu'un fragment C-terminal de MAGEA4 est capable de se lier à la gankyrine. Lors d'expérience *in vitro*, l'expression de MAGEA4 réduisait la croissance de fibroblastes transformés surexprimant la gankyrine. *In vivo*, la croissance de tumeurs associées avec une expression de la gankyrine était fortement réduite chez des souris dans lesquelles l'expression de MAGEA4 était induite. Ces données suggèrent que MAGEA4 est capable de se lier à la gankyrine et de supprimer son activité d'oncogène [45].

Plus tard, il a été montré qu'un fragment C-ter résultant du clivage de MAGEA4 possède une activité pro-apoptotique. En s'associant à un facteur de transcription nommé Miz-1, ce fragment est capable d'inhiber p21 et dans le même temps de stimuler l'expression de p53. Il est également capable de perturber l'intégrité de la membrane mitochondriale et de diminuer l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-XL résultant en une activation de l'apoptose de manière indépendante de p53 après activation de la caspase 9 [46]. Ces observations vont dans le sens opposé de la majorité de celles qui ont été réalisées montrant plutôt un effet anti-apoptotique des gènes MAGE-I.

6. Implication des gènes MAGE-I dans l'oncogenèse

Au cours de la transformation et de la formation d'une tumeur maligne, une série de modifications génétiques et épigénétiques aléatoires se produisent. Parmi celles-ci (les modifications « driver »), certaines vont augmenter le fitness des cellules (leur capacité à produire une descendance) en leur conférant un avantage et seront retenue par la sélection. La plupart des modifications (« passagers ») sont cependant sans effet positif sur le fitness [47]. L'expression des MAGE-I résulte probablement d'une déméthylation globale ou régionale qui affecte le promoteur de ces gènes mais on ignore si cette expression confère un avantage aux cellules de la tumeur. Nous avons vu que plusieurs observations réalisées *in-vitro* suggèrent que les MAGE-I pourraient avantager les cellules dans un contexte tumoral, notamment en inhibant les fonctions de p53. Plusieurs données cliniques soutiennent cette hypothèse. Par exemple, l'expression de MAGEA10 et MAGEA11 au sein de septante-cinq tumeurs mammaires a révélé que ceux-ci sont exprimés dans 75% (MAGEA10) et 52% (MAGEA11) de celles-ci et que le taux de survie est plus important chez les patients présentant une tumeur négative pour l'expression de MAGEA11 [48]. Une autre étude a associé l'expression de ces gènes avec le stade de la pathologie, un mauvais pronostic pour le patient ainsi qu'avec une augmentation des capacités d'invasion et de métastase des cellules tumorales [49]. Cependant, dans les tumeurs plus avancées, le chaos génétique/épigénétique est plus important ce qui pourrait aussi expliquer que l'expression des MAGE-I soit plus fréquente.

Les cellules exprimant les gènes MAGE-I présentent également une résistance accrue aux traitements chimiothérapeutiques. Duan et al ont montré une corrélation entre la résistance de cellules à la doxorubicine et au paclitaxel et l'expression des gènes MAGEA2 et A6. De plus, l'expression forcée de ces gènes dans des cellules sensibles induisait une résistance modérée à ces deux drogues [50]. En étudiant des cellules de mélanomes humain, Monte et al ont montré que l'expression de MAGEA2 confère une résistance des cellules à l'étoposide en empêchant l'induction de l'apoptose par p53 grâce à des mécanismes de déacétylations [32]. Récemment, l'expression des gènes MAGEA a aussi été associée avec un échec du traitement au tamoxifen de cancers du sein et avec une accélération de la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffes murins [51].

Une expression de MAGEA3 dans un modèle de xénogreffe de cancer thyroïdien a également montré une accélération de la prolifération ainsi qu'une augmentation du

caractère invasif et migratoire de ces cellules [52]. En 2007, Yang et al ont montré que l'inhibition des Mage-b par interférence ARN dans des cellules de mélanomes de souris entraîne une inhibition de la croissance tumorale et une augmentation de la viabilité des souris inoculées avec ces cellules [34].

7. Objectifs

Il est bien établi que les cellules cancéreuses subissent des processus de déméthylation aspécifiques. Ces événements pourraient expliquer l'expression aberrante des gènes MAGE-I dans ces cellules. D'autre part, nous venons de passer en revue une série d'études expérimentales et cliniques dont les résultats indiquent que les gènes MAGE-I pourraient jouer un rôle dans l'oncogenèse. L'objectif général de ce mémoire vise à contribuer aux recherches qui permettront de déterminer si l'expression des gènes MAGE-I facilite l'oncogenèse.

Dans cette optique, des souris transgéniques exprimant le gène MAGEA1 humain de manière inductible ont été obtenues par notre laboratoire. L'objectif de ce projet était de caractériser l'expression de MAGEA1 dans les tissus de ces souris. Cette étude se faisant dans un contexte murin, plusieurs expériences *in-vitro* ont également été réalisées dans le but de vérifier que la protéine MAGEA1 humaine est capable d'y exercer ses fonctions notamment en étudiant son effet sur le niveau de p53. Nous avons aussi évalué l'effet de MAGEA1 sur la résistance de cellules primaires dérivées de ces souris à un stress génotoxique. En parallèle, l'existence d'un possible mécanisme indépendant de p53 a été investiguée dans les cellules Hep3B déficientes pour p53.

II. Matériel et méthode

Culture cellulaire

Les cellules souches embryonnaires de souris (cellules ES) ont été cultivées dans du milieu GMEM (Lanza, BE12739F) contenant 10% de FBS (Sigma, F7524), 1% pénicilline/streptomycine (Lanza, DE17-602E), 1% de Na-Pyruvate (Lanza, BE13-115E), 1% d'acides aminés non essentiels (Lanza, BE13-114E), 0.2% de β -mercaptoéthanol (GIBCO, 31350-010) et 1.5 μ l/ml de facteur d'inhibition de la leucémie (LIF) (ES GRO mLIF, Millipore, ESG1106).

Les cellules embryonnaires de rein humaines 293T (HEK293T), les cellules de carcinome hépatique (Hep3B), les cellules BOSC ainsi que les fibroblastes murins NIH3T3 ont toutes été cultivées dans du milieu DMEM (Lanza, BE12-604F) complété avec 10% de FBS et 1% de pénicilline/streptomycine.

Le milieu de culture des lymphocytes primaires murins était composé de RPMI 1640 supplémenté avec 1mM de L-glutamine (GIBCO, 11875-093), 10% de FBS inactivé, 1% de Na-Pyruvate, 1% de NEAA, 1% de tampon HEPES (Lonza, BE17-737E), 1% de pénicilline/streptomycine et 0.2% de β -mercaptoéthanol. Le milieu était également supplémenté avec 5 μ g/ml de concanavaleine A (Sigma, C0412) pour la stimulation des lymphocytes.

Génération de particules lentivirales pour l'expression stable de MAGEA1 dans les cellules Hep3B

La production de particules lentivirales permettant l'expression de MAGEA1 dans les Hep3B a été réalisée dans des cellules HEK293T. Les cellules ont étéensemencées un jour avant la transfection pour atteindre 70-90% de confluence lors de la celle-ci. La transfection a été réalisée avec le Turbofect Transfection Reagent (Thermo Scientific). Le vecteur lentiviral PTM898 A1 (6 μ g/T75) a permis l'insertion de l'ADNc de MAGEA1 dans les HEK293T et le même vecteur vide PTM898 (6 μ g/T75) a servi pour la transfection de cellules responsables de la production de particules lentivirales contrôles. En même temps, les cellules ont été transfectées avec le plasmide d'empaquetage PMDLg/pRRE (6 μ g/T75), le plasmide pRSV-Rev (3,5 μ g/T75) permettant l'export des ARNm contenant un RRE à partir du noyau et le plasmide mMd2 VSVG (3,5 μ g/T75) permettant l'expression des protéines d'enveloppes virales. Quarante-huit heures après la transfection, les surnageants contenant les particules virales ont été récupérés et centrifugés à 1200 rpm avant d'être filtrés grâce à un filtre de 0,45 μ m.

Les particules ont été utilisées pour infecter les Hep3B et permettre l'expression de MAGEA1. Les cellules ont étéensemencées à 250.000 cellules/puits de 10 cm² la veille de l'infection. Le lendemain, 4 μ g/ml de polybrène (Chemicon International, TR-1003-G) ont

été ajoutés aux surnageants pour augmenter l'efficacité de l'infection. Cinq-cents microlitres de ces surnageants ont été ajoutés à chaque puits. Après une incubation de 7 heures à 37°C, 2 ml de milieu DMEM supplémentés avec 10% FBS et 1% de pénicilline/streptomycine ont été ajoutés à chaque puits. Une semaine après l'infection, les cellules exprimant les vecteurs MAGEA1 ou contrôles ont été sélectionnées en utilisant du milieu contenant 500 µg/ml de néomycine (Roche, 04727878001).

Génération de particules rétrovirales et insertion de la séquence codante de MAGEA1 dans des NIH3T3

Des particules rétrovirales ont été générées pour forcer l'expression de MAGEA1 dans des NIH3T3. Pour cela, les cellules d'emballage BOSC ont été ensemencées dans des plaques 6 puits pour atteindre 70-90% de confluence au moment de la transfection. Toutes les cellules ont été transfectées avec le plasmide pCL-Eco permettant l'expression des gènes Gag, Pol et Env nécessaires à la formation des particules virales. Les cellules destinées à produire des particules virales permettant l'insertion de MAGEA1 dans les NIH3T3 ont été transfectées avec le plasmide pBABE-zeo-MAGEA1 alors que celles destinées à produire des particules pour la production de cellules contrôles l'ont été avec le plasmide pBABE-zeo. La transfection a été réalisée dans du milieu sans antibiotique avec la lipofectamine 2000 (LifeTechnologies, 11668-027) en utilisant 3.5µg du plasmide pCL-Eco et 3.5 µg du plasmide pBABE-zeo-MAGEA1 ou pBABE-zeo par puits. Après cinq minutes d'incubation, le Mix 1 (7 µL de lipofectamine 2000 + 200 µL d'Opti-MEM) est ajouté au Mix2 (7 µg d'ADN + 200 µL d'Opti-MEM). La mixture a été incubée 20 minutes à température ambiante et 400 µL de celle-ci ont été ajoutés par puits. Quatre heures après la transfection, le milieu a été remplacé par du DMEM contenant des antibiotiques (10% FBS, 1% pénicilline/streptomycine). Après 48h, les surnageants contenant les particules virales ont été récupérés, centrifugés 5 minutes à 1200 rpm et filtrés sur un filtre de 0,45µm.

L'infection des NIH3T3 s'est déroulée de manière similaire à celle des Hep3B, les cellules ont été ensemencées la veille de l'infection pour atteindre 30/40% de confluence le jour de l'infection. L'efficacité de l'infection a également été augmentée en utilisant une solution contenant les particules virales et 4 µg/ml de polybrène. Le milieu de chaque puits a été enlevé et 1,5 ml de la solution contenant les particules virales et le polybrène ont été ajoutés sur chaque T25. Sept heures après l'infection, 5 ml de milieu complet ont été ajoutés pour diluer le polybrène toxique pour les cellules. Les cellules ayant intégré les plasmides ont été sélectionnées durant deux semaines en utilisant du milieu complet contenant 300 µg/ml de zéocine (Lifetechnologies, R25001).

Génotypage des souris

Le génotypage des souris a été réalisé par PCR. Pour chacune des souris, l'ADN a été obtenu et extrait à partir d'un morceau de queue. Chaque morceau a été placé dans 200 µl de tampon de lyse (100mM Tris-HCl pH 8, 500mM de KCl et 10% de Tween 20) et chauffé cinq minutes à 95°C. Après avoir ajouté 10 µl de protéinase K (20 µg/ml) permettant l'inhibition

des ADNases, les morceaux de tissus ont été incubés toute la nuit à 55°C. Le lendemain, une nouvelle incubation de cinq minutes à 95°C était réalisée afin d'inactiver la protéinase K suivie d'une centrifugation des échantillons pendant dix minutes à 14.000 rpm. Chaque mix PCR était réalisé comme indiqué dans le tableau pour atteindre un volume final de 20 µl.

	Quantité (µl)
ADN (surnageant)	1
Dreamtaq DNA polymerase (ThermoScientific)	10
Oligo sens	1
Oligo anti-sens	1
H ₂ O	7

Après amplification des fragments spécifiques, leur taille était vérifiée grâce à une électrophorèse sur gel d'agarose (1%) et permettait de déterminer le génotype des souris testées.

Western-blot

Extraction de protéines à partir de cellules

Chaque puit de 10 cm² a été rincé à deux reprises avec du PBS avant d'y ajouter 350 µL de tampon de lyse NP40 (0.05M Tris à pH 8, 0.15M NaCl, 1% Nonidet P40) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Thermo Scientific, 1862209) dilué 100X. Après 10 minutes d'incubation sur glace, les lysats ont été récupérés, centrifugés à 15000 rpm et conservés à -20°C.

Extraction de protéines à partir de tissus

Les tissus ont été récupérés à partir de souris euthanasiées par dislocation cervicale. Chacun d'eux a été pesé et incubé dans 10 volumes de tampon de lyse NP40 contenant des inhibiteurs de protéases. Les tissus ont été broyés grâce au Turrax® et incubés sur glace pendant 15 minutes. Chaque échantillon a ensuite été centrifugé pendant 10 minutes à 15000 rpm. Les surnageants ont été collectés et stockés à -20°C.

Dosage des protéines

La concentration en protéines des échantillons a été déterminée avec le kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, 23225). Une courbe étalon a été réalisée grâce à des dilutions en série de la BSA (Thermo Scientific, 23209) dont la concentration était connue. L'absorbance des échantillons et des dilutions de BSA a été mesurée à 562 nm grâce à un spectrophotomètre. En fonction de l'absorbance des échantillons, leur concentration a été déterminée par rapport à la courbe étalon établie sur base de l'absorbance des différentes dilutions de BSA.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide et transfert sur membrane PVDF

La préparation des échantillons pour la migration s'est faite en diluant 10-50 µg de protéines dans du tampon de Laemli (0,5% de SDS, 10% de glycérol, 6.25mM de Tris pH 6.8, 0.003% de bleu de bromophénol et 25mM de DTT). Chaque échantillon a été placé 5 minutes à 95°C pour assurer la dénaturation des protéines. Ensuite, les échantillons ont été chargés et séparés sur base de leurs poids moléculaire sur un gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis) de 8% suivi d'un transfert sur une membrane de PVDF (Polyvinylidenedifluoride). Après transfert des protéines sur la membrane, celle-ci a été placée dans du PBS 1X, Tween 0.05% et lait 5% pendant une demie heure afin de bloquer les interactions non spécifiques. La détection de MAGEA1 s'est faite grâce à l'anticorps MAGEA1 6C1 (Invitrogen, 356300) 1/500, celle de p53 avec l'anticorps monoclonal CBL404 (Millipore) à une dilution 1/1000 ou avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-p53 (p53 CM5, Leica Biosystem) à une dilution 1/2000. Finalement, la tubuline-α utilisée comme contrôle de charge était reconnue avec l'anticorps monoclonal T51168 (Sigma) utilisé à une dilution 1/10000. Toutes les dilutions d'anticorps ont été réalisées dans du PBS 1X, Tween 20 0.05% et lait 5% et ces derniers ont été incubés toute la nuit à 4°C avec les membranes (ou 2h à température ambiante). Après trois lavages avec dans du PBS 1X, Tween 20 0.05%, les membranes étaient incubées une heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-anticorps de souris ou de lapin couplé à la HRP (Dako, P0447 et P0448) avec une dilution dans du PBS 1X, Tween20 0.05% de 1/2000. Finalement, la révélation était réalisée en utilisant des films autoradiographiques et le kit Supersignal West Pico Chemoluminescent Substrate (Thermoscientific, 34080).

Extraction de splénocytes primaires

Les souris ont été euthanasiées par dislocation cervicale et la rate prélevée en condition stérile. En utilisant le piston d'une seringue de 10 ml, la rate était ensuite écrasée sur un tamis formé de pores de 70 µm de diamètre. Après récupération dans 10 ml de milieu RPMI 1640 complet (voir « culture cellulaire »), les cellules ont été centrifugées 7 minutes à 400 x g et reprises dans 5 ml de RBS lysis buffer de chez ebioscience (00-4300-54) pendant 5 minutes permettant la lyse des globules rouges. La lyse était stoppée en ajoutant 3 volumes de milieu et se suivait d'une nouvelle centrifugation. Après centrifugation, le surnageant a été éliminé et les cellules ont été comptées et ensemencées à 200.000 cellules/puits dans du milieu complet contenant 5 µg/ml de concanavaline A permettant la prolifération des lymphocytes.

Mesure de viabilité cellulaire

Test MTT

La mesure de la viabilité cellulaire après les différents traitements a été réalisée grâce au test MTT. Les cellules ont étéensemencées à une densité de 50.000 cellules/puits sur plaques 24 puits. Après 24h, 48h, 72h ou 96h de traitement, le test MTT a été réalisé en enlevant le milieu et en ajoutant 500 µl de bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (Sigma, M2128) à une concentration de 2,5 mg/ml. Après 2 heures d'incubation à 37°C, 1 ml de DMSO (Sigma, D4540) a été ajouté afin de dissoudre les cristaux de formazan. L'absorbance a été mesurée à 570 nm et la viabilité déterminée par comparaison entre les valeurs obtenues pour les échantillons non traités et les échantillons traités.

Test MTS

L'évaluation de la résistance des splénocytes primaires murins à l'étoposide a été réalisée en utilisant le kit CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) de chez Promega (G3582). Les cellules ont étéensemencées sur plaques 96 puits avec 200.000 cellules/puits. Après 4h, 8h ou 24h de traitement à l'étoposide, 25 µl de la solution de réactif du kit ont été ajoutés à chaque puits. La lecture de l'absorbance s'est faite à 490 nm après 4 heures d'incubation à 37°C et la viabilité des cellules suite au traitement a été déterminée en comparaison avec les échantillons non traités. L'expérience a été réalisée pour trois paires de souris (une paire = une souris MAGEA1^{+/-}/PGK-Cre^{+/-} et une souris MAGEA1^{-/-}/PGK-Cre^{+/-} issue de la même fraterie). Pour chaque paire, la viabilité des splénocytes MAGEA1^{+/-}/PGK-Cre^{+/-} a été comparée à celle des splénocytes MAGEA1^{-/-}/PGK-Cre^{+/-}. Les moyennes de viabilité pour chaque durée de traitement (4h, 8h et 24h) ont été réalisées pour ces cellules et ont été analysées (ANNOVA II) mais la différence n'était pas significative.

Transfection des NIH3T3 par les plasmides p11-4p53, pcDNA1-A1, p21-luc, pRL-Tk et pcDNA3

Les plasmides utilisés pour la transfection étaient p11-4p53 (plasmide permettant l'expression de la protéine p53 de souris, reçu de J-C. Marine, KU Leuven), pcDNA1-A1 (pcDNA1 suivi de la séquence codante de MAGEA1), p21-luc (plasmide rapporteur constitué du promoteur de p21 suivi du gène permettant l'expression de la luciférase), pRL-TK (co-rapporteur permettant l'expression de la luciférase rénilla de manière constante) et pcDNA3 (plasmide vide utilisé pour ajuster la quantité totale d'ADN transfectée pour chaque condition).

La transfection des NIH3T3 a été réalisée en utilisant la lipofectamine 2000 (LifeTechnologies, 11668-027). Les cellules ont été préparées la veille de la transfection de sorte qu'elles atteignent 70-90% de confluence le jour de la transfection. Juste avant la transfection, le milieu a été remplacé par 500 µl de milieu DMEM contenant 10% de FBS.

Les cellules ont été transfectées en respectant un ratio d'ADN de 1 : 10 pour les plasmides p21-luc et pRL-TK. En dehors des cellules contrôles, la même quantité de plasmide dirigeant l'expression de la protéine p53 de souris a été transfectée pour chaque condition. Une partie des cellules a été transfectée avec des ratios croissant de pcDNA1-A1. Afin que la quantité totale d'ADN transfectée soit identique, la quantité nécessaire de plasmide vide (pcDNA3) a été ajoutée pour chacune des conditions (voir tableau). La transfection s'est réalisée sur plaque 24 puits. Les mixs ADN (ADN dilué dans 50 µl d'Opti-MEM) ont été ajoutés aux mixs lipofectamine 2000 (2µl de lipofectamine 2000/µg d'ADN dilués dans 50 µl d'OPTI-MEM). Après 20 minutes d'incubation de chaque mixture à température ambiante, 100 µl de celle-ci ont été ajoutés à chaque puits pour chaque condition. Enfin, après 5 heures d'incubation à 37°C, le milieu a été remplacé par du milieu DMEM supplémenté avec 10% de FBS et 1% de pénicilline/streptomycine.

Type cellulaire	Conditions	Plasmides (ng)				
		p11-4-p53	pcDNA1-MAGEA1	p21-luc	pRL-TK	pcDNA3
NIH3T3	Contrôle luciférase			500	50	1200
	p53	300		500	50	900
	p53-MAGEA1 (3:1)	300	100	500	50	800
	p53-MAGEA1 (1:1)	300	300	500	50	600
	p53-MAGEA1 (1:3)	300	900	500	50	0

Mesure de l'induction de p21 dans les NIH3T3

L'induction de p21 dans les fibroblastes murins a été mesurée en utilisant le kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System de promega. Chaque puits a été rincé au PBS avant d'y ajouter 100 µl de solution de lyse (PRL). Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, 20 µl de lysat cellulaire ont été ajoutés à 100 µl de réactif LARII suivi d'une première lecture de la luminescence correspondant à celle émise par la luciférase de luciole au luminomètre. La lecture de la luminescence émise par la seconde luciférase (rénilla) a été réalisée après ajout de 100 µl du second réactif (Stop&Glo). La normalisation de l'expression de p21 dans les cellules s'est déroulée en faisant le rapport : $\frac{\text{Luminescence luciférase Firefly (RLU)}}{\text{Luminescence luciférase Rénilla (RLU)}}$ pour chaque réplica. Pour chaque condition, les moyennes de ces rapports ont été analysées grâce à une ANNOVA I. Un test de Dunnett a ensuite été utilisé pour comparer l'induction de p21 dans les cellules transfectées uniquement avec le plasmide d'expression de p53 et les autres conditions.

Transfection des Hep3B par les plasmides p11-4-p53 et pcDNA1-A1

Les cellules ont étéensemencées à un nombre de 600.000 cellules/puits de 10 cm² la veille de la transfection. Juste avant la transfection, le milieu a été remplacé par du milieu DMEM, 10% FBS sans antibiotique. Les cellules contrôles n'ont pas subi de transfection, les autres ont été transfectées en utilisant la lipofectamine 2000 (2µl/µg d'ADN) avec les quantités d'ADN reprises dans le tableau ci-dessous. Cinq heures après la transfection, le milieu des

cellules a été remplacé par du milieu DMEM contenant 10% de FBS et 1% de pénicilline/streptomycine.

Type cellulaire	Conditions	Plasmides (μg)	
		p11-4-p53	pcDNA1-MAGEA1
Hep3B	Contrôle		
	p53	3	
	p53-MAGEA1 (3:1)	3	1
	p53-MAGEA1 (3:3)	3	3
	p53-MAGEA1 (3:5)	3	5

Le lendemain de la transfection, les protéines ont été extraites, préparées et analysées par western blot (voir partie « western blot ») avec les anticorps anti-tubuline- α , anti-MAGEA1 6C1 et anti-p53 CM5.

III. Résultats

1) Souris transgéniques

MAGEA1 est largement exprimé dans les tissus des souris transgéniques *MAGEA1*^{+/-} ; *PGK-Cre*^{+/-}

Des souris transgéniques ont été obtenues en utilisant des cellules ES porteuses du transgène CAG-MAGEA1 inséré au locus ROSA26 qui permet l'expression conditionnelle de MAGEA1. Ces cellules ES ont été injectées dans des blastocystes et implantées dans des souris pseudo gestantes. De cette façon, neuf mâles chimériques ont été obtenus. Les animaux ont été croisés avec des femelles exprimant la recombinaise Cre de manière ubiquitaire (PGK-Cre). Ce croisement a produit des souris exprimant MAGEA1 de façon ubiquitaire car le promoteur CAG est réputé ubiquiste [53](Figure 4).

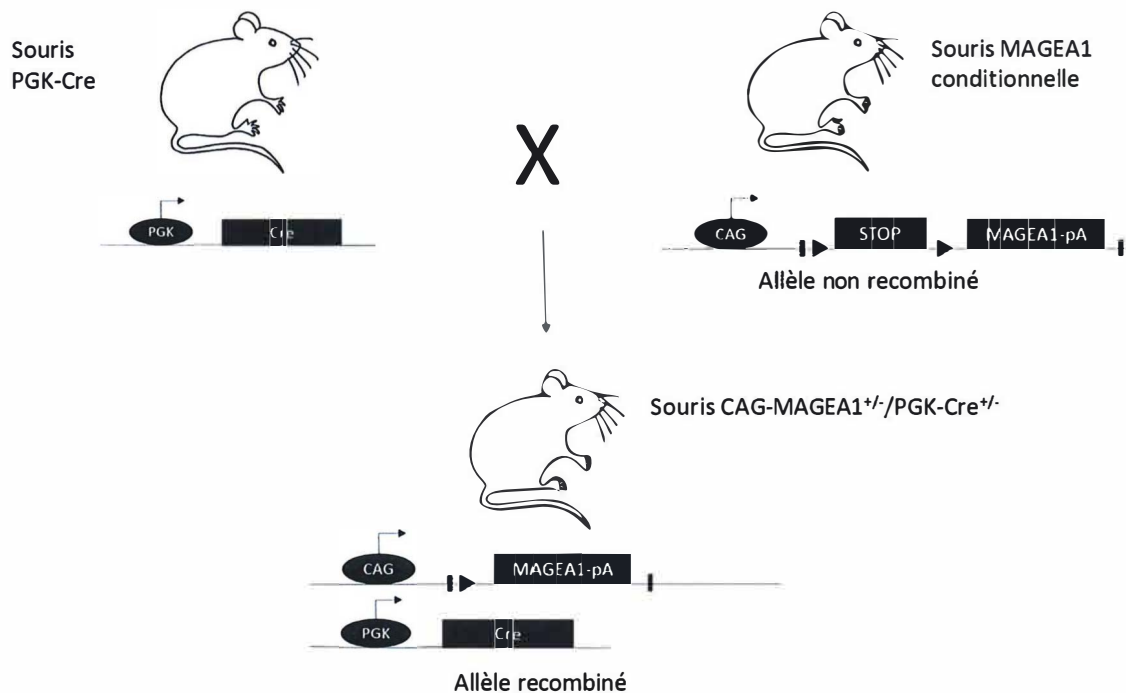


Figure 4 : Représentation schématique de l'induction d'expression de MAGEA1 dans la souris transgénique. Lorsque la souris PGK-Cre est croisée avec la souris MAGEA1 conditionnelle, cela induit l'excision de la cassette « STOP » dès le stade zygote et permet l'expression de MAGEA1 de façon ubiquitaire.

L'expression de MAGEA1 a été évaluée par western blot dans le cerveau, le foie, la rate, le cœur, les poumons, les reins et la peau. Comme le montre la **figure 5**, l'expression de MAGEA1 est détectée dans tous les tissus testés. Ceci montre que, comme attendu, la cassette « STOP » a été excisée et suggère que l'expression de MAGEA1 est ubiquitaire.

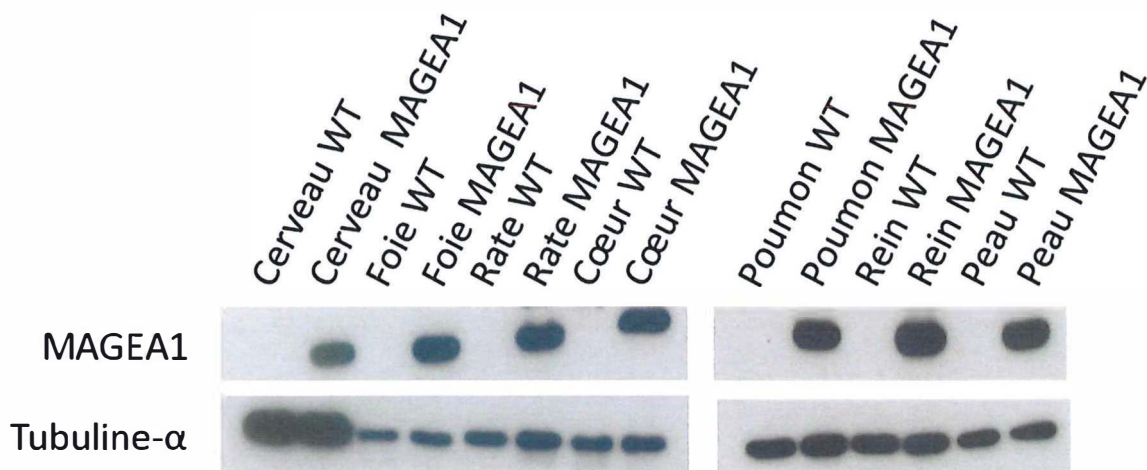


Figure 5 : Expression de MAGEA1 dans les différents tissus de la souris transgénique CAG-MAGEA1^{+/-} ; PGK-Cre^{+/-}. Analyse par western blot de l'expression de MAGEA1 dans le cerveau, le foie, la rate, le cœur, les poumons, les reins et la peau.

Design d'un modèle de souris permettant de déterminer l'impact de l'expression de MAGEA1 au cours du développement de mélanomes

Le mélanome est le cancer qui exprime le plus fréquemment MAGEA1 (environ 40% des tumeurs) [17]. Il a donc été décidé de déterminer si l'expression de MAGEA1 est capable de favoriser le développement de ces tumeurs dans un modèle murin. Ce modèle de souris transgéniques comporte deux modifications génétiques qui provoquent l'apparition de tumeurs spontanément dès l'âge de vingt semaines. Premièrement, l'expression de l'oncogène NRas^{Q16K} est dirigée dans les mélanocytes par un promoteur tyrosinase (Tyr : NRas^{Q61K}). Deuxièmement, une délétion du suppresseur de tumeur p16 (Ink4a).

Actuellement, les souris CAG-MAGEA1^{+/-} ; PGK-Cre^{+/-} exprimant MAGEA1 sont croisées avec des souris Tyr : NRas^{Q61K} ; Ink4a^{-/-} afin d'obtenir des souris porteuses du génotype : MAGEA1^{+/-} ; Tyr : NRas^{Q61K} ; Ink4a^{-/-} (**Figure 6**). Des souris présentant le génotype désiré n'ont pas encore été obtenues à ce jour.

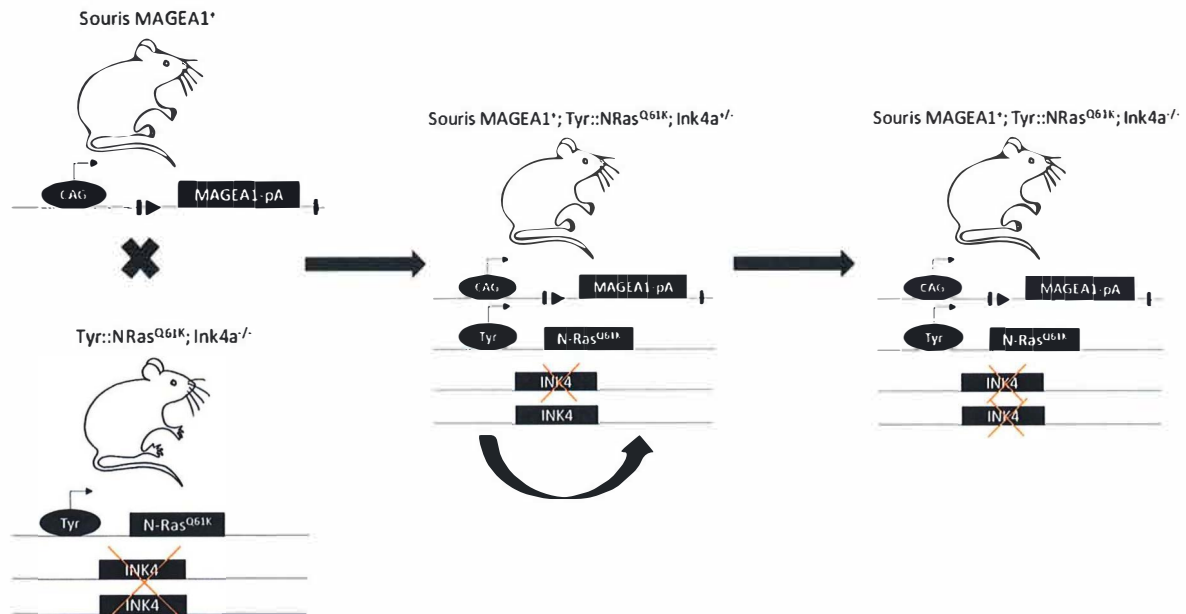


Figure 6 : Représentation schématique du croisement effectué entre les souris exprimant MAGEA1 et les souris développement des mélanomes spontanément. L'obtention de souris MAGEA1^{+/-}; TyrNRas^{Q61K}; Ink4a^{-/-} doit se faire par l'intermédiaire de deux croisements. Les souris MAGEA1^{+/-} ont été croisées avec les souris Tyr : NRas^{Q61K}; Ink4a^{-/-}. Ensuite, une partie des souris obtenues ayant le génotype MAGEA1^{+/-}; Tyr : NRas^{Q61K}; Ink4a^{+/-} ont été croisées entre elles afin d'obtenir des souris MAGEA1^{+/-}; Tyr ::NRas^{Q61K}; Ink4a^{-/-}.

2) MAGEA1 et p53

La protéine humaine MAGEA1 est capable d'entraîner une réduction du niveau de la protéine p53 de souris dans un contexte cellulaire humain

Comme il a été expliqué précédemment, le but du projet est d'évaluer les propriétés oncogéniques du gène MAGEA1 humain en utilisant un modèle de souris. Cependant, les gènes MAGE-I étant peu conservés entre l'homme et la souris, on ignore si la protéine MAGEA1 humaine est capable d'inhiber la protéine p53 de souris.

Afin de déterminer si la protéine MAGEA1 humaine est capable d'exercer ses fonctions sur la protéine p53 murine, des cellules humaines d'hépatocarcinomes Hep3B qui sont déficientes en p53 ont été transfectées avec un plasmide dirigeant l'expression de la protéine p53 de souris ainsi qu'avec des quantités croissantes d'un plasmide dirigeant l'expression de MAGEA1. La **figure 7** montre que MAGEA1 entraîne une diminution du niveau de p53 et que celle-ci est dépendante de la quantité de plasmide MAGEA1 transfectée. Ceci montre que MAGEA1 est capable d'exercer son action sur la protéine p53 de souris dans des cellules Hep3B.

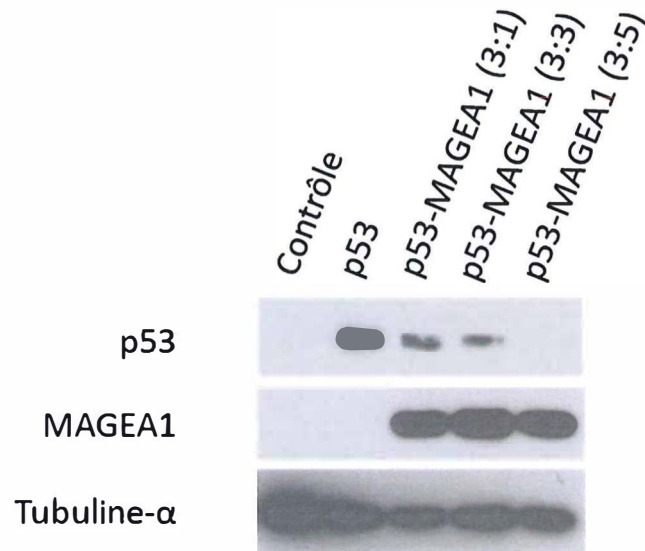


Figure 7 : Diminution du niveau de p53 murin provoqué par l'expression de MAGEA1 dans des cellules Hep 3B. Les cellules ont été transfectées avec un plasmide (p11-4-p53) dirigeant l'expression de p53 de souris seul (3µg) ou avec des ratios croissants des plasmides dirigeant les expressions des plasmides p11-4-p53 et pcDNA1-MAGEA1 (3µg :1µg, 3µg : 3µg et 3µg : 5µg). Les cellules contrôles n'ont pas subi de transfection. La tubuline-α a été utilisée comme contrôle de charge.

L'expression de MAGEA1 dans des cellules embryonnaires de souris semble diminuer le niveau de p53

Afin de savoir si la protéine MAGEA1 humaine exerce ses fonctions dans cellules ES, des cellules ES exprimant MAGEA1 de façon stable ont été utilisées. Ces cellules ont été obtenues par insertion ciblée (knock-in) du transgène MAGEA1 dans le locus Rosa26. Le transgène comporte un promoteur puissant CAG qui est constitué d'un enhancer du cytomégalovirus et du promoteur proximal du gène de la β-actine du poulet. Ce promoteur est suivi d'une cassette « STOP » floxée (contenant plusieurs signaux de polyadénylation responsables de l'arrêt de la transcription), de la séquence codante de MAGEA1 et d'un signal de polyadénylation. La cassette « STOP » étant bordée de site lox, l'expression de la recombinaison Cre permet son excision et l'expression de MAGEA1 de la même manière que la recombinaison se produisant dans les cellules de la souris transgénique CAG-MAGEA1^{+/-}/PGK-Cre^{+/-} (**Figure 4**).

Les cellules ES porteuses du transgène ont été électroporées avec un plasmide d'expression de la recombinaison Cre. Après une courte sélection des cellules transfectées, les cellules ont été clonées par dilution et une PCR en utilisant des amorces situées de part et d'autre de la cassette « STOP » a permis d'identifier des clones dans lesquels l'excision de cette cassette s'était produite (**Figure 8**). Les analyses par western blot ont permis de montrer l'expression de MAGEA1 dans les clones porteurs de l'allèle recombiné par Cre (**Figure 9 et 10**). L'effet de MAGEA1 sur le niveau de p53 a été analysé par western blot après traitement des cellules avec de l'étoposide qui induit des cassures double brins dans l'ADN et l'activation de p53

[54]. Les cellules ont été traitées pendant une heure ou deux heures avec 50 μ M d'étoposide. Une première analyse par western blot a montré une inhibition de l'induction de p53 dans des clones exprimant MAGEA1 (Clone A5, A7 et E3) (**Figure 9**). En effet, on remarque qu'après deux heures de traitements à l'étoposide, aucune induction de p53 n'était détectée dans les clones recombinés par Cre (exprimant MAGEA1) alors que p53 était induit dans le clone non recombiné servant de contrôle (clone 26). Dans le but de confirmer cette observation l'expérience a été répétée en utilisant un autre anticorps anti-p53 permettant une meilleure détection de p53. L'induction de p53 a été évaluée dans trois clones post-Cre exprimant MAGEA1 (A5, A7 et C11). Les cellules utilisées comme contrôles correspondaient cette fois à une population de cellules ES non porteuses du transgène CAG-MAGEA1. Sur la **figure 10**, on peut voir qu'après deux heures de traitement à l'étoposide (50 μ M), l'induction de p53 par l'étoposide est manifeste dans les cellules contrôles. Les observations pour les clones exprimant MAGEA1 (A5, A7 et C11) sont plus difficiles à interpréter car ils présentent un niveau basal de p53 (clones non traités) plus élevé. Cependant, l'induction de p53 dans ces clones semble plus faible que dans les cellules contrôle. Ces observations suggèrent que MAGEA1 pourraient moduler le niveau de p53 dans des cellules ES mais d'une façon qu'il reste à être précisée.



A5 A7 C11 E3 H1 26 27
 Post-cre Pré-cre

Figure 8: Vérification de l'excision de la cassette « STOP » après électroporation de la recombinase Cre. La PCR montre l'excision de la cassette dans les clones A5, A7, C11, E3 et H1 mais pas dans les clones 26 et 27.

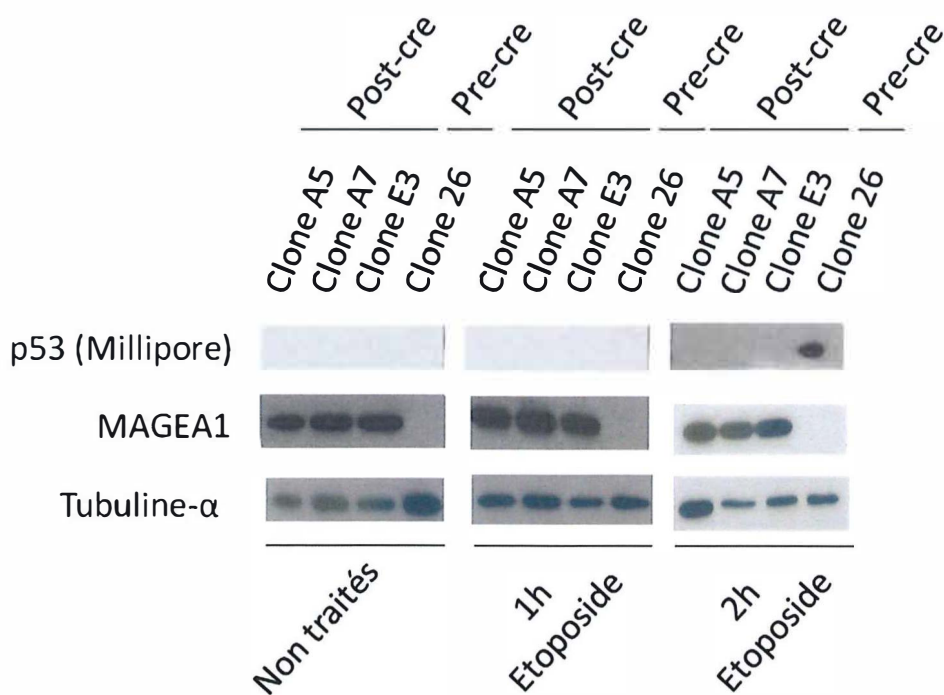


Figure 9: Induction de p53 dans des cellules embryonnaires de souris exprimant MAGEA1 après traitement à l'étoposide. Les cellules ont été traitées ou non avec 50 μ M d'étoposide pendant une ou deux heures. L'analyse western blot montre que p53 est induit dans les cellules contrôles (clone 26) mais pas dans les clones exprimant MAGEA1 (A5, A7 et E3).

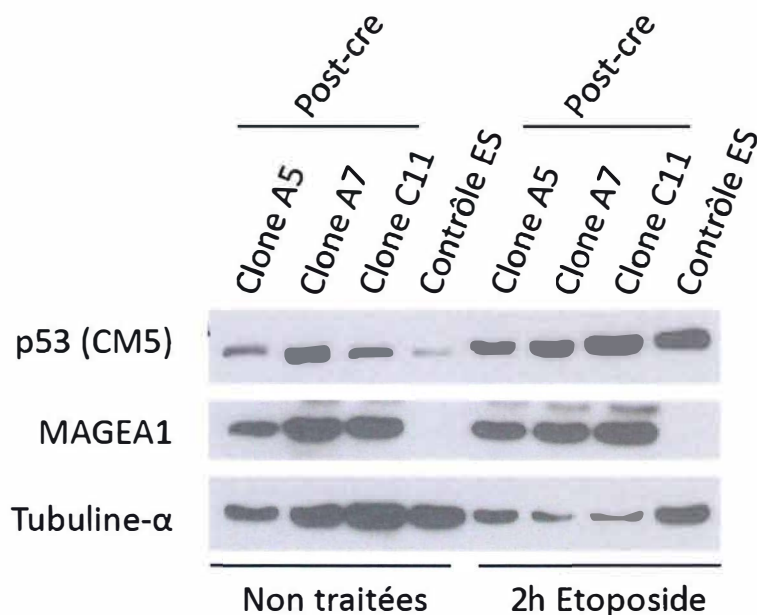


Figure 10 : Induction de p53 par l'étoposide dans des cellules ES exprimant ou non MAGEA1. Un traitement de 50 μ M d'étoposide a été appliqué aux cellules ES pendant une durée de 2h. La détection de p53 réalisée avec l'anticorps anti-p53 (CM5, Leica) montre une induction de p53 similaire pour les clones post-Cre (A5, A7, C11) exprimant MAGEA1 par rapport à celle retrouvée pour cellules contrôles n'exprimant pas MAGEA1.

MAGEA1 diminue l'induction de p53 induite par l'étoposide dans les fibroblastes de souris NIH3T3

Dans le but de déterminer si la protéine MAGEA1 humaine est capable d'exercer ses fonctions dans un contexte cellulaire murin, des fibroblastes de souris de la lignée NIH3T3 ont été transduits avec un vecteur rétroviral dirigeant l'expression de MAGEA1 (pbabe-MAGEA1-zeo) ou avec un vecteur rétroviral vide (pbabe-zeo). Les cellules exprimant le vecteur de manière stable ont été sélectionnées grâce à la zéocine et l'expression de MAGEA1 dans la population de cellules transduites sélectionnées a ensuite été confirmée par western blot (**Figure 11**). Les cellules ont été traitées à l'étoposide (10 μ M) pendant 2h ou 4h pour induire l'expression de p53. Après 2h de traitement, les cellules exprimant MAGEA1 ne présentent pas d'induction évidente de p53 en comparaison avec le niveau basal visible dans les cellules non traitées. En revanche, les cellules contrôles n'exprimant pas MAGEA1 (transduites par le vecteur rétroviral pbabe-zeo) présentent clairement une induction. Ces données suggèrent que MAGEA1 est capable de diminuer le niveau protéique de p53 dans des cellules de souris lorsque ce dernier est induit par des dommages à l'ADN causés par l'étoposide.

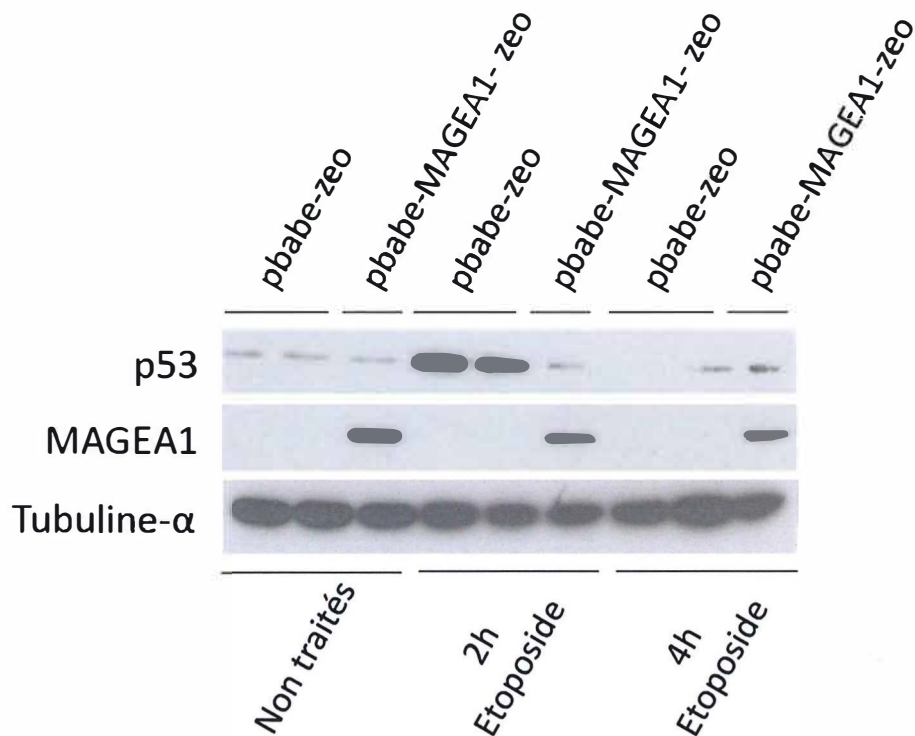


Figure 11 : Inhibition de l'induction de p53 dans des NIH3T3 exprimant MAGEA1. Les cellules ont été traitées avec 10 μ M d'étoposide pendant 2h et 4h. Les cellules pbabe zeo correspondent aux cellules transduites par le vecteur rétroviral pbabe-zeo vide. Les cellules pbabe-MAGEA1-zeo ont été transduites par le vecteur rétroviral pbabe-MAGEA1-zeo.

MAGEA1 n'inhibe pas l'activation de p53 induite par la nutline-3 dans des cellules de souris NIH3T3 ni dans les cellules ES

L'expression forcée de MAGEA1 dans des fibroblastes murins (NIH3T3) permettait d'inhiber l'induction de p53 après deux heures de traitement avec de l'étoposide. Afin de savoir si MAGEA1 peut réduire le niveau de p53 en absence de dommages à l'ADN, les cellules NIH3T3 ont été traitées avec la nutline-3, un inhibiteur de Mdm2. Les résultats de la **figure 12** montrent qu'après 2h, 4h et 8h de traitement, les cellules exprimant MAGEA1 (pbabe-MAGEA1-zeo) présentent une induction similaire de p53 par rapport aux cellules contrôles (pbabe-zeo). De la même manière, le traitement de cellules ES par la nutline-3 provoquait une induction de p53 qui ne semblait pas être modifiée par l'expression de MAGEA1 (**Figure 13**). Ces résultats suggèrent que la protéine MAGEA1 humaine n'inhibe pas l'induction de p53 par la nutline-3.

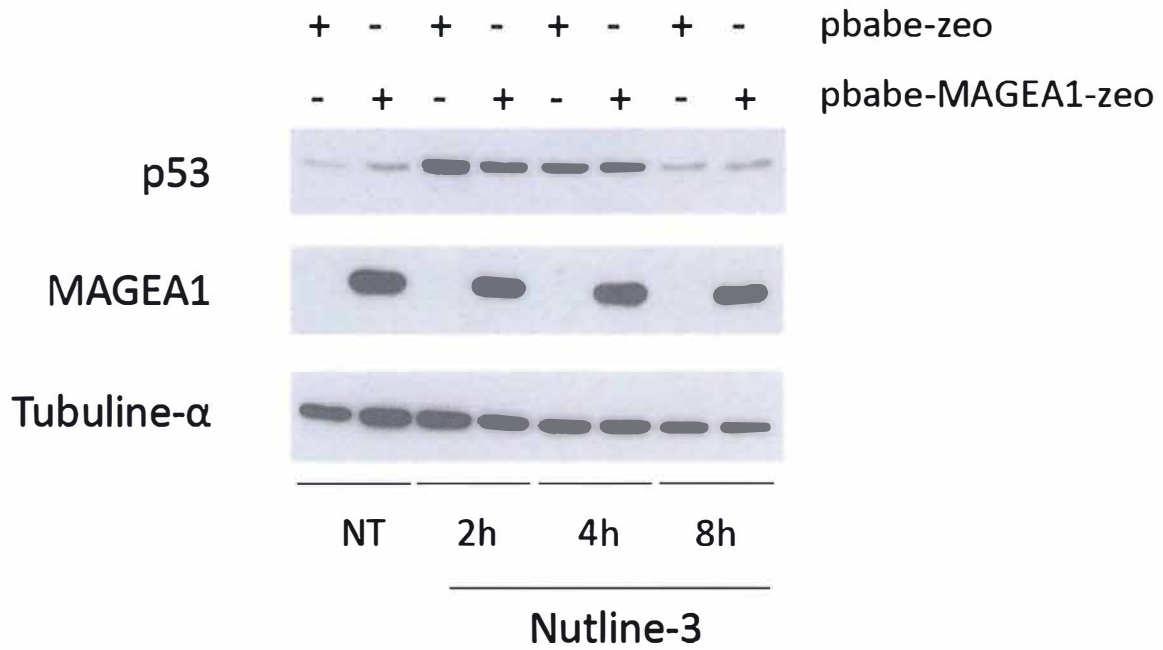


Figure 12 : Induction de p53 dans des NIH3T3 exprimant ou non MAGEA1 après traitement par la nutline-3. Les cellules ont été traitées avec 20 μ M de nutline-3 pendant 2h, 4h et 8h.

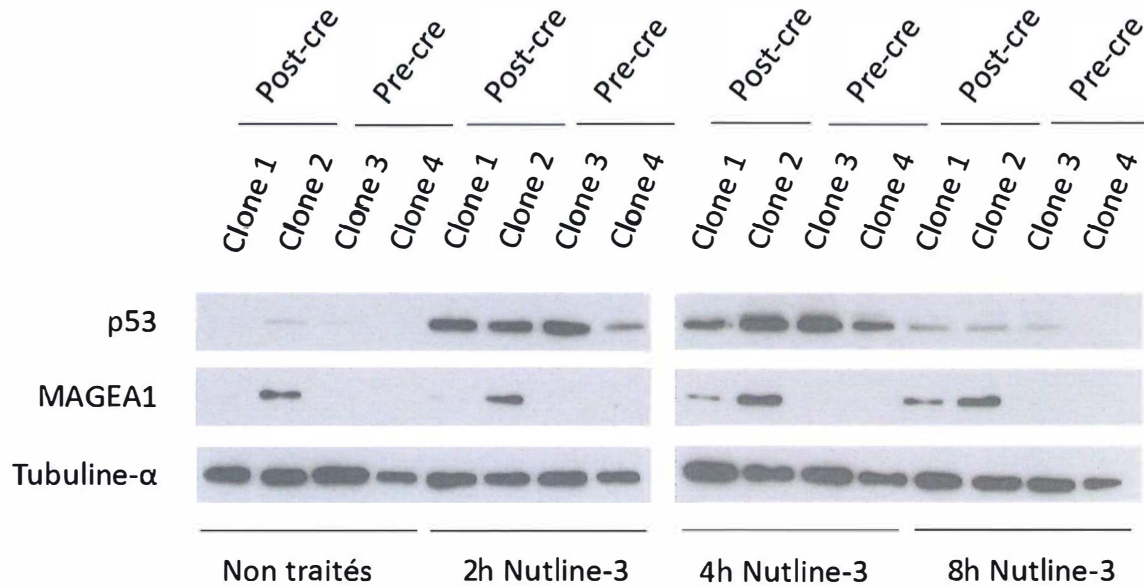


Figure 13 : Induction de p53 dans les cellules ES de souris. Après 2h et 4h de traitement par la nutline-3, p53 est induit de façon semblable dans les clones exprimant ou non MAGEA1.

MAGEA1 inhibe l'activation transcriptionnelle de p21 par p53 dans les NIH3T3

Plusieurs études ont montré que les protéines MAGE-I peuvent interférer avec l'activité transcriptionnelle de p53 ainsi qu'avec sa capacité à activer la transcription de ses gènes cible. Afin de vérifier si MAGEA1 peut modifier la capacité de p53 à activer la transcription de ses cibles, des cellules NIH3T3 ont été transfectées avec un plasmide permettant l'expression de la protéine p53 de souris (p11-4-p53) ainsi qu'avec des quantités croissantes d'un plasmide dirigeant l'expression de MAGEA1 (pcDNA1-MAGEA1). Afin de déterminer l'effet de MAGEA1 sur la capacité de p53 à activer le promoteur de p21, un plasmide exprimant la luciférase de luciole sous la dépendance du promoteur de p21 (p21-luc) et un plasmide d'expression de la luciférase rénilla (pRL-TK) ont également été ajoutés au mélange d'ADN utilisé pour la transfection. Afin que chacune des conditions soit transfectée avec la même quantité totale d'ADN, celle-ci a été ajustée en transfectant une quantité appropriée d'un plasmide vide (pcDNA3). L'activation transcriptionnelle de p21 dans les cellules a été mesurée en calculant le ratio entre les mesures de luminescence émises par les luciférases de luciole et de rénilla. Sur la **figure 14**, on voit que l'activité de la luciférase de luciole est légèrement augmentée dans les cellules transfectées avec le plasmide dirigeant l'expression de p53. En revanche, l'expression de MAGEA1 semble réduire l'activité de p21-luc aux ratios le plus élevé et le plus faible en MAGEA1, mais, curieusement, pas au ratio intermédiaire.

Effet de MAGEA1 sur l'activation transcriptionnelle de p21 dans les NIH3T3

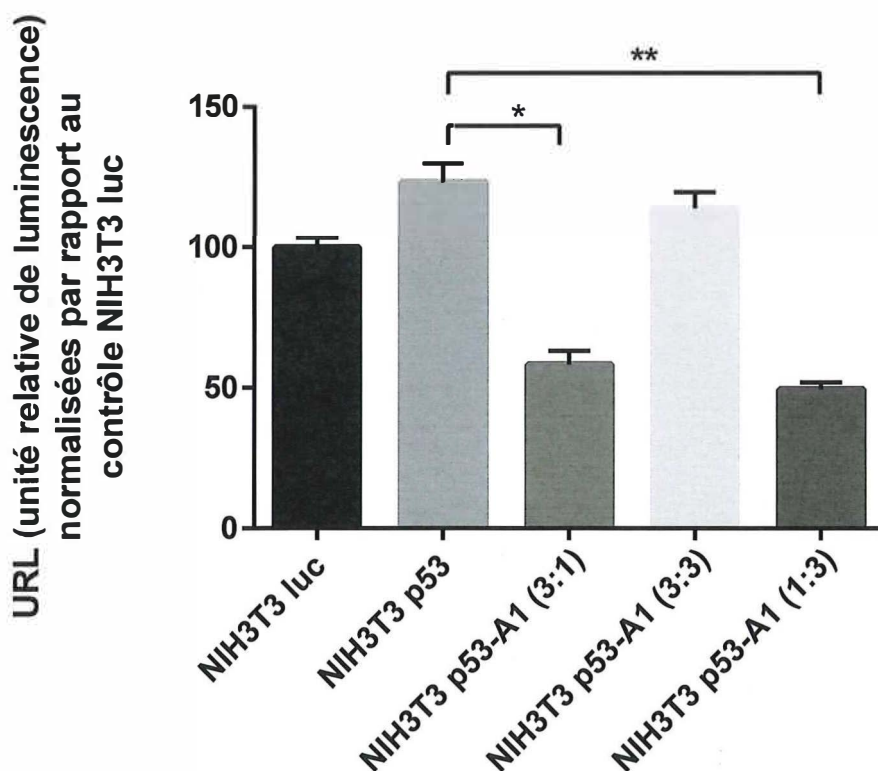


Figure 14 : Mesure de l'effet de l'expression de MAGEA1 sur l'activité transcriptionnelle de p21 dans les NIH3T3. Les cellules ont été transfectées avec les plasmides p21-luc, pRL-TK, p11-4-p53, pcDNA1-MAGEA1 et pcDNA3 (voir matériel et méthode). Vingt-quatre heures après la transfection, l'activité transcriptionnelle de p21 dans ces cellules a été évaluée sur base des ratios des luminescences émises par les luciférases de luciole et de rénilla.

3) MAGEA1 et chimiorésistance

Les splénocytes de la souris MAGEA1^{+/-}PGK-Cre^{+/-} ne sont pas résistants à l'étoposide

Etant donné que MAGEA1 peut conférer une résistance à différents agents chimiothérapeutiques dans des cellules humaines, nous avons décidé de tester la résistance de splénocytes primaires dérivés des souris CAG-MAGEA1^{+/-}/PGK-Cre^{+/-}. Des cultures primaires de splénocytes ont été dérivées de ces animaux et la prolifération des lymphocytes a été stimulée avec de la concanavaline A. Un traitement par l'étoposide (17 μ M) a été appliqué à ces cellules pendant 4h, 8h ou 24h et la viabilité des cellules a été mesurée par un test MTS. La **figure 15** montre que les splénocytes issus des souris CAG-MAGEA1^{+/-}/PGK-Cre^{+/-} sont aussi sensibles que ceux des souris contrôles CAG-MAGEA1^{-/-}/PGK-Cre^{+/-} à l'étoposide.

Résistance de splénocytes primaires à l'étoposide (17 μ M)

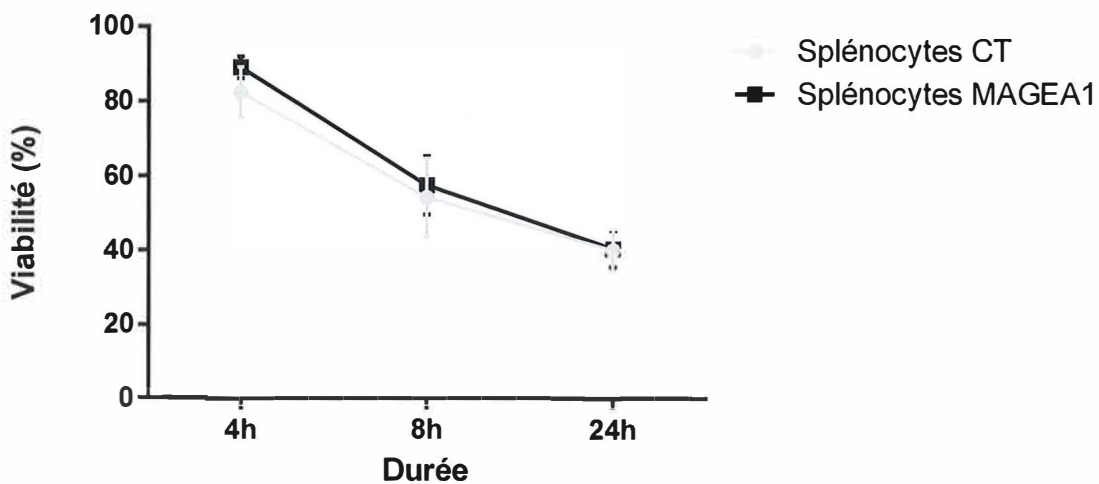


Figure 15 : Evaluation de la résistance à l'étoposide de splénocytes primaires dérivés des souris exprimant (CAG-MAGEA1^{+/-}/PGK-Cre^{+/-}) ou non (CAG-MAGEA1^{-/-}/PGK-Cre^{+/-}) MAGEA1 de manière ubiquitaire. Les splénocytes ont été obtenus à partir de la rate et leur viabilité après 4h, 8h ou 24h de traitement à l'étoposide (17 μ M) a été mesurée par MTS.

L'expression de MAGEA1 n'augmente pas la résistance à l'étoposide des cellules ES de souris

La résistance à l'étoposide des cellules ES exprimant ou non MAGEA1 (contenant l'allèle ROSA26 : CAG-MAGEA1 avec ou sans cassette « STOP ») a également été évaluée. Les cellules ont été traitées avec 0.05 μ M d'étoposide et leur viabilité a été mesurée grâce au test MTT après 24h, 48h, 72h ou 96h. La **figure 16** montre que la survie des cellules exprimant ou non MAGEA1 est similaire, indiquant que l'expression de MAGEA1 dans ces cellules ne leur confère pas de résistance à l'étoposide.

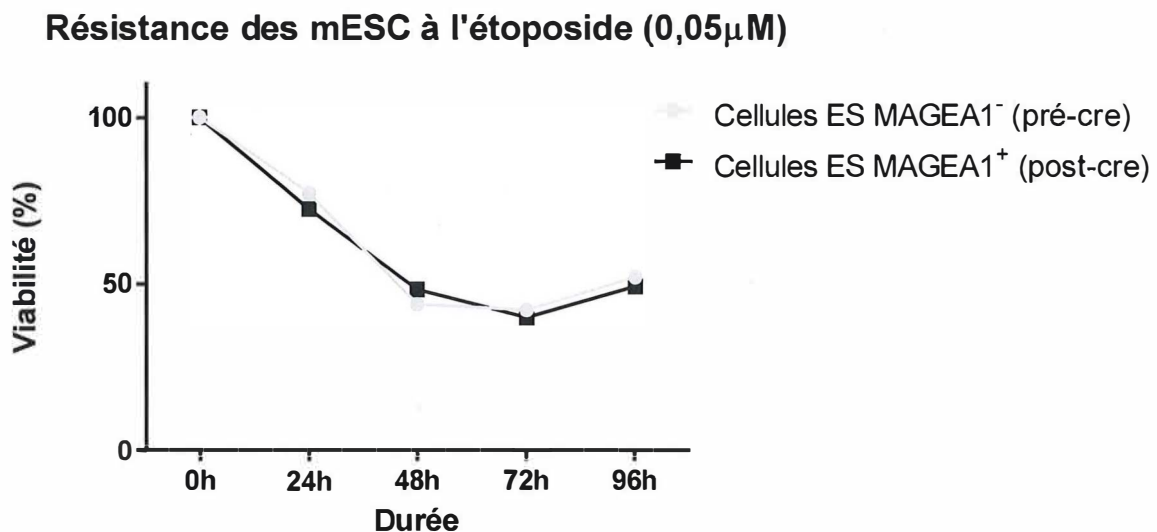


Figure 16 : Graphique représentant la résistance à l'étoposide des cellules embryonnaires de souris exprimant ou non MAGEA1. La viabilité des cellules a été déterminée par MTT après 24h, 48h, 72h ou 96h de traitement par l'étoposide (0,05 μ M). Les cellules post-Cre exprimant MAGEA1 présentent la même résistance à l'étoposide que les cellules pré-Cre qui ne l'expriment pas.

L'expression de MAGEA1 ne confère pas de résistance aux agents chimiothérapeutiques dans des cellules déficientes en p53

Plusieurs études montrent que l'expression des MAGEA peut induire une résistance des cellules d'une manière dépendante de p53. De même, il a été montré dans notre laboratoire que l'expression forcée de MAGEA1 dans les cellules humaines d'épithélium mammaire MCF-10A leur octroie une résistance accrue à l'étoposide, au 5-fluorouracile et au docétaxel par rapport à des MCF-10A n'exprimant pas MAGEA1. Il n'est cependant pas encore déterminé si les protéines MAGEA peuvent induire une résistance indépendamment de p53. Afin d'évaluer cette hypothèse, l'expression de MAGEA1 a été forcée par transduction lentivirale dans des cellules Hep3B qui sont déficientes en p53. L'expression de MAGEA1 suite à cette transduction a été évaluée par western blot (**Figure 17**).

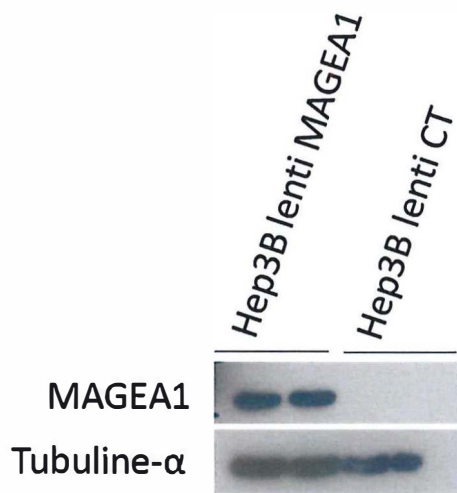
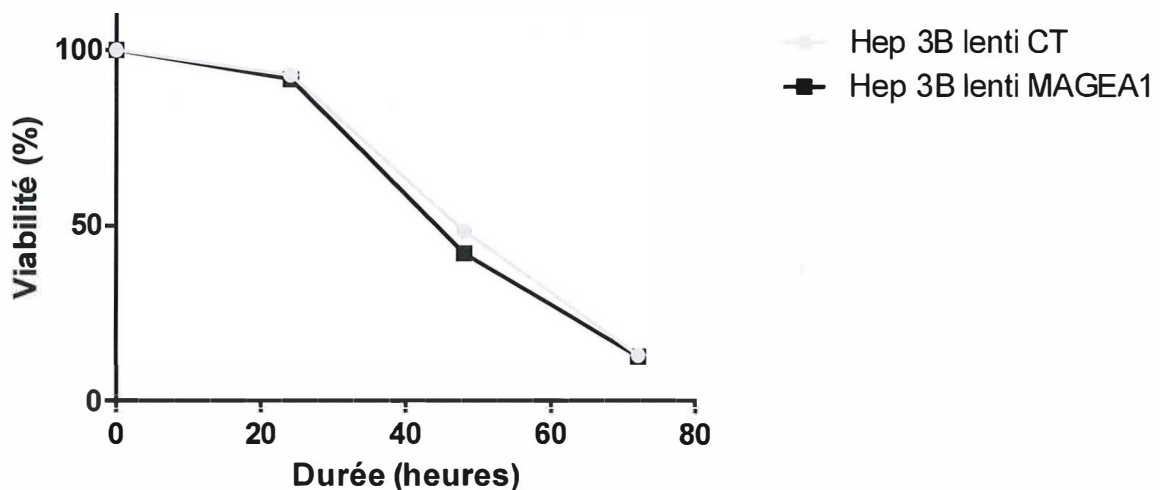


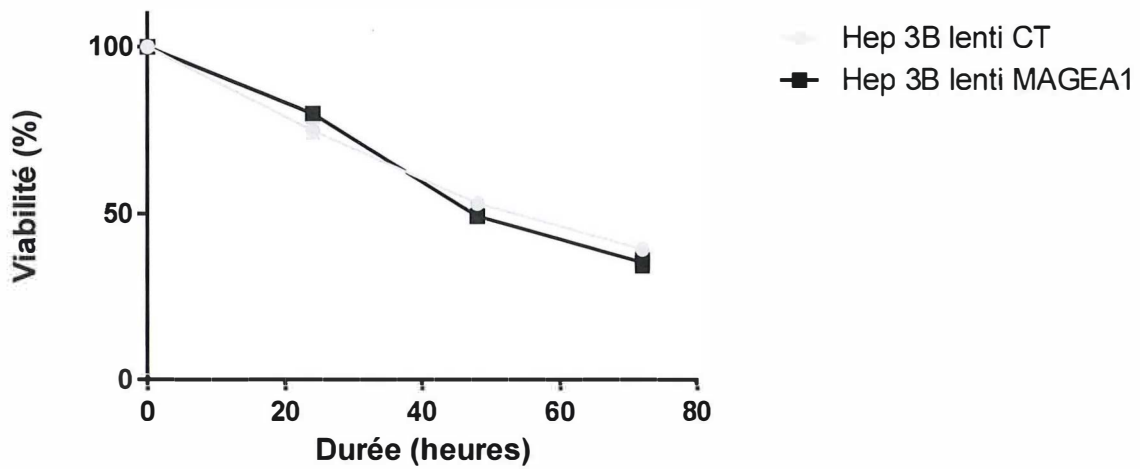
Figure 17: Expression de MAGEA1 dans les Hep 3B. L'expression de MAGEA1 n'est détectée que dans les cellules infectées avec les particules lentivirales contenant la séquence codante de MAGEA1.

La résistance à l'étoposide, au docétaxel et au 5-fluorouracile a été évaluée dans ces cellules. Dans un premier temps, une courbe de dose pour déterminer l'IC₅₀ des cellules à ces trois agents chimiothérapeutiques a été réalisée. Ensuite, les cellules ont été traitées avec de l'étoposide (30 μ m), du docétaxel (19 nm) et du 5-fluorouracile (140 μ m) pendant 24h, 48h et 72h. Un test de viabilité (MTT) a été réalisé et a montré qu'il n'y a pas de différence de viabilité entre les Hep3B contrôles (transduits par un vecteur lentiviral vide) et les Hep3B exprimant MAGEA1 (transduits par un vecteur lentiviral contenant la séquence codante de MAGEA1) après traitements (**Figure 18**). Ces observations suggèrent que MAGEA1 n'est pas capable de conférer une résistance à ces agents chimiothérapeutiques en absence de p53.

Résistance des Hep3B à l'étoposide (30 μ M)



Résistance des Hep3B au docétaxel (19 nm)



Résistance des Hep3B au 5-Fluorouracile (140 μ M)

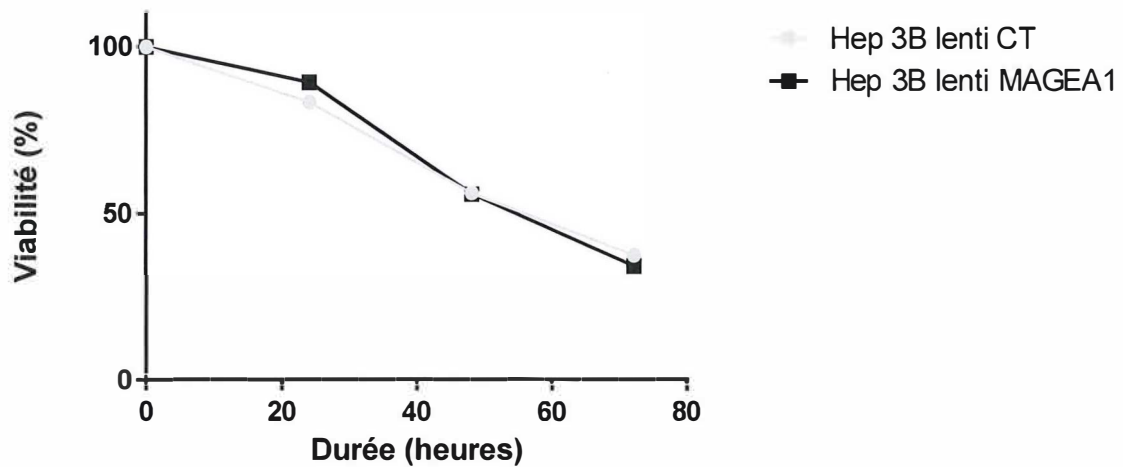


Figure 18: Résistance des Hep3B à l'étoposide, au docétaxel et au 5-fluorouracile. Evaluation par MTT de la viabilité des Hep3B contrôles et des Hep3B exprimant MAGEA1 après 24h, 48h et 72h de traitement par l'étoposide (30 μ M), le docétaxel (19 nm) et le 5-fluorouracile (140 μ M).

IV. Perspectives et conclusion

Un premier objectif de ce mémoire était de vérifier l'expression de MAGEA1 dans les tissus des souris transgéniques CAG-MAGEA1^{+/-}/PGK-Cre^{+/-}. Ceci a été réalisé par western blot et a montré une forte expression dans tous les tissus testés. Ceci suggère que, comme attendu, l'expression de MAGEA1 est ubiquitaire dans ces souris. Cela indique également que le système inductible par Cre pourra être utilisé pour induire l'expression de MAGEA1 dans des types cellulaires désirés, définis par le profil d'expression de Cre.

MAGEA1 étant exprimé dans 40% des mélanomes, l'élaboration d'un modèle de souris associant la génération spontanée de mélanomes et exprimant MAGEA1 semblait être un bon moyen de déterminer si cette protéine peut favoriser le développement de ce type de tumeur. Pour cela, les souris CAG-MAGEA1^{+/-} ont été croisées avec des souris Tyr : NRas^{Q61K} ; Ink4a^{-/-}. Ces dernières contiennent deux modifications génétiques [55]. Premièrement, NRas^{Q61K}, une forme activée de l'oncogène humain NRas suite à la substitution d'une glycine (Q) par une lysine (K) en position 61. Dans plus de 30% des mélanomes, NRas subit une mutation activatrice semblable provoquant une activation constante de signaux de prolifération [56][57]. Ici, l'expression de l'oncogène NRas^{Q61K} est dirigée par un promoteur provenant du gène de la tyrosinase qui dirige l'expression spécifiquement dans les mélanocytes. La seconde modification génétique correspond à une délétion bi-allélique de l'exon 1α du gène CDKN2A localisé sur le locus INK4. Ce gène code pour la protéine p16 qui inhibe la phosphorylation de la protéine Rb par les complexes cyclines-D/Cdk4, empêchant ainsi la libération du facteur de transcription E2F et l'activation des gènes responsable du déclenchement de la phase S [58]. Les souris porteuses de ces deux modifications génétiques développent des mélanomes à partir de l'âge de vingt semaines [55]. Une fois obtenues, il sera intéressant de déterminer si l'expression de MAGEA1 dans ces souris modifie des paramètres tels que le délai qui précède l'apparition des tumeurs et la mortalité chez ces souris.

Chez l'homme, plusieurs études ont montré que MAGEA1 est capable de diminuer l'activité et le niveau protéique de p53. Au cours de ce travail, cette capacité de la protéine MAGEA1 humaine a été évaluée dans des cellules de souris dans le but de valider le modèle de souris transgénique. En effet, les protéines MAGE-I sont peu conservées entre l'homme et la souris et il n'est donc pas certain que MAGEA1 puisse exercer ses fonctions dans un contexte murin. Afin de répondre à cette question, nous avons évalué la capacité de MAGEA1 à interférer avec le niveau et l'activité de p53 dans plusieurs types cellulaires.

Les cellules humaines Hep3B sont des cellules d'hépatocarcinome déficientes en p53 [59]. En transfectant ces cellules avec un plasmide dirigeant l'expression de la protéine p53 de souris (p11-4-p53) et celle de la protéine humaine MAGEA1 (pcDNA1-MAGEA1) nous avons observé que MAGEA1 est capable d'induire une diminution du niveau de p53 murin dans des cellules humaines. Cependant, tous les acteurs permettant aux MAGE-I d'altérer les fonctions de p53 ne sont pas connus et il est difficile de prédire si la protéine MAGEA1

humaine pourra exercer ses fonctions dans des cellules de souris. En effet, l'action des protéines MAGE sur p53 n'est pas directe, elle implique d'autres protéines, en particuliers des E3 ubiquitine ligases. Afin de savoir si la protéine MAGEA1 est capable d'exercer ses fonctions dans des cellules de souris, nous envisageons d'évaluer l'effet de l'expression de MAGEA1 sur p53 en forçant l'expression des deux protéines dans des cellules de souris déficientes en p53 telles que les MB352 (ATCC, CRL-2821) ou encore en testant l'effet de MAGEA1 sur le niveau endogène de p53 dans les NIH3T3.

Une première analyse western blot avait indiqué que l'expression de MAGEA1 dans des clones de cellules ES porteurs de l'allèle CAG-MAGEA1 recombinaison par la recombinaison Cre étaient capables d'inhiber l'activation de p53 induite par l'étoposide. Après répétition de l'expérience avec un anticorps permettant une meilleure détection de p53, l'expression de MAGEA1 dans ces cellules semblait responsable d'une réduction de l'induction de p53. Nous n'avons pas d'explication relative à cette observation, mais nous avons remarqué que le niveau basal de p53 dans les cellules non traitées par l'étoposide semblait plus élevé dans les clones exprimant MAGEA1. Ces données sont à confirmer mais l'expression de MAGEA1 semble réduire l'induction de p53 lors d'un traitement par l'étoposide dans des cellules embryonnaire de souris.

L'effet de l'expression de MAGEA1 sur le niveau protéique de p53 a également été évalué dans des fibroblastes de souris NIH3T3 exprimant MAGEA1 de manière stable grâce à une transduction rétrovirale. Dans cette analyse, l'induction de p53 a été provoquée par l'étoposide ou par la nutline-3. L'étoposide est responsable de l'inhibition de la topoisomérase de type II et génère des cassures double brin dans la molécule d'ADN [60]. Ces cassures sont responsables de l'activation de la kinase ATM qui phosphoryle plusieurs cibles telles que p53, Chk2 et H2AX [61]. Une fois activée, les kinases ATM et Chk2 peuvent phosphoryler p53 dans sa région N-terminale empêchant ainsi sa liaison à MDM2 et sa dégradation. De plus, ATM peut phosphoryler Mdm2 inhibant sa liaison à p53 [62]. Dans les cellules ES, l'effet de MAGEA1 sur l'induction de p53 n'était pas clair, cependant, les NIH3T3 exprimant MAGEA1 et traités avec l'étoposide montraient une réduction de l'induction de p53 par rapport aux cellules contrôles. Ceci est en accord avec les observations de Doyle et al. [4] qui ont démontré la capacité de différentes protéines MAGE-I à augmenter l'activité ubiquitine ligase de protéines à domaine RING provoquant une augmentation de la dégradation de p53 par le protéasome.

Contrairement à l'étoposide, la nutline-3 est un composé non génotoxique qui se lie avec une haute affinité à Mdm2 et inhibe son interaction avec p53. La nutline-3 permet ainsi la stabilisation de p53 et l'activation de ses voies de signalisation sans activer les voies de signalisation impliquées dans la détection des dommages à l'ADN [63][64]. D'après nos observations, l'induction de p53 par la nutline-3 n'est pas affectée par l'expression de MAGEA1, ceci aussi bien dans les NIH3T3 que dans les cellules ES. Comme discuté plus haut, l'activation de p53 suite aux dommages générés dans l'ADN par l'étoposide est inhibée par l'expression de MAGEA1 dans les NIH3T3. Ceci suggère que MAGEA1 pourrait empêcher la stabilisation de p53 quand l'ADN a été endommagé, en faisant

intervenir une ou plusieurs protéines modifiées ou induites en cas de dommages à l'ADN. KAP1 pourrait être une de ces protéines. En effet, les protéines MAGE-I peuvent interagir avec KAP1 et augmenter son activité ubiquitine ligase sur p53. D'autre part, KAP1 peut être phosphorylé par ATM. Lors de cassures double brin dans l'ADN, ATM reconnaît le site de cassure via un complexe protéique spécifique (MRN) et phosphoryle KAP1 au niveau du site endommagé. La phosphorylation de KAP1 provoque alors sa diffusion dans le noyau où il induit une relaxation chromatiniennne [65]. Les mécanismes moléculaires de cette voie ne sont pas encore totalement élucidés mais les protéines MAGE-I pourraient intervenir en facilitant les fonctions de KAP1 dans la réponse induite par des dommages à l'ADN.

Plusieurs études ont montré que les protéines MAGE-I peuvent réduire l'activité transcriptionnelle de p53 soit en masquant son site de liaison à l'ADN, l'empêchant ainsi de se lier à ses séquences cibles soit en recrutant des HDAC responsable de la déacétylation de p53 et des histones à proximité de ses site de liaison à l'ADN [32][33]. Par ces mécanismes, les protéines MAGE-I empêcheraient p53 d'activer la transcription de gènes cibles tels que p21, Mdm2 et PUMA [66]. p21 est une protéine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire dont l'activité transcriptionnelle est renforcée lors de l'activation de p53 [67][68]. Afin de déterminer si MAGEA1 peut exercer sa fonction dans des cellules de souris, l'activité du promoteur de p21 a été mesurée dans des NIH3T3 transfectés avec des quantités croissantes d'un plasmide dirigeant l'expression de MAGEA1. D'après nos observations, l'expression de MAGEA1 dans les NIH3T3 provoquait une diminution de l'activation du promoteur de p21 rapportée par la luciférase. Ces observations indiquent que la protéine MAGEA1 humaine est responsable d'une réduction de l'activation transcriptionnelle de p21 dans les NIH3T3, probablement suite à une diminution de l'activité ou du niveau de p53. Cependant, pour une raison que nous ne pouvons expliquer, les cellules transfectées avec le ratio p53-MAGEA1 (3 :3) ne présentaient pas de diminution significative par rapport aux cellules transfectées uniquement avec le plasmide dirigeant l'expression du p53 murin.

L'expression des protéines MAGE-I a été associée avec une résistance à l'apoptose dépendante de p53 induite par des agents chimiothérapeutiques. Au sein de notre laboratoire, il a été montré que l'expression de MAGEA1 dans des cellules épithéliales mammaires humaines MCF-10A augmente leur résistance à un traitement par l'étoposide, le 5-fluorouracile et le docétaxel (données non publiées, Elise Srour). Ces cellules possèdent un p53 sauvage [69]. Si MAGEA1 est capable de diminuer le niveau et les fonctions de p53, cela peut expliquer leur résistance à l'étoposide et au 5-fluorouracile étant donné que ces deux molécules induisent l'apoptose via une activation de p53 [70][71]. En revanche, la résistance de ces cellules au docétaxel pourrait indiquer que MAGEA1 est capable de conférer une résistance indépendamment de p53, le docétaxel provoquant l'apoptose indépendamment de p53 via l'activation de la caspase-2 [72]. Nous avons investigué l'existence d'un tel mécanisme dans des cellules humaines déficientes en p53 (Hep3B) dans lesquelles l'expression de MAGEA1 a été forcée par transduction lentivirale. Après avoir vérifié l'expression de MAGEA1 dans ces cellules, les tests de résistance réalisés n'ont pas

montré de résistance aux agents testés (étoposide, docétaxel et 5-fluorouracile). Ces observations n'ont donc pas permis de mettre en évidence une activité anti-apoptotique indépendante de p53.

Une résistance à l'étoposide dans des cellules primaires dérivées de mélanomes et exprimant les gènes MAGEA a déjà été identifiée. Celle-ci était proportionnelle au niveau d'expression des gènes MAGEA dans ces cellules et pouvait être levé par l'inhibition des MAGE-I par siRNA [32]. Afin de déterminer si la protéine MAGEA1 humaine est capable de conférer une résistance à l'étoposide dans des cellules primaires, nous avons dérivé des splénocytes à partir des souris transgéniques CAG-MAGEA1^{+/-}/PGK-Cre^{+/-}. Aucune différence significative entre la viabilité des splénocytes dérivés des souris CAG-MAGEA1^{+/-}/PGK-Cre^{+/-} et CAG-MAGEA1^{-/-}/PGK-Cre^{+/-} n'a été identifiée suggérant que MAGEA1 ne confère pas de résistance à ces cellules. Au cours de cette expérience, la vérification de l'excision de la cassette « STOP » a été réalisée lors de la PCR de génotypage mais n'a pas été réalisée sur l'ADN des lymphocytes primaires. Cependant, la recombinaison Cre, dont l'expression est dirigée par le promoteur PGK (phosphoglycérate kinase), est active très tôt au cours du développement (déjà active dans l'ovule). Dès lors, toutes les cellules dérivant du stade zygote sont porteuses de l'allèle CAG-MAGEA1 recombiné [73]. De plus, le promoteur CAG présente une activité forte dans les splénocytes [74]. Cela suggère que MAGEA1 est exprimé dans les splénocytes mais l'expression de MAGEA1 dans ces cellules devrait tout de même être vérifiée.

Finalement, la résistance à l'étoposide des cellules ES exprimant MAGEA1 a également été évaluée. Les cellules ont été traitées avec de l'étoposide (0,05 μM) et leur viabilité a été évaluée par MTT. Aucune différence de viabilité entre les cellules ES exprimant ou non MAGEA1 n'a été observé mais ceci pourrait s'expliquer par le fait que dans ces cellules, les stress génotoxiques entraînent une apoptose indépendante de p53 [75].

Au cours de ce mémoire, nous avons tenté de déterminer si la protéine MAGEA1 humaine est capable d'exercer ses fonctions dans un contexte cellulaire murin. Les expériences menées dans les cellules NIH3T3 et cellules ES sont encourageantes et indiquent que l'expression de MAGEA1 dans ces cellules entraîne une diminution du niveau et probablement de l'activité de p53. En revanche, nous n'avons pas observé d'effet de MAGEA1 dans les splénocytes primaires dérivés des souris transgéniques CAG-MAGEA1^{+/-}/PGK-Cre^{+/-}. Il serait donc intéressant d'évaluer la résistance d'autres cellules primaires dérivées de ces souris telles que des mélanocytes ou des MEFs (mouse embryonic fibroblastes).

En plus de son effet sur p53, MAGEA1 pourrait favoriser le développement de tumeur par d'autres mécanismes. Dans cette optique, indépendamment de nos observations sur p53, le modèle transgénique décrit au début de ce travail reste intéressant à explorer.

V. Références

- [1] P. Van der Bruggen, C. Traversari, and E. Al., "A Gene Encoding an Antigen Recognized by Cytolytic T Lymphocytes on a Human Melanoma," *J. Immunol.*, vol. 254, no. December, pp. 2617–2621, 1991.
- [2] A. Van Pel, F. Vessièrè, and T. Boon, "Protection against two spontaneous mouse leukemias conferred by immunogenic variants obtained by mutagenesis.," *J. Exp. Med.*, vol. 157, no. 6, pp. 1992–2001, Jun. 1983.
- [3] P. Chomez, O. De Backer, M. Bertrand, E. De Plaen, T. Boon, and S. Lucas, "An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family.," *Cancer Res.*, vol. 61, no. 14, pp. 5544–51, Jul. 2001.
- [4] J. M. Doyle, J. Gao, J. Wang, M. Yang, and P. R. Potts, "MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases.," *Mol. Cell*, vol. 39, no. 6, pp. 963–74, Sep. 2010.
- [5] E. De Plaen, C. Traversari, J. J. Gaforio, J.-P. Szikora, C. De Smet, F. Brasseur, P. van der Bruggen, B. Lethé, C. Lurquin, P. Chomez, O. De Backer, T. Boon, K. Arden, W. Cavenee, and R. Brasseur, "Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family," *Immunogenetics*, vol. 40, no. 5, pp. 360–369, Sep. 1994.
- [6] P. A. Barker and A. Salehi, "The MAGE Proteins : Emerging Roles in Cell Cycle Progression , Apoptosis , and Neurogenetic Disease," *J. Neurosci. Res.*, vol. 712, no. October 2001, pp. 705–712, 2002.
- [7] M. Sang, L. Wang, C. Ding, X. Zhou, B. Wang, L. Wang, Y. Lian, and B. Shan, "Melanoma-associated antigen genes - an update.," *Cancer Lett.*, vol. 302, no. 2, pp. 85–90, Mar. 2011.
- [8] M. Bertrand, I. Huijbers, P. Chomez, and O. De Backer, "Comparative expression analysis of the MAGED genes during embryogenesis and brain development.," *Dev. Dyn.*, vol. 230, no. 2, pp. 325–34, Jun. 2004.
- [9] C. Dombret, T. Nguyen, O. Schakman, J. L. Michaud, H. Hardin-Pouzet, M. J. M. Bertrand, and O. De Backer, "Loss of Maged1 results in obesity, deficits of social interactions, impaired sexual behavior and severe alteration of mature oxytocin production in the hypothalamus.," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 21, no. 21, pp. 4703–17, Nov. 2012.
- [10] X. Wang, J. Tang, L. Xing, G. Shi, H. Ruan, X. Gu, Z. Liu, X. Wu, X. Gao, and Y. Xu, "Interaction of MAGED1 with nuclear receptors affects circadian clock function.," *EMBO J.*, vol. 29, no. 8, pp. 1389–400, Apr. 2010.
- [11] O. De Backer, A. M. Verheyden, B. Martin, D. Godelaine, E. De Plaen, R. Brasseur, P. Avner, and T. Boon, "Structure, chromosomal location, and expression pattern of three mouse genes homologous to the human MAGE genes.," *Genomics*, vol. 28, no. 1, pp. 74–83, Jul. 1995.

- [12] T. De Backer, Olivier, Verheyden, Anne-Marie, Martin, Béatrice, Godelaine, Danièle, De Plaen, Etienne, Brasseur, Robert, Avner, Philip, Boon, "Structure, chromosomal location, and expression pattern of three mouse genes homologous to the human MAGE genes." *Genomics*, pp. 74–83, 1995.
- [13] K. Ohman Forslund and K. Nordqvist, "The melanoma antigen genes--any clues to their functions in normal tissues?," *Exp. Cell Res.*, vol. 265, no. 2, pp. 185–94, May 2001.
- [14] E. De Plaen, O. De Backer, D. Arnaud, B. Bonjean, P. Chomez, P. Avner, P. Baldacci, C. Babinet, S. Hwang, B. Knowles, and T. Boon, "A New Family of Mouse Genes Homologous to the Human MAGE Genes," vol. 184, pp. 176–184, 1999.
- [15] Y. Katsura and Y. Satta, "Evolutionary history of the cancer immunity antigen MAGE gene family.," *PLoS One*, vol. 6, no. 6, p. e20365, Jan. 2011.
- [16] Q. Zhao, O. L. Caballero, A. J. G. Simpson, and R. L. Strausberg, "Differential evolution of MAGE genes based on expression pattern and selection pressure.," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, p. e48240, Jan. 2012.
- [17] C. De Smet, S. J. Courtois, I. Faraoni, C. Lurquin, J. P. Szikora, O. De Backer, and T. Boon, "Involvement of two Ets binding sites in the transcriptional activation of the MAGE1 gene.," *Immunogenetics*, vol. 42, no. 4, pp. 282–90, Jan. 1995.
- [18] C. D. E. Smet, O. D. E. Backer, I. Faraoni, C. Lurquin, and F. Brasseur, "The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. July, pp. 7149–7153, 1996.
- [19] C. De Smet, C. Lurquin, B. Lethé, C. D. E. Smet, B. Lethe, and T. Boon, "DNA Methylation Is the Primary Silencing Mechanism for a Set of Germ Line- and Tumor-Specific Genes with a CpG-Rich Promoter 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.*, vol. 19, pp. 7327–7335, 1999.
- [20] C. De Smet, A. Loriot, and T. Boon, "Promoter-dependent mechanism leading to selective hypomethylation within the 5' region of gene MAGE-A1 in tumor cells.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 11, pp. 4781–90, Jun. 2004.
- [21] F. Wischnewski, K. Pantel, and H. Schwarzenbach, "Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in human cancer cells.," *Mol. Cancer Res.*, vol. 4, no. 5, pp. 339–49, May 2006.
- [22] S. D. Weeraratne, V. Amani, A. Neiss, N. Teider, D. K. Scott, S. L. Pomeroy, and Y. Cho, "miR-34a confers chemosensitivity through modulation of MAGE-A and p53 in medulloblastoma.," *Neuro. Oncol.*, vol. 13, no. 2, pp. 165–75, Feb. 2011.
- [23] V. B. Chomez. P, Williiams. R, De Backer. O, Boon. T, "The S MAGE gene family is expressed in post-meiotic spermatids during mouse germ cell differentiation," *Immunogenetics*, vol. 43, pp. 97–100, 1995.

- [24] F. Clotman, O. De Backer, E. De Plaen, T. Boon, and J. Picard, "Cell- and stage-specific expression of mage genes during mouse spermatogenesis.," *Mamm. Genome*, vol. 11, no. 8, pp. 696–9, Aug. 2000.
- [25] K. Takahashi, S. Shichijo, M. Noguchi, M. Hirohata, and K. Itoli, "Identification of MAGE-1 and MAGE-4 Proteins in Spermatogonia and Primary Spermatocytes of Testis Advances in Brief Identification of MAGE-1 and MAGE-4 Proteins in Spermatogonia and Primary Spermatocytes of Testis1," *Cancer Res.*, vol. 55, pp. 3478–3482, 1995.
- [26] S. Laduron, R. Deplus, S. Zhou, O. Kholmanskikh, D. Godelaine, C. De Smet, S. D. Hayward, F. Fuks, T. Boon, and E. De Plaen, "MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, no. 14, pp. 4340–50, Jan. 2004.
- [27] R. W. Johnstone, A. A. Ruefli, and S. W. Lowe, "Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy.," *Cell*, vol. 108, no. 2, pp. 153–64, Jan. 2002.
- [28] S. W. Lee, M. W. Seong, Y. J. Jeon, and C. H. Chung, "Ubiquitin E3 ligases controlling p53 stability," *Animal Cells Syst. (Seoul)*, vol. 16, no. 3, pp. 173–182, Jun. 2012.
- [29] T. Riley, E. Sontag, P. Chen, and A. Levine, "Transcriptional control of human p53-regulated genes.," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 9, no. 5, pp. 402–12, May 2008.
- [30] J. E. Chipuk and D. R. Green, "Dissecting p53-dependent apoptosis.," *Cell Death Differ.*, vol. 13, no. 6, pp. 994–1002, Jun. 2006.
- [31] M. Mihara, S. Erster, A. Zaika, O. Petrenko, T. Chittenden, P. Pancoska, and U. M. Moll, "p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria.," *Mol. Cell*, vol. 11, no. 3, pp. 577–90, Mar. 2003.
- [32] M. Monte, M. Simonatto, L. Y. Peche, D. R. Bublik, S. Gobessi, M. a Pierotti, M. Rodolfo, and C. Schneider, "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.*, vol. 103, no. 30, pp. 11160–5, Jul. 2006.
- [33] L. Marcar, N. J. Maclaine, T. R. Hupp, and D. W. Meek, "Mage-A cancer/testis antigens inhibit p53 function by blocking its interaction with chromatin.," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 24, pp. 10362–70, Dec. 2010.
- [34] B. Yang, S. M. O'Herrin, J. Wu, S. Reagan-Shaw, Y. Ma, K. M. R. Bhat, C. Gravekamp, V. Setaluri, N. Peters, F. M. Hoffmann, H. Peng, A. V Ivanov, A. J. G. Simpson, and B. J. Longley, "MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines.," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 20, pp. 9954–62, Oct. 2007.

- [35] J. R. Friedman, W. J. Fredericks, D. E. Jensen, D. W. Speicher, X. P. Huang, E. G. Neilson, and F. J. Rauscher, "KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain.," *Genes Dev.*, vol. 10, no. 16, pp. 2067–2078, Aug. 1996.
- [36] D. C. Schultz, K. Ayyanathan, D. Negorev, G. G. Maul, and F. J. Rauscher, "SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins.," *Genes Dev.*, vol. 16, no. 8, pp. 919–32, Apr. 2002.
- [37] C. Wang, A. Ivanov, L. Chen, W. J. Fredericks, E. Seto, F. J. Rauscher, and J. Chen, "MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation.," *EMBO J.*, vol. 24, no. 18, pp. 3279–90, Sep. 2005.
- [38] Y. Feng, J. Gao, and M. Yang, "When MAGE meets RING: insights into biological functions of MAGE proteins.," *Protein Cell*, vol. 2, no. 1, pp. 7–12, Jan. 2011.
- [39] E. B. Rankin and A. J. Giaccia, "The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis.," *Cell Death Differ.*, vol. 15, no. 4, pp. 678–85, Apr. 2008.
- [40] O. Aprelikova, S. Pandolfi, S. Tackett, M. Ferreira, K. Salnikow, Y. Ward, J. I. Risinger, J. C. Barrett, and J. Niederhuber, "Melanoma antigen-11 inhibits the hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase 2 and activates hypoxic response.," *Cancer Res.*, vol. 69, no. 2, pp. 616–24, Jan. 2009.
- [41] B. He, L. W. Lee, J. T. Mingos, and E. M. Wilson, "Dependence of selective gene activation on the androgen receptor NH₂- and COOH-terminal interaction.," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 28, pp. 25631–9, Jul. 2002.
- [42] S. Bai and E. M. Wilson, "Epidermal-growth-factor-dependent phosphorylation and ubiquitinylation of MAGE-11 regulates its interaction with the androgen receptor.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 28, no. 6, pp. 1947–63, Mar. 2008.
- [43] H. Higashitsuji, K. Itoh, T. Nagao, S. Dawson, K. Nonoguchi, T. Kido, R. J. Mayer, S. Arii, and J. Fujita, "Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas.," *Nat. Med.*, vol. 6, no. 1, pp. 96–9, Jan. 2000.
- [44] H. Higashitsuji, H. Higashitsuji, K. Itoh, T. Sakurai, T. Nagao, Y. Sumitomo, H. Sumitomo, T. Masuda, S. Dawson, Y. Shimada, R. J. Mayer, and J. Fujita, "The oncoprotein gankyrin binds to MDM2/HDM2, enhancing ubiquitylation and degradation of p53.," *Cancer Cell*, vol. 8, no. 1, pp. 75–87, Jul. 2005.
- [45] T. Nagao, H. Higashitsuji, K. Nonoguchi, T. Sakurai, S. Dawson, R. J. Mayer, K. Itoh, and J. Fujita, "MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity.," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 12, pp. 10668–74, Mar. 2003.
- [46] T. Sakurai, K. Itoh, H. Higashitsuji, T. Nagao, K. Nonoguchi, T. Chiba, and J. Fujita, "A cleaved form of MAGE-A4 binds to Miz-1 and induces apoptosis in human cells.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 15, pp. 15505–14, Apr. 2004.

- [47] M. R. Stratton, P. J. Campbell, and P. A. Futreal, "The cancer genome.," *Nature*, vol. 458, no. 7239, pp. 719–24, Apr. 2009.
- [48] Y. Lian, M. Sang, C. Ding, X. Zhou, X. Fan, Y. Xu, W. Lü, and B. Shan, "Expressions of MAGE-A10 and MAGE-A11 in breast cancers and their prognostic significance: a retrospective clinical study.," *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, vol. 138, no. 3, pp. 519–27, Mar. 2012.
- [49] E. J. Jung, M. a Kim, H. S. Lee, H. K. Yang, Y. M. Lee, B. L. Lee, and W. H. Kim, "Expression of family A melanoma antigen in human gastric carcinoma.," *Anticancer Res.*, vol. 25, no. 3B, pp. 2105–11, 2005.
- [50] Z. Duan, Y. Duan, D. E. Lamendola, R. Z. Yusuf, R. Naeem, R. T. Penson, and M. V Seiden, "Overexpression of MAGE/GAGE genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant human cancer cell lines.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 9, no. 7, pp. 2778–85, Jul. 2003.
- [51] P.-P. Wong, C. C. Yeoh, a S. Ahmad, C. Chelala, C. Gillett, V. Speirs, J. L. Jones, and H. C. Hurst, "Identification of MAGEA antigens as causal players in the development of tamoxifen-resistant breast cancer.," *Oncogene*, vol. 33, no. 37, pp. 4579–88, Sep. 2014.
- [52] W. Liu, S. Cheng, S. L. Asa, and S. Ezzat, "The melanoma-associated antigen A3 mediates fibronectin-controlled cancer progression and metastasis.," *Cancer Res.*, vol. 68, no. 19, pp. 8104–12, Oct. 2008.
- [53] D. Baup, M. Moser, S. Schurmans, and O. Leo, "Developmental regulation of the composite CAG promoter activity in the murine T lymphocyte cell lineage.," *Genesis*, vol. 47, no. 12, pp. 799–804, Dec. 2009.
- [54] M. Gordaliza, P. a García, J. M. M. del Corral, M. a Castro, and M. a Gómez-Zurita, "Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives.," *Toxicol.*, vol. 44, no. 4, pp. 441–59, Sep. 2004.
- [55] J. Ackermann, M. Frutschi, K. Kaloulis, T. McKee, A. Trumpp, and F. Beermann, "Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background.," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 10, pp. 4005–11, May 2005.
- [56] A. Li, Y. Ma, M. Jin, S. Mason, R. L. Mort, K. Blyth, L. Larue, O. J. Sansom, and L. M. Machesky, "Activated mutant NRas(Q61K) drives aberrant melanocyte signaling, survival, and invasiveness via a Racl-dependent mechanism.," *J. Invest. Dermatol.*, vol. 132, no. 11, pp. 2610–21, Nov. 2012.
- [57] J. Ackermann, M. Frutschi, K. Kaloulis, A. N. Qk, I. Background, T. Mckee, A. Trumpp, and F. Beermann, "Metastasizing Melanoma Formation Caused by Expression of Activated N-Ras Q61K on an INK4a-Deficient Background Metastasizing Melanoma Formation Caused by Expression of," *Cancer Res.*, pp. 4005–4011, 2005.

- [58] E. Grafström, S. Egyházi, U. Ringborg, J. Hansson, and A. Platz, "Biallelic deletions in INK4 in cutaneous melanoma are common and associated with decreased survival.," *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, no. 8, pp. 2991–7, Apr. 2005.
- [59] T. K.-W. Lee, T. C.-M. Lau, and I. O.-L. Ng, "Doxorubicin-induced apoptosis and chemosensitivity in hepatoma cell lines.," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 49, no. 1, pp. 78–86, Jan. 2002.
- [60] P. Heisig, "Type II topoisomerases--inhibitors, repair mechanisms and mutations.," *Mutagenesis*, vol. 24, no. 6, pp. 465–9, Nov. 2009.
- [61] J.-H. Lee and T. T. Paull, "ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex.," *Science*, vol. 308, no. 5721, pp. 551–4, Apr. 2005.
- [62] D. Michael and M. Oren, "The p53–Mdm2 module and the ubiquitin system," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 13, no. 1, pp. 49–58, Feb. 2003.
- [63] L. T. Vassilev, B. T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fotouhi, and E. A. Liu, "In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2.," *Science*, vol. 303, no. 5659, pp. 844–8, Feb. 2004.
- [64] P. Secchiero, E. Barbarotto, M. Tiribelli, C. Zerbinati, M. G. di Iasio, A. Gonelli, F. Cavazzini, D. Campioni, R. Fanin, A. Cuneo, and G. Zauli, "Functional integrity of the p53-mediated apoptotic pathway induced by the nongenotoxic agent nutlin-3 in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL).," *Blood*, vol. 107, no. 10, pp. 4122–9, May 2006.
- [65] Y. Ziv, D. Bielopolski, Y. Galanty, C. Lukas, Y. Taya, D. C. Schultz, J. Lukas, S. Bekker-Jensen, J. Bartek, and Y. Shiloh, "Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 8, no. 8, pp. 870–6, Aug. 2006.
- [66] M. F. Ladelfa, L. Y. Peche, M. F. Toledo, J. E. Laiseca, C. Schneider, and M. Monte, "Tumor-specific MAGE proteins as regulators of p53 function.," *Cancer Lett.*, vol. 325, no. 1, pp. 11–7, Dec. 2012.
- [67] A. Yagi, Y. Hasegawa, H. Xiao, M. Haneda, E. Kojima, A. Nishikimi, T. Hasegawa, K. Shimokata, and K.-I. Isobe, "GADD34 induces p53 phosphorylation and p21/WAF1 transcription.," *J. Cell. Biochem.*, vol. 90, no. 6, pp. 1242–9, Dec. 2003.
- [68] W. S. el-Deiry, T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein, "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression.," *Cell*, vol. 75, no. 4, pp. 817–25, Nov. 1993.
- [69] G. R. Merlo, F. Basolo, L. Fiore, L. Duboc, and N. E. Hynes, "p53-dependent and p53-independent activation of apoptosis in mammary epithelial cells reveals a survival function of EGF and insulin.," *J. Cell Biol.*, vol. 128, no. 6, pp. 1185–96, Mar. 1995.

- [70] N. O. Karpnich, M. Tafani, R. J. Rothman, M. a Russo, and J. L. Farber, "The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c.," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, no. 19, pp. 16547–52, May 2002.
- [71] M. D. Kaeser, S. Pebernard, and R. D. Iggo, "Regulation of p53 stability and function in HCT116 colon cancer cells.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 9, pp. 7598–605, Feb. 2004.
- [72] N. M. Mhaidat, Y. Wang, K. a Kiejda, X. D. Zhang, and P. Hersey, "Docetaxel-induced apoptosis in melanoma cells is dependent on activation of caspase-2.," *Mol. Cancer Ther.*, vol. 6, no. 2, pp. 752–61, Feb. 2007.
- [73] Y. Lallemand, V. Luria, R. Haffner-Krausz, and P. Lonai, "Maternally expressed PGK-Cre transgene as a tool for early and uniform activation of the Cre site-specific recombinase.," *Transgenic Res.*, vol. 7, no. 2, pp. 105–12, Mar. 1998.
- [74] D. Baup, M. Moser, S. Schurmans, and O. Leo, "Developmental regulation of the composite CAG promoter activity in the murine T lymphocyte cell lineage.," *Genesis*, vol. 47, no. 12, pp. 799–804, Dec. 2009.
- [75] M. I. Aladjem, B. T. Spike, L. W. Rodewald, T. J. Hope, M. Klemm, R. Jaenisch, and G. M. Wahl, "ES cells do not activate p53-dependent stress responses and undergo p53-independent apoptosis in response to DNA damage.," *Curr. Biol.*, vol. 8, no. 3, pp. 145–55, Jan. 1998.