

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Rôle de MAGEA1 dans la réponse aux stress génotoxiques

Putman, Marc

Award date:
2011

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



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

Faculté des Sciences

Rôle de *MAGEA1* dans la réponse aux stress génotoxiques

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

Marc PUTMAN

Juin 2011

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES**

Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR

Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20

E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Rôle de *MAGEA1* dans la réponse aux stress génotoxiques

PUTMAN Marc

Résumé

Les gènes *MAGE* de type I ont été identifiés à l'origine par leur capacité à spécifier des protéines à l'origine d'antigènes spécifiques des tumeurs (Van der Bruggen et al., 1991). Les antigènes *MAGE* servent actuellement de cible dans des essais d'immunothérapie anticancéreuse (voir p.ex. Brichard et al., 2008). Les gènes *MAGE* de type I sont silencieux dans la plupart des tissus normaux, mais sont exprimés de façon ectopique dans une fraction significative de tumeurs cancéreuses de divers histotypes (mélanomes, tumeurs gastro-intestinales, tumeurs du poumon, du sein, de la prostate, de la vessie, neuroblastomes ...) (Van der Bruggen et al., 2002). La fonction des protéines *MAGE* et le rôle qu'elles pourraient jouer dans la biologie des tumeurs est longtemps restée obscure. Notre hypothèse est que l'expression des *MAGE* de type I par les cellules cancéreuses favorise le développement tumoral. Des travaux récents montrant que plusieurs protéines *MAGE* interfèrent avec p53 soutiennent cette hypothèse (Monte, Doyle, Marcar). Au cours de notre travail, nous avons étudié l'effet de l'expression ectopique de *MAGEA1* sur la réponse aux stress génotoxiques dans plusieurs modèles cellulaires. Dans des cellules ES de souris, *MAGEA1* réduit l'induction de p53 et l'induction de la caspase 3 après traitement à l'étoposide. Dans les MCF7 (lignée de cellules tumorales mammaires), *MAGEA1* entraîne une réduction de l'induction de p21 (une cible transcriptionnelle directe de p53) sans modification apparente du niveau de p53, ce qui semble indiquer que dans ce modèle, *MAGEA1* interfère avec p53 en réduisant son activité transcriptionnelle plutôt que sa stabilité. Il semble donc qu'en fonction du contexte cellulaire, *MAGEA1* puisse modifier soit la stabilité de p53, soit son activité transcriptionnelle. Nous avons aussi montré que *MAGEA1* augmente la résistance des MFC7 à la doxorubicine et au docétaxel, deux drogues utilisées en chimiothérapie anticancéreuse. Ces résistances pourraient toutes deux être expliquées par l'interférence avec p53. Enfin, nous avons montré dans un test de formation de colonies après transfection de cellules d'ostéosarcome SAOS-2 que *MAGEA1* protège les cellules de l'effet toxique de p53. Pour conclure, nous avons montré que *MAGEA1* interfère avec l'activité de p53 dans différents modèles cellulaires. L'expression de *MAGEA1* (et d'autres protéines *MAGE*) pourrait donc favoriser le développement de tumeurs en inhibant p53.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Juin 2011

Promoteur: O. De Backer

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur O. De Backer de m'avoir accepté au sein de son laboratoire et de m'avoir suivi tout au long de ce mémoire.

Je remercie également Elise SROURE, ma doctorante, pour son aide, son amitié et de m'avoir encadré lors de ce mémoire. Un grand merci au reste de l'équipe : Carlos, Dominique, Coraline et Christiane.

Je tiens à remercier du fond du cœur mes parents, sans qui je n'aurais pu entreprendre de telles études. Je remercie également mes deux frères et ma sœur: Pierre, l'ainé, pour sa patience, son soutien et ses paroles encourageantes lors des moments difficiles ; David, mon « petit » frère, pour sa bonne humeur et les nombreux moments de rigolades et Cassandra pour ses nombreux messages d'encouragement. Une toute grande pensée pour ma marraine et mon parrain qui ont toujours été présents quand j'en avais besoin, merci à vous tous.

Je remercie mes amis et amies et plus particulièrement mes anciens cokotteurs (ils se reconnaîtront tous), Thomas, Alizée, Diane, Jonathan, Thibault, Julien, Gaël, Guitou, Caro, Anaïs, Pauline et Florence pour ses nombreuses années passées ensemble et de les avoir rendues inoubliables. Un tout grand merci "aux filles" à qui, j'aurai toujours une histoire à raconter, encore merci pour tout votre soutien, écoute et tous les agréables moments passés.

J'adresse toute ma gratitude aux Professeurs C. Michiels et P. Renard, à D. Desmet et à C. Dombret d'avoir accepté de lire ce mémoire.

Enfin, merci à tous ceux que je n'aurais pas cité et qui, de près ou de loin m'ont aidé au cours de ce mémoire.

Merci encore...

Liste des abréviations

Liste des abréviations

ABC	ATP-binding cassette
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGAT	O-alkylguanine-DNA-alkyltransferase
APS	Ammonium persulfate
ATP	Adenosine triphosphate
ARN	Acide ribonucléique
bp	Base pair
BSA	Bovine serum albumin
°C	Degré Celsius
CaCl ₂	Chlorure de calcium
Ca ₃ (PO ₄) ₂	Phosphate de calcium
CARD	Caspase Recruitment Domain
CBF1	C-promoteur binding factor 1
CFA	Colony formation assay (test de formation de colonies)
CIAA	Chloroform IsoAmyl Alcohol
CIP	Phosphatase alcaline intestinale de veau
CMH-I	Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CO ₂	Dioxyde de carbone
CTA	Cancer testis antigen
CTL	Contrôle
CTLs	Lymphocytes T cytolytiques
Cellule ES	Cellule souche embryonnaire (Embryonic stem cell)
DED	Death Effector Domain
DISC	Death-inducing signal complex
dNTP	Déoxynucléotide triphosphate
DO	Densité optique
DMEM	Dulbecco's modified eagle media
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
E. Coli	Escherichia coli
EDTA	Acide éthylène diamine tetra acétique
EGF	Epidermal Growth Factor
EtOH	Ethanol
FADD	Fas-associated death domain
FBS	Fetal bovine serum
GMEM	Glasgow modified eagle medium
H ₂ O	Eau
HAT	Histone acétyl transférase
HBS	HEPES buffered saline
HC	Hydrocortisone
HCl	Chlorure d'hydrogène
HDAC	Histone déacétylase
HIF	Hypoxia-Inducible Factors
HLA	Human leukocyte antigen
HS	Horse Serum
IAP	Inhibitor of apoptosis
IC50	Concentration inhibitrice à 50%
KAP1	KRAB-associated protein 1

Liste des abréviations

Kb	kilo base
KCl	Chlorure de potassium
kD	Kilo Dalton
KRAB	Krueppel-associated box
LB	Luria Bertani
LIF	Leukemia Inhibitor Factor
xM	x Molaire
MAGE	Melanoma Antigène Encoding Gene
MAGE	Protéine MAGE
<i>MAGE</i>	Gène MAGE
MEF	Mouse embryonic fibroblast
mg	milligramme
MHD	Mage homology domain
ml	millilitre
NaCl	Chlorure de sodium
NeAA	Acides aminés non-essentiels
nm	Nanomètre
PAF	Paraformaldéhyde
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PHD	HIF prolyl hydroxylase
PLB	Passive Lysis Buffer
PVDF	PolyVinylineDiFluoride
RE	Reticulum endoplasmique
ROS	Dérivés réactifs de l'oxygène
rpm	Rotation par minute
RT	Room Temperature
SDS	Sodium lauryl sulfate ou sodium dodecyl sulfate
SKIP	Ski interacting protein
TAP	Transporter of antigen peptides
TC	Toxine Cholérique
TCR	Récepteur de lymphocyte T cytolytique
TE	Tris EDTA
TEMED	Tetramethylethylenediamine
Tm	Température de melting
TNF-R	Récepteurs de facteurs de nécrose tumorale
TVP	Trypsin-EDTA pour cellules souches
U	Unité
UV	Ultraviolet
V	Volt

Table des matières

Introduction

1.	La famille des gènes <i>MAGE</i>	3
1.1	Découvertes et caractéristiques des gènes <i>MAGE</i>	3
2.	Les gènes <i>MAGE</i> de type I.....	5
2.1	La sous-famille des gènes <i>MAGEA</i>	7
2.2	Le gène <i>MAGEA1</i>	7
2.3	Partenaires d'interactions des protéines <i>MAGEA</i>	8
3.	La résistance aux drogues chimiothérapeutiques.....	12
3.1	L'apoptose.....	13
3.1.1	La voie extrinsèque.....	13
3.1.2	La voie intrinsèque.....	14
3.1.3	Les caspases.....	14
3.2	Les modulateurs de l'apoptose.....	15
3.2.1	p53.....	15
3.2.2	IAPs.....	15
3.2.3	Les protéines de la famille Bcl-2.....	15
4.	Rôle de <i>MAGEA</i> dans la chimiorésistance.....	16
5.	Objectifs du mémoire.....	16

Matériels et méthodes

1.	Culture cellulaire.....	17
1.1	Les cellules MCF-7.....	17
1.2	Les cellules MCF-10A.....	17
1.3	Les cellules SAOS-2.....	18
1.4	Les cellules souches embryonnaires de souris.....	18
2.	Techniques liées à la manipulation de cellules.....	19
2.1	Ensemencement des cellules.....	19
2.2	Transfection des cellules au phosphate de calcium ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$).....	19
2.3	Transfection des cellules à l'Exgen500.....	20
2.4	Colony formation assay (CFA).....	20
2.5	Dosage de l'activité luciférase.....	20
3.	Techniques immunologiques.....	20
3.1	Western Blotting.....	20
3.2	Méthodes.....	22
3.2.1	Extraction totale de protéines.....	22
3.2.2	Dosage des protéines.....	22
3.2.3	Western Blotting.....	23
4.	Techniques liées à la manipulation d'ADN.....	23
4.1	Culture bactérienne.....	23
4.2	Préparation d'ADN plasmidique.....	23
4.2.1	Mini-préparation.....	23
4.2.2	Maxi-préparation.....	23
4.3	Electrophorèse en gel d'agarose.....	24
4.4	Restriction sur plasmide.....	24
4.5	Déphosphorylation d'un plasmide linéarisé.....	24
4.6	Ligation d'un vecteur.....	24
4.7	Purification de l'ADN sur colonne (<i>Kit Promega Wizzard SV Gel and PCR Clean-Up System</i>).....	24
4.8	Polymerase Chain Reaction (PCR).....	24
5.	Techniques liées à la manipulation d'ARN.....	25
5.1	Extraction d'ARN total.....	25

5.2. Rétro-transcription après extraction de l'ARN	25
5.3. Amplification par PCR quantitative en temps réel (qPCR)	25

Résultats

1. Construction de vecteurs lentiviraux d'expression de <i>MAGEA1</i>	27
1.1. Amplification de la partie codante de <i>MAGEA1</i>	27
1.2. Insertion de <i>MAGEA1</i> dans le plasmide pCR8	30
1.3. Sous-clonage de la partie codante de <i>MAGEA1</i> dans le vecteur pTM898	30
1.4. Séquençage du vecteur final pTM898- <i>A1</i>	31
2. Validation des cellules transduites par le lentivirus gouvernant l'expression de <i>MAGEA1</i> par Western Blot.....	31
3. Effets de <i>MAGEA1</i> sur l'apoptose et la prolifération cellulaire.....	32
3.1. Effet de <i>MAGEA1</i> sur l'induction de p53, de p21 et sur l'activation de la caspase-3 dans les cellules embryonnaires de souris traitées à l'Etoposide	32
3.2. Effet de <i>MAGEA1</i> sur l'expression de p53 et de p21 dans des cellules MCF-10A traitées à l'Etoposide	33
3.3. Effet de <i>MAGEA1</i> sur l'expression de p53 et de p21 dans des cellules MCF-7 traitées à l'Etoposide	34
3.4. Etude de l'effet de <i>MAGEA1</i> sur l'activité du promoteur de p21 après traitement à l'Etoposide	35
3.5. Effet de <i>MAGEA1</i> sur la formation de foci par des cellules SAOS-2 transfectées par p53	36
4. Etude de l'effet de <i>MAGEA1</i> sur la résistance des cellules face à des drogues chimiothérapeutiques	37
4.1. Détermination des IC50 à 48h pour les cellules MCF-10A et MCF-7	38
4.2. Effet de <i>MAGEA1</i> sur la résistance des cellules MCF-10A à la Doxorubicine, au Docetaxel et au 5-Fluorouracil	38
4.3. Résistance des cellules MCF-7 à la Doxorubicine, au Docetaxel et au 5-Fluorouracil en présence de <i>MAGEA1</i>	40

Discussion

1. <i>MAGEA1</i> , p53 et l'apoptose	42
2. Rôle de <i>MAGEA1</i> dans la résistance des cellules à des agents chimiothérapeutiques.....	43

Perspectives

Introduction

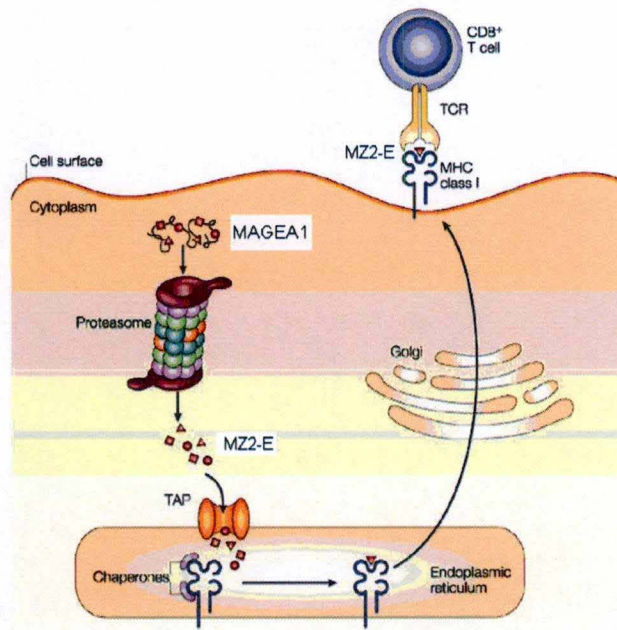
1. La famille des gènes *MAGE*

1.1 Découvertes et caractéristiques des gènes *MAGE*

Dans les années 80, il a été montré que la plupart des cellules tumorales exprimaient en surface des peptides antigéniques capables d'être reconnus par des lymphocytes T cytolytiques (CTLs). Plus tard, en 1991, le professeur Thierry Boon et son équipe, à l'Institut Ludwig de Bruxelles, ont mis au point une méthode d'identification de ces antigènes tumoraux basée sur la capacité des CTLs à reconnaître des tumeurs. Des cellules de mélanome MZ2-MEL ont été mises en culture avec des lymphocytes issus du patient porteur de cette tumeur. Un grand nombre de ces cellules étaient lysées par ces lymphocytes T. Cependant, une faible portion des cellules survécurent et continuèrent à proliférer. Ceci permit d'isoler des cellules ayant perdu l'antigène reconnu par le clone CTL. Ces cellules variantes étaient toutefois reconnues par d'autres clones CTLs prouvant qu'il existe plusieurs antigènes à la surface des MZ2-MEL. Parmi ceux-ci figure l'antigène MZ2-E qui est capable d'activer le clone CTL anti-MZ2-E. Le gène codant pour cet antigène fut identifié en 1991. Il ne représentait aucune homologie avec des séquences issues de banques de données de l'époque et fut appelé *MAGE1* (Van Der Bruggen et al., 1991 ; Traversari et al., 1992).

L'antigène MZ2-E est un peptide de neuf acides aminés issu de la protéine *MAGE1* présenté à la surface cellulaire par les molécules HLA-A1 (Traversi et al, 1992). De manière générale, les antigènes reconnus par les CTLs sont des peptides d'une dizaine d'acides aminés issus de la dégradation de protéines par le protéasome. Ces peptides sont présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) à la surface de la cellule. Les protéines TAP ont un rôle de transporteur dont la fonction est de transférer les peptides dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE). Ces peptides vont ensuite s'associer au MHC-I formé d'une molécule HLA de classe I et de la β -2 microglobuline. Ce complexe nouvellement formé va être transporté à la surface de la cellule où il sera reconnu par les CTLs via le récepteur TCR. La présentation de peptides du « soi » ne déclenche, en temps normal, pas de réponse des CTLs. Si la cellule exprime des peptides du « non-soi », une réaction immunitaire peut être déclenchée.

Le gène *MAGE1* est silencieux dans tous les tissus normaux à l'exception des cellules issues de la lignée germinale mâle et de certaines cellules du placenta. Cependant, il est exprimé dans une proportion variable de tumeurs de différents types histologiques. Son expression peut alors conduire à la présentation de peptides antigéniques (Figure 1).



Nature Reviews | Immunology

Figure 1: Mécanisme de présentation d'un antigène à un lymphocyte T cytolytique par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (image adaptée d'après Yewdell et al, 2003).

Etant donné que les molécules HLA ne sont pas exprimées dans les cellules de la lignée germinale, les antigènes MAGE ne peuvent pas être présentés à la surface des cellules et ils sont donc spécifiques des cellules tumorales. Cette caractéristique fait des antigènes MAGE une cible particulièrement intéressante pour l'immunothérapie anti-cancéreuse (Figure 2) (Ottaviani et al, 2005).

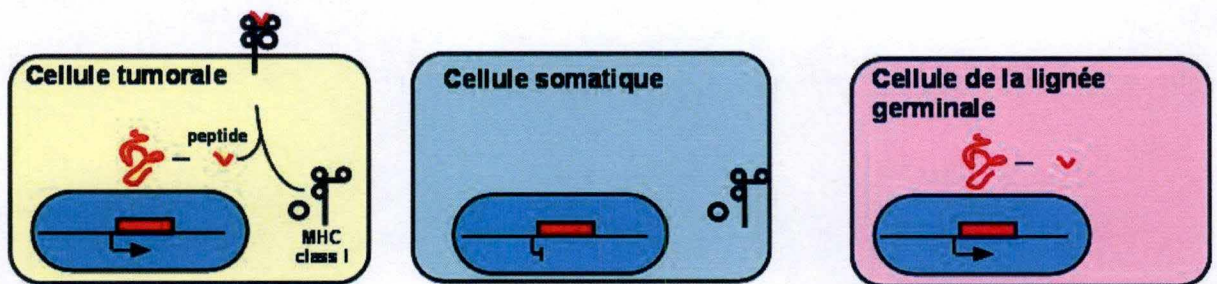


Figure 2: Schéma d'expression du gène *MAGEA1* dans les cellules tumorales, somatiques et de la lignée germinale.

Après la découverte de *MAGE1*, il fut montré que ce gène appartenait à une grande famille de gènes. Ainsi, 55 gènes *MAGE* humains et 30 gènes *MAGE* murins ont été identifiés grâce au séquençage des génomes humains et murins (Chomez et al, 2001).

Toutes les protéines de la famille *MAGE* contiennent un domaine conservé, appelé *MAGE* homology domain (MHD). Cette région correspond à 200 acides aminés, située à l'extrémité COOH-terminale des protéines à l'exception des protéines *MAGED*, dans lesquelles, le MHD se situe en une position plus centrale. La partie N-terminale est totalement différente d'une sous-famille de protéines *MAGE* à une autre (Figure 3) (Barker and Salehi, 2002 ; Laduron et al, 2004).

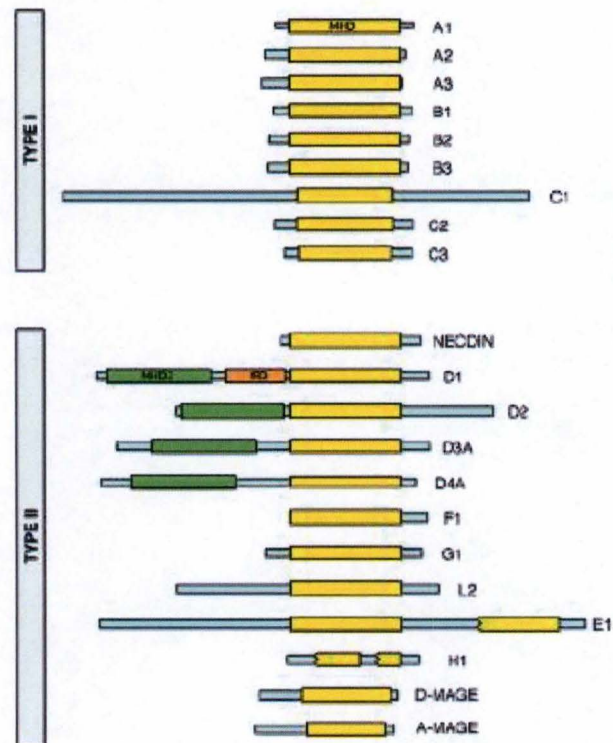


Figure 3: Représentation du domaine d'homologie des gènes *MAGE*, représenté en jaune, une région commune de 200 acides aminés partagée par les protéines *MAGE* (d'après Salehi et al, 2002).

2. Les gènes *MAGE* de type I

Il existe plusieurs classifications des gènes *MAGE*. En effet en se basant sur leur séquence et leur position chromosomique, on peut les classer en différentes sous-familles: de *MAGEA* à *MAGEL*. En se basant sur leur profil d'expression, on peut les classer en deux catégories: les gènes *MAGE* de type I et de type II.

Chez l'homme, plus de 45 gènes *MAGE* de type I ont été identifiés. Ils sont disposés en chapelets sur le chromosome X incluant les gènes des sous-familles *MAGEA*, *MAGEB* et *MAGEC* (Figure 4). Ces gènes sont caractérisés par un grand exon 3'-terminal encodant la protéine entière. Les gènes *MAGE* de type I ne sont pas exprimés dans les tissus normaux, à l'exception des cellules germinales mâles et pour certains, du placenta. Certains de ces gènes,

comme *MAGEA1*, sont exprimés dans des cellules tumorales de divers types histologiques (Chomez et al, 2001).

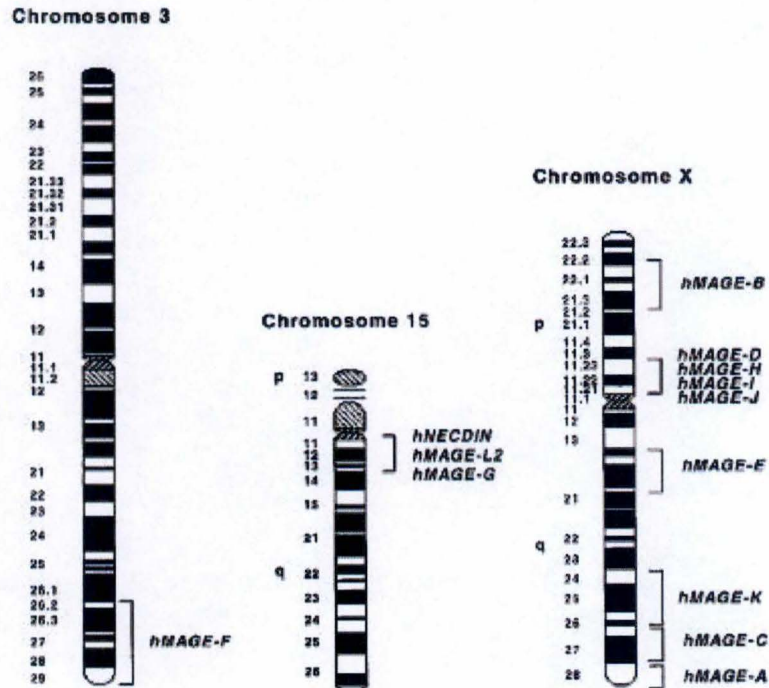


Figure 4: Localisation chromosomique des sous-familles des gènes MAGE humains (d'après Chomez et al, 2001).

Chez l'homme adulte, les gènes *MAGE* de type I sont exprimés exclusivement dans les testicules. Certains gènes *MAGEA* sont exprimés dans les spermatogonies (Takahashi et al, 1995). Chez la souris, certains gènes *MAGEB* sont exprimés dans les spermatides (Chomez et al, 1995), les cellules haploïdes se différenciant en spermatozoïdes. L'expression de différents gènes *MAGE* de type I à différents stades de la spermatogenèse suggère que ces gènes jouent un rôle dans la spermatogenèse (Clotman et al, 2000).

2.1 La sous-famille des gènes *MAGEA*

Chez l'homme, la sous-famille des gènes *MAGEA* comprend 12 gènes situés en Xq27-28.

2.2 Le gène *MAGEA1*

I) Contrôle transcriptionnel

L'expression des gènes est, entre-autre, régulée par des modifications épigénétiques. Les changements épigénétiques sont de deux types: la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones (Qiu et al, 2006).

Les dinucléotides CpG sont les sites majeurs de méthylation de la cytosine. Les îlots CpG sont distribués de manière inégale dans le génome humain. Environ 60% des promoteurs de mammifères contiennent des îlots CpG (Qiu et al, 2006). L'hyperméthylation des séquences CpG à l'extrémité 5' du gène *MAGEA1* empêche l'accès des activateurs Ets et SP1, contribuant ainsi à la répression transcriptionnelle du gène (De Smet et al, 1995). Dans les cellules somatiques, le promoteur de *MAGEA1*, pourtant très riche en CpG est méthylé, contrairement aux autres promoteurs présentant la même caractéristique. Cependant, dans les cellules germinales ainsi que dans les cellules tumorales exprimant le gène *MAGEA1*, le promoteur est sous-méthylé. Une expérience a montré que le traitement des cellules avec l'inhibiteur de méthylase de l'ADN 5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-CdR), induit l'expression du gène *MAGEA1* dans les cellules somatiques, n'exprimant normalement pas ce gène (De Smet et al, 1999). Ceci indique que la méthylation de l'ADN est essentielle à la répression de ce gène dans les cellules somatiques. Après déméthylation la transcription de *MAGEA1* éviterait sa méthylation.

Les gènes possédant des îlots CpG ne sont méthylés que dans deux cas : sur le chromosome X inactif des cellules somatiques femelles et sur les allèles silencieux des gènes soumis à l'empreinte parentale. En général, les gènes à îlots CpG sont déméthylés. Il semblerait donc que les gènes *MAGE* de type I représentent une exception car leur expression dans les cellules de la lignée germinale mâle ne dépendrait pas de la présence de facteurs de transcription spécifiques mais bien d'un processus de déméthylation de leur promoteur qui se produit au cours de la spermatogenèse. L'expression de ces gènes *MAGE* dans les cellules tumorales serait causée par le processus de déméthylation du génome qui se produit lors de l'oncogenèse (De Smet et al, 1996 ; De Smet et al, 1999).

L'expression des gènes n'est pas seulement contrôlée par la méthylation du promoteur mais également par la configuration de la chromatine. A la fois l'histone acétyltransférase et l'histone déacétylase (HDAC) sont impliquées dans les modifications résultant en un remodelage de la chromatine (Wischniewski et al, 2006). L'acétylation des histones ainsi que la déméthylation de l'ADN jouent un rôle important dans l'activation transcriptionnelle des gènes *MAGEA*.

2.3 Partenaires d'interactions des protéines MAGEA

a) HDAC

Par un double-hybride en levure, Laduron et ses collaborateurs, ont montré que MAGEA1 interagissait avec la protéine Ski Interacting Protein (SKIP). SKIP est un régulateur transcriptionnel qui lie des protéines de liaisons à l'ADN qui soit activent soit répriment la transcription. SKIP est impliqué dans la voie de signalisation de Notch1. Notch1 est un récepteur transmembranaire qui médie la communication intercellulaire et qui dirige les décisions concernant le sort de la cellule durant le développement. Lorsque le ligand lie Notch1, cela induit un clivage protéolytique permettant la libération de la partie intracellulaire Notch1-IC, qui entre alors dans le noyau et régule l'expression de nombreux gènes. En absence de Notch1-IC, le C-promoteur binding factor 1 (CBF1) inhibe la transcription en liant SKIP et le complexe corépresseur SMRT qui contient les HDACs. La répression est levée en présence de Notch1-IC qui lie SKIP et CBF1, active la transcription par le recrutement d'histones acétyltransférases (HATs) et de coactivateurs stabilisant le complexe Notch1-IC/CBF1 (Figure 5). *MAGEA1* serait capable de contrecarrer l'activation transcriptionnelle médiée par Notch1-IC. Il semblerait que cette répression requiert une interaction entre l'extrémité C-terminale de MAGEA1 et SKIP. *MAGEA1* interagit également avec HDAC1, réprimant ainsi la transcription (Figure 6). Ceci suggère que MAGEA1 participe au contrôle de l'expression de gènes impliqués dans la croissance des cellules tumorales et au cours de la spermatogenèse (Laduron et al, 2004).

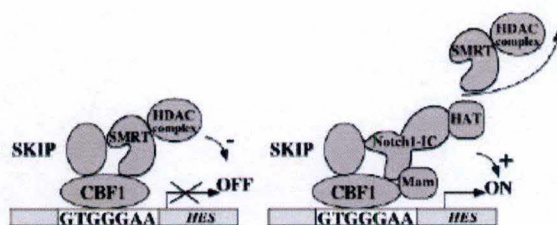


Figure 5 : Modèle d'activation du promoteur HES par NotchI sous le contrôle de CBF1. Le corepresseur SMRT contenant HDAC se lie à SKIP, Notch1-IC interagit avec SKIP et CBF1, déplace le complexe SMRT et active la transcription des gènes HES via le recrute (d'après Laduron et al, 2004).

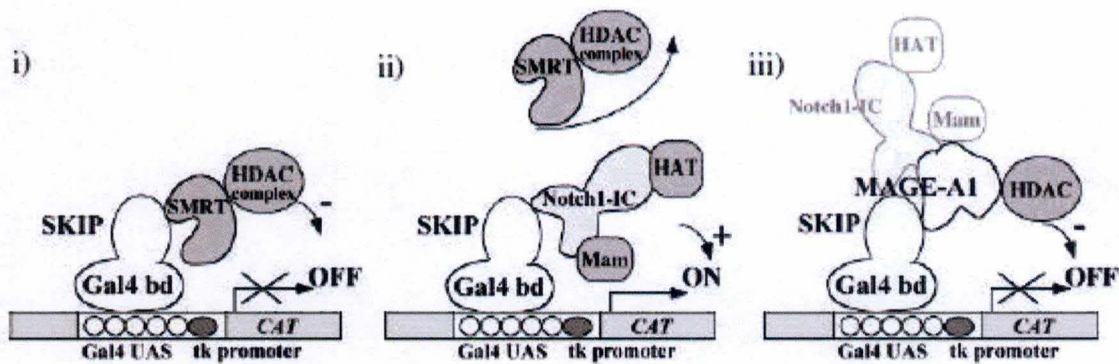


Figure 6: (i-ii) Schéma de l'initiation de la transcription par détachement du complexe HDAC sous l'action de Notch1. (iii) Interaction entre les protéines MAGEA1 et SKIP. MAGEA1 contrecarre la transactivation de Notch1-IC et recrute HDAC (d'après Laduron et al, 2004).

b) KAP1

Un autre partenaire d'interaction de MAGEA1 est la protéine KAP1 (KRAB-associated protein 1) (Yang et al, 2007). KAP1 fait partie de la famille des protéines TRIM. Les membres de cette famille de protéines sont caractérisés par un domaine conservé RING box (Friedman et al, 1996). Ce domaine permet le recrutement de plusieurs protéines et la formation d'un complexe de répression (Schultz et al, 2002). KAP1 est capable de recruter HP1, une protéine de l'hétérochromatine, permettant ainsi la répression de certains gènes. KAP1 lie également p53, diminuant ainsi la quantité de la forme libre de p53 et stimulerait la formation d'un complexe p53-HDAC. KAP1 peut aussi interagir avec MDM2 (Wang et al, 2005). Cette interaction permettrait de supprimer la fonction de p53. Yang et al ont montré que plusieurs protéines MAGE promouvaient la viabilité des lignées cellulaires de mélanomes en inhibant l'apoptose dépendante de p53. En effet, des expériences de double hybride et de coimmunoprécipitation, ont montré que MAGEA2 était capable de lier directement KAP1 et de favoriser la liaison de KAP1 à p53. L'interaction des protéines MAGE et KAP1 favoriseraient donc la suppression de p53. Yang et al ont également montré que l'inhibition de l'expression de gène *MAGE-A*, *-B* et *-C2* augmentait l'apoptose, l'acétylation de p53 et réduisait la viabilité cellulaire (Yang et al, 2007).

c) p53

Marcar et ses collaborateurs (2010) proposent un autre mécanisme d'action par lequel les protéines MAGE diminuent l'apoptose dépendante de p53. En effet, ils ont montré que les protéines MAGEA interagissaient avec le domaine de liaison à l'ADN de p53. Ceci suggère que les protéines MAGEA pourraient inhiber p53 en interférant avec sa capacité à se lier à l'ADN. De plus, la suppression de l'expression de *MAGEA* aboutit à l'augmentation de la transcription de plusieurs gènes dépendants de p53 (Marcar et al, 2010).

d) TRIMs

Récemment, l'équipe de Potts (2010) a analysé plusieurs protéines MAGE et a montré que toutes ces protéines interagissent avec des protéines RING qui sont des E3 Ubiquitine ligases dont TRIM27 et TRIM28. Les protéines TRIM constituent une grande famille de protéines encore peu caractérisées et impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que la prolifération cellulaire, le développement, l'apoptose et l'immunité innée. Les protéines MAGE interagissent avec les RING Ubiquitine ligases via leur MHD. Cependant, la région des protéines E3 impliquée dans cette liaison n'est pas conservée. La liaison des protéines MAGE aux RING E3 Ubiquitine ligases aurait pour conséquence de favoriser l'activité de ces enzymes par un mécanisme inconnu. Un premier mécanisme possible pourrait être que l'interaction avec les protéines MAGE induise un changement de conformation. Ce changement de conformation résulterait en une augmentation d'activité. Un second mécanisme possible serait que les protéines MAGE faciliteraient la liaison du substrat au complexe Ubiquitine ligase E2-E3. Une troisième hypothèse serait que la liaison des protéines MAGE aiderait au recrutement et à la stabilisation des enzymes Ubiquitine E2 au complexe E3. Les protéines MAGE-A2,-A3,-A6,-C2 et TRIM28 pourraient favoriser la tumorigenèse par ubiquitylation et dégradation de p53.

e) Gankyrin

Contrairement au rôle pro-oncogénique des protéines MAGEA, Nagao et ses collaborateurs (2003) ont montré, par crible double hybride, que la protéine MAGEA4 était capable d'interagir avec la Gankyrin. La Gankyrin est une oncoprotéine surexprimée dans les carcinomes hépatocellulaires. Les auteurs ont montré que l'interaction de la partie C-terminale de MAGEA4 (MAGEA4 Δ N1) avec la Gankyrin supprimait l'effet oncogénique de cette protéine et que cette interaction était spécifique de MAGEA4 (Figure 7). En effet, les autres membres de la famille des protéines MAGE, qui sont structurellement similaires (MAGE-A1,-A2,-A12), ne liaient pas la Gankyrin (Nagao et al, 2003 ; Sakurai et al, 2004).

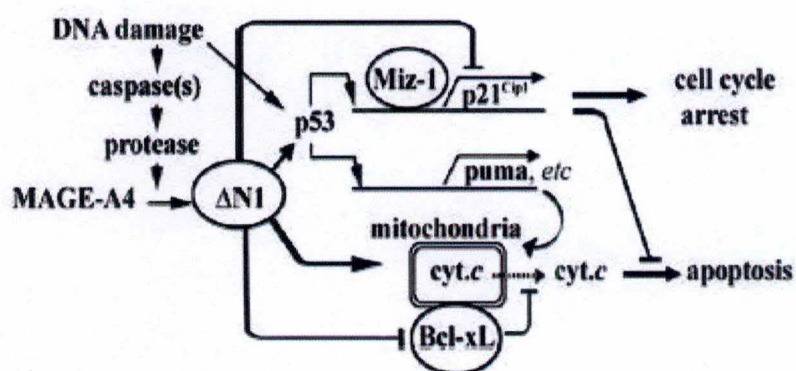


Figure 7 : Schéma du mécanisme d'apoptose induit par MAGEA4 Δ N1. MAGEA4 est clivée par l'activité protéase dépendante des caspases, particulièrement lors d'exposition à des stress génotoxiques, générant MAGEA4 Δ N1. MAGEA4 Δ N1 inhibe la transcription de p21 par liaison à Miz-1 et augmente le taux de protéine p53 conduisant à l'induction de gènes pro-apoptotiques. De plus MAGEA4 Δ N1 diminue le taux de Bcl-xL. Tout ces effets contribuent à la mort cellulaire (d'après Sakurai et al, 2004).

f) HIF

Durant la croissance d'une tumeur, une expansion retardée des vaisseaux sanguins aboutit à un apport en oxygène limité pour la tumeur. Les tumeurs s'adaptent à cette situation en stabilisant les facteurs HIF1 (Hypoxia-inductible factor), qui activent, la transcription de facteurs angiogéniques ainsi que des enzymes impliquées dans la glycolyse anaérobie. Le facteur HIF est un complexe hétérodimère composé de la sous-unité HIF-alpha (HIF- α), qui est régulé, et de la sous-unité HIF-beta (HIF- β) qui est constitutivement exprimée. La sous-unité HIF- α est, en condition de normoxie, dégradée par le protéasome. En condition d'hypoxie, HIF- α est stabilisé, migre dans le noyau où il hétérodimérise avec HIF- β , permettant ainsi d'activer la transcription de leurs gènes cibles (Epstein et al, 2001). L'augmentation de la sous-unité HIF- α , en condition hypoxique, est dépendante de l'activité de trois HIF prolyl-4-hydroxylases nommées PHD1, 2, 3 (Figure 8). Il a récemment été montré que MAGEA11 était capable d'interagir avec PHD (Aprelikova et al, 2009). Cette interaction aurait pour conséquence d'inhiber l'activité de ces enzymes avec pour conséquence une induction de HIF.

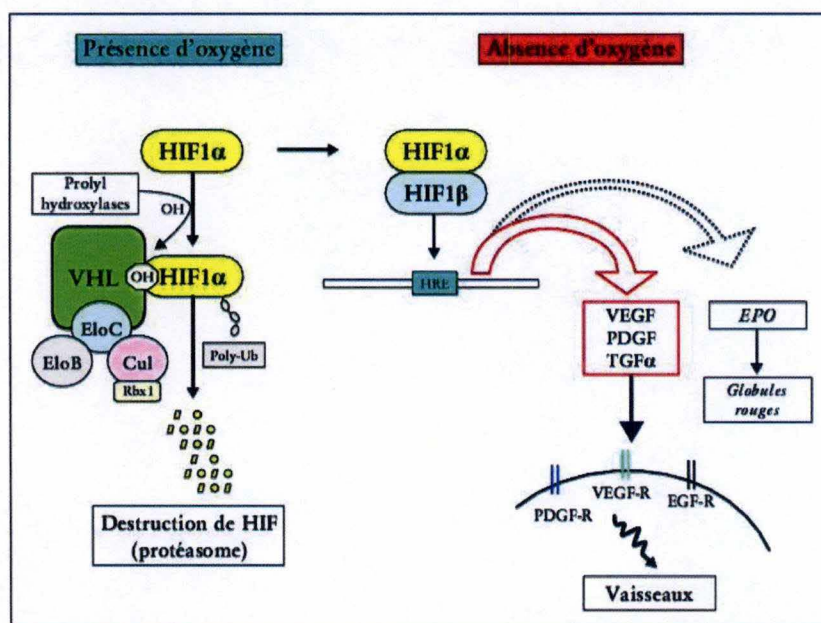


Figure 8: HIF- α en normoxie et hypoxie. En normoxie, HIF- α est hydroxylée par les prolyl-4-hydroxylases puis est dégradée par le protéasome. En hypoxie, HIF- α est stabilisée, migre dans le noyau où il hétérodimérise avec HIF- β , permettant ainsi d'activer la transcription de leurs gènes cibles (d'après Richard et al, 2007).

3. La résistance aux drogues chimiothérapeutiques

Il est bien connu que les gènes *MAGEA* sont normalement exprimés dans les cellules germinales chez l'homme et dans de nombreux cancers de différents types histologiques, cependant leur rôle reste obscur. De récentes études ont montré que l'expression des gènes *MAGEA* était corrélée avec un phénomène de chimiorésistance (Monte et al, 2006).

Il existe actuellement plusieurs traitements contre le cancer, tels que la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, l'immunothérapie et la chimiothérapie. Ces traitements peuvent être utilisés individuellement mais sont, dans la majorité des cas, utilisés en combinaison. Parmi ces traitements la chimiothérapie occupe un rôle central. Ce type de traitement a été introduit il y a plus de cinquante ans et a donné d'excellents résultats dans les cas de cancers testiculaires et certains types de leucémies (Johnstone et al, 2002). La chimiothérapie consiste à utiliser des médicaments agissant au niveau du métabolisme ou de la survie de la cellule. C'est l'action cytotoxique des drogues sur les cellules tumorales qui permet d'inhiber la croissance de celles-ci, de les détruire et d'empêcher la formation de métastases en induisant le moins de « dommages collatéraux » possibles aux cellules saines (Johnstone et al, 2002 ; Solyanik, 2010). Les drogues anticancéreuses visent différentes cibles cellulaires. On peut regrouper les agents anticancéreux en fonction de leur mécanisme d'action : (1) les agents intercalant qui agissent en inhibant la topoisomérase II, pouvant produire des radicaux libres et pouvant également inhiber la synthèse de l'ARN ribosomal (Doxorubicine, Etoposide), (2) les agents agissant au niveau du métabolisme (5-Fluorouracile) et (3) les agents anti-mitotiques (Vincristine, Taxol).

La résistance aux drogues et la toxicité de celles-ci sont les principaux facteurs limitant l'efficacité du traitement. Il existe deux types de résistance. (1) En effet, on peut observer une résistance naturelle de la tumeur à la chimiothérapie car les cellules ne sont que peu (ou pas) sensibles aux effets toxiques des drogues ou que la sélectivité des drogues est insuffisante par rapport aux tissus sains. (2) Une résistance acquise : la tumeur est, dans un premier temps, sensible aux agents chimiothérapeutiques mais devient, au cours du temps résistante aux effets de ceux-ci (Theyer et al, 1993 ; Westman et al, 2001).

Nous pouvons définir la chimiorésistance comme étant la capacité des cellules cancéreuses à résister à l'action d'agents cytotoxiques administrés à des doses maximales tolérées par les cellules saines.

Le phénomène de multirésistance aux drogues est un problème fréquemment observé. Plusieurs mécanismes de résistance ont été décrits (Komarova et al, 2005). Un premier mécanisme est la prévention de l'entrée des drogues dans les cellules par la surexpression de protéines de transport permettant ainsi d'empêcher l'accumulation de ces agents au sein de la cellule. Les transporteurs ABC sont à l'origine de ce phénomène d'efflux de drogues. Ces pompes à efflux, les glycoprotéines-P, sont le produit du gène *MDR1* chez l'homme et du produit de deux autres gènes apparentés : *mdr1a* et *mdr1b* chez la souris. Les protéines MDR1 sont des protéines appartenant à la famille des transporteurs transmembranaires dépendants de l'ATP, facilitant l'efflux de drogues telles que la Doxorubicine, la Vincristine, le Taxol et l'Etoposide. D'autres transporteurs ABC, tels que MRP1 et SPGP qui, tout comme MDR1, transportent les drogues, ont été découverts et jouent également un rôle dans ce phénomène de résistance (Gottesman, 2002 ; Solyanik, 2010).

Un autre mécanisme permettant aux tumeurs d'échapper à l'action des agents cytotoxiques est une activation des processus de réparation des dégâts liés à l'ADN au sein des cellules. En effet, nous pouvons classer les cellules tumorales en deux catégories, suivant le niveau relatif de la protéine O-alkylguanine-DNA-alkyltransferase (AGAT). Les cellules arborant un niveau d'activité faible (ou nulle) de la protéine AGAT sont plus sensibles aux agents alkylants comparées aux cellules ayant une haute activité AGAT. Cela a été confirmé en montrant une sensibilisation des cellules résistantes par l'utilisation d'inhibiteur d'AGAT (Dolan et al, 1998).

Un rôle éloquent dans la formation de la résistance aux drogues est joué par des mécanismes pharmacodynamiques associé à l'altération ou la modification des cibles d'action des drogues anticancéreuses. Des thérapies ciblées ont été conçues pour inhiber spécifiquement une cible dans les cellules cancéreuses. Les drogues utilisées affectent le plus souvent des voies de signalisation qui favorisent une croissance anormale des tumeurs. Des protéines kinases furent les cibles privilégiées des thérapies ciblées. Mais un phénomène de résistance est également apparu, notamment due, à la mutation des domaines kinases. Des voies alternatives favorisant la survie et la progression des cellules cancéreuses sont aussi développées par les cellules afin d'échapper à l'apoptose induite par les drogues anticancéreuses (Hait, 2009).

3.1. L'apoptose

L'apoptose est la mort cellulaire programmée d'une cellule. Ce phénomène est nécessaire au maintien de l'homéostasie de la plupart des organismes pluricellulaires. L'apoptose peut être induite via deux voies distinctes, la voie intrinsèque et la voie extrinsèque, menant à l'activation des caspases qui médient la mort cellulaire. La voie de signalisation extrinsèque implique l'engagement de récepteurs de mort appartenant à la famille des récepteurs de facteurs de nécrose tumorale (TNF-R). La voie intrinsèque, quant à elle, est déclenchée notamment en réponse aux dommages à l'ADN et est associée à la dépoliarisation des mitochondries (Haupt et al, 2003).

3.1.1 La voie extrinsèque

Le récepteur de surface cellulaire Fas (CD95/Apo1) est un membre de la famille des récepteurs TNF. C'est un élément essentiel de la voie extrinsèque de l'apoptose. Le récepteur Fas est activé par la liaison de son ligand FasL qui est exprimé principalement par les cellules T mais p53 peut également induire l'expression du gène *Fas*. Les récepteurs de mort, tels que Fas ou TNFR1 (dont le ligand est TNF α) possèdent des domaines cytoplasmiques essentiels pour générer le signal de mort cellulaire. Après la liaison de leurs ligands respectifs, les récepteurs de morts forment des complexes homodimériques et recrutent les protéines adaptatrices intracellulaires FADD (Fas-associated death domain). Les protéines FADD possèdent des séquences spécifiques appelées DED (Death effector domains) qui interagissent avec les caspases-8 initiant ainsi la cascade apoptotique (Saikumar et al, 1999 ; Haupt et al, 2003).

3.1.2 La voie intrinsèque

La voie intrinsèque de l'apoptose est contrôlée par les protéines de la famille Bcl-2 qui gouvernent la libération des cytochromes c des mitochondries. Cette famille de protéines comprend à la fois des protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. On peut diviser la famille Bcl-2 en trois classes : (1) les protéines favorisant la survie cellulaire (Bcl-X_L), (2) les protéines pro-apoptotiques (Bax et Bak) qui antagonisent la fonction des protéines Bcl-X_L et (3) les protéines pro-apoptotiques BH3-only (Bid). En réponse à un stress, les protéines Bax homodimèrisent formant des pores au sein de la membrane mitochondriale et libèrent ainsi les cytochromes c. La libération des cytochromes c aboutit à l'activation des caspases-9. Les caspases-9 activées, clivent à leur tour les caspases effectrices 3 et 7 (Haupt et al, 2003).

3.1.3 Les caspases

Les caspases sont des protéines appartenant à la famille des cystéines protéases. Il existe 14 caspases différentes partageant des caractéristiques communes : elles ont toutes un site actif conservé et leurs précurseurs sont des zymogènes connus sous le nom de procaspases. La partie N-terminal du prodomaine des procaspases contient une structure très diverse nécessaire à l'activation des caspases (Launay et al, 2005). Le prodomaine des caspases initiatrices est plus long que celui des caspases effectrices et contient des domaines tels que le domaine CARD (Caspase Recruitment Domain), pour les caspases-2 et -9, et le domaine DED (Death Effector Domain) pour les caspases-8 et -10 (Fan et al, 2005). Les caspases sont capables de s'autoactiver, ainsi que d'activer d'autres caspases, pour produire un hétérodimère formé d'une petite sous-unité et d'une grande sous-unité, et deux hétérodimères forment un hétérotétramère enzymatiquement actif.

On peut classer les caspases en trois sous-familles : les caspases initiatrices, les caspases exécutrices et les caspases modulateurs inflammatoires. Les caspases initiatrices -2, -8, -9 et -10 activent les caspases exécutrices -3, -6 et -7. Les caspases-8 et -10 sont responsables de l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose tandis que la caspase-9 active la voie intrinsèque. La caspase-2 est la caspase la plus récemment identifiée. Une de ses caractéristiques est qu'elle possède un rôle d'initiateur mais également exécuteur dans l'apoptose en réponse à un stress induit par des pathogènes, des virus ou par des dégâts à l'ADN (Fan et al, 2005).

Les caspases peuvent être activées par deux voies, celle impliquant l'engagement de récepteurs de mort (voie extrinsèque) et celle déclenchée en réponse aux dommages à l'ADN, associée à la dépolérisation des mitochondries (voie intrinsèque). Dans la voie extrinsèque, les protéines FADD possédant des séquences spécifiques appelées DED (Death effector domains) interagissent avec les procaspases-8. Cette interaction induit l'oligomérisation des procaspases-8 menant à la formation d'un complexe appelé DISC (death-inducing signal complex). Dans certains types cellulaires, le complexe DISC active directement la cascade des caspases. Dans d'autres types cellulaires, ce complexe active la voie intrinsèque par le clivage des protéines pro-apoptotiques BH3-only (Bid). Les mitochondries jouent également un rôle dans l'induction de l'apoptose. En effet, la libération du cytochrome c induit l'activation en cascades des caspases aboutissant au clivage de protéines intracellulaire, de structure et de régulation ainsi qu'à la fragmentation du noyau (Launay et al, 2005).

3.2. Les modulateurs de l'apoptose

3.2.1 p53

Le gène *TP53* est muté dans plus de 50% des cas de cancers humains. Ce gène code pour une phosphoprotéine nucléaire capable de fixer l'ADN. Elle est capable d'induire la transcription spécifique de gènes mais également de jouer un rôle de répression transcriptionnelle. Cette protéine participe au contrôle du cycle cellulaire, à la réparation de l'ADN, à la stabilité génomique et à la sénescence. p53 est un élément essentiel dans la réponse aux stress cellulaires tels que les oncoprotéines, les dommages à l'ADN, l'hypoxie, la perte des facteurs de survie (Johnstone et al, 2002). Lors de dommages à l'ADN p53 peut être phosphorylée induisant sa stabilisation. Un autre mécanisme différent que celui impliquant les dommages à l'ADN permet de stabiliser p53. Ce mécanisme fait intervenir la protéine p19ARF qui, en se fixant sur MDM2, a pour conséquence d'activer p53 (May et al, 1999).

p53 peut initier la voie intrinsèque de l'apoptose en induisant la transcription des membres de la famille pro-apoptotiques Bcl-2 (Bak, Bax, PUMA, Noxa) et en réprimant la transcription des gènes anti-apoptotiques (Bcl-2, IAP). p53 peut également transactiver d'autres gènes contribuant à l'apoptose et menant à l'augmentation des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS). p53 est donc un régulateur essentiel de l'apoptose, capable de coordonner des processus à des niveaux multiples via de nombreux mécanismes. La protéine p53 peut, en plus d'induire la voie intrinsèque, réguler la voie extrinsèque de l'apoptose. En effet, p53 peut induire l'expression du gène *Fas* et est capable de transactiver la protéine BID. Ceci permet un meilleur cross-talk entre les deux voies de l'apoptose (Haupt et al, 2003).

En plus du fait que p53 induise l'apoptose en activant la transcription de certains gènes pro-apoptotiques et en réprimant la transcription de gènes anti-apoptotiques, p53 peut également agir directement au niveau de la mitochondrie. En effet, p53 peut transloquer vers la mitochondrie et induire la perméabilisation de la membrane externe de celle-ci en formant des complexes avec les protéines BclXL et Bcl-2. p53 lie BclXL et Bcl-2 au niveau de son domaine de liaison à l'ADN. La formation de tels complexes a pour conséquence de libérer le cytochrome c de la mitochondrie (Mihara et al, 2003).

3.2.2 IAPs

Les protéines IAPs furent découvertes dans des cellules d'insectes infectées par un baculovirus. Les IAP sont caractérisées par leur domaine BIR, situé en N-terminal, et un domaine RING en C-terminal. Ces protéines ont une fonction anti-apoptotique en inhibant l'activation des caspases. Il se pourrait que le domaine RING des IAPs facilite la dégradation des caspases (Fan et al, 2005 ; Fulda, 2009).

3.2.3 Les protéines de la famille Bcl-2

Les protéines appartenant à la famille Bcl-2 sont un groupe de facteurs de régulation cruciaux dans l'apoptose. On peut classer ces protéines en deux groupes distincts : les protéines anti-apoptotiques et les protéines pro-apoptotiques. Le premier groupe comprend les A1/Bfl1, Bcl-2, Bcl-w, Bcl-Lx, Boo/Diva, Mcl-1, NR-13 et Nrf-3. Ces protéines ont quatre courts domaines d'homologie (BH1, BH2, BH3 et BH4) et exercent leur fonction anti-apoptotique en inhibant les protéines pro-apoptotiques des membres du deuxième groupe par liaison à ceux-ci. Les membres du second groupe sont des protéines pro-apoptotiques incluant les Bax, Bak, Bad, Bcl-rambo, Bcl-xS, Bid, Bik, Bim, Blk, BNIP3, Bok/Mtd, Hrk et Nip3.

Les protéines Bax et Bak sont localisées dans le cytoplasme mais peuvent se transloquer vers la membrane externe des mitochondries. Après cette translocation, les protéines Bax homodimérisent formant des pores au sein de la membrane mitochondriale et libèrent le cytochrome c. Les protéines du groupe I peuvent se lier de manière sélective à la forme active de Bax empêchant ainsi la formation de pores au sein de la membrane mitochondriale et préservant la perméabilité de celle-ci.

4. Rôle de MAGEA dans la chimiorésistance

De récentes études ont montré que l'expression des gènes *MAGEA* était corrélée avec la chimiorésistance (Monte et al, 2006). En effet, la surexpression de *MAGEA* induit une résistance au Paclitaxel et pourrait prédire la réponse des cancers gastriques avancés aux taxols (docetaxel et paclitaxel). De même, l'expression de *MAGEA2* ou *MAGEA6*, dans des lignées cellulaires issues de cancers ovariens, induit une résistance au Paclitaxel (Suzuki et al, 2007). Des expériences de knockdown des gènes *MAGE* par siRNA ont montré la perte de résistance. La surexpression de *MAGEA3* dans des cellules de myoblastes, chez la souris, contribue à la résistance à l'apoptose. *MAGEA3* peut se lier à la pro-caspase-12 murine bloquant ainsi l'activation de la caspase-9 et de la caspase-3. Ces études tendent à montrer que les gènes *MAGE* jouent un rôle dans le phénomène de chimiorésistance aux agents chimiothérapeutiques.

5. Objectifs du mémoire

Ce mémoire vise à déterminer la fonction de *MAGEA1*. Nous sommes partis de l'hypothèse que *MAGEA1* pourrait être un oncogène. Afin de tester cette hypothèse, le gène *MAGEA1* a été transfecté dans différents types de cellules tumorales et saines. Nous étudierons le rôle de *MAGEA1* sur la prolifération cellulaire en évaluant la formation de foci. Afin d'induire une expression ectopique de ce gène dans nos cellules transfectées, des vecteurs lentiviraux vont être générés. Ces vecteurs permettront non seulement d'étudier le rôle de *MAGEA1* *in vitro* mais également son rôle *in vivo* chez des souris. Une lignée de souris exprimant *MAGEA1* de manière conditionnelle sera développée. Ces souris, après croisement avec des souris transgéniques exprimant Cre, exprimeront *MAGEA1* dans des tissus spécifiques et ceux-ci seront étudiés pour la formation de tumeurs. La capacité des cellules à résister à certains agents chimiothérapeutiques sera également évaluée sur des cellules tumorales sauvages et exprimant *MAGEA1* mais aussi sur des cellules non-tumorales exprimant *MAGEA1*.

Matériels et méthodes

1. Culture cellulaire

1.1. Les cellules MCF-7

La lignée cellulaire MCF-7 est une lignée de cellules épithéliales humaines provenant d'un épanchement pleural d'une patiente, âgée de 69 ans, atteinte d'un cancer métastatique du sein. Cette lignée cellulaire fut établie à l'Institut de Détroit, en 1973, par l'équipe du professeur Herbert Soule.

Les cellules, sont cultivés dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium 1x (DMEM) contenant 4,5 g/L de D-Glucose et de la L-glutamine. A 500 ml de ce milieu de base, sont ajoutés: 10% de Foetal Bovine Serum (FBS), 1% de Sodium Pyruvate, 1% d'acides aminés non-essentiels (NeAA) et 1% de Penicillin/Streptomycin.

Tableau 1: Produits utilisés pour la culture des cellules MCF-7

Produit	Firme	Référence
DMEM 1X	LONZA	BE12-604F
Foetal Bovine Serum (FBS)	LONZA	DE14-801F
Penicillin/Streptomycin	LONZA	DE17-602E
Sodium Pyruvate	LONZA	BE13-115E
NeAA 100x	LONZA	BE13-114E
Trypsin-EDTA	LONZA	BE17-161E

1.2. Les cellules MCF-10A

La lignée cellulaire MCF-10A (n°ATCC CRL-10317) est une lignée de cellules mammaires humaines immortalisées non transformées. Ces cellules adhérentes, de type épithélial, sont issues d'une dystrophie fibrokystique. Cette lignée est cultivée dans du DMEM/F12 (1:1) (1X) supplémenté avec 5% de sérum de cheval non décomplémenté, 100 UI/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine, 20 ng/mL de facteur de croissance épidermique (*EGF*, *Epidermal Growth Factor*), 10 µg/mL d'insuline, 0,5 µg/mL d'hydrocortisone et 100 ng/mL de toxine cholérique. Ces cellules possèdent une morphologie normale de cellules épithéliale mammaire et ne présentent pas de mutation au niveau du gène *p53* et n'induisent pas de tumeur chez des souris nues.

Tableau 2: Produits utilisé pour la culture des cellules MCF10A

Produit	Firme	Référence
DMEM/F-12 (Ham)1X (1 :1)	GIBCO	10565-018
Horse Serum (HS)	GIBCO	26050-088
Penicillin/Streptomycin	LONZA	DE17-602 ^E
hEGF	SIGMA ALDRICH	E9644-2MG
Toxine Cholérique (TC)	SIGMA ALDRICH	C8052-1MG
Hydrocortisone (HC)	SIGMA ALDRICH	H0396-100MG
Insuline	SIGMA ALDRICH	I9278-5ML
TVP 10X (100ml PBS ; 200µl EDTA 0.5% ; 1ml Chicken Serum ; 10 ml trypsin 2.5%)		

1.3. Les cellules SAOS-2

La lignée cellulaire de SAOS-2 a été établie à partir d'un ostéosarcome humain prélevé chez une patiente âgée de 11 ans. Les cellules SAOS-2 sont largement utilisées comme modèle d'ostéoblastes humains.

Les cellules SAOS-2 sont cultivées dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium 1x (DMEM/F-12) contenant de la L-glutamine. A ce milieu est ajouté 10% de Fœtal Bovine Serum, et 1% de Penicillin/Streptomycin.

Tableau 3: Produits utilisés pour la culture des cellules SAOS-2

Produit	Firme	Référence
DMEM/F-12 (Ham) 1X (1:1)	GIBCO	10565-018
Fœtal Bovine Serum (FBS)	LONZA	DE14-801F
Penicillin/Streptomycin	LONZA	DE17-602E
Trypsin-EDTA	LONZA	BE17-161E

1.4. Les cellules souches embryonnaires de souris

Les cellules souches embryonnaires (ES) sont des cellules indifférenciées qui sont localisées au niveau de la masse cellulaire interne du blastocyste. Ces cellules ont la capacité de proliférer et même de se différencier en tous types cellulaires. Cette dernière propriété définit leur caractère totipotent.

Les cellules ES sont cultivées dans du milieu Glasgow's MEM Medium 1x (GMEM) contenant de la L-glutamine. A 500 ml de ce milieu de base, sont ajoutés: 10% de Fœtal Bovine Serum pour cellules ES (FBS-ES), 1% de Sodium Pyruvate, 1% d'acides aminés non-essentiels (NeAA), 1% de Penicillin/Streptomycin, 0.1mM de β -mercaptoéthanol et du LIF 10^3 U/ml.

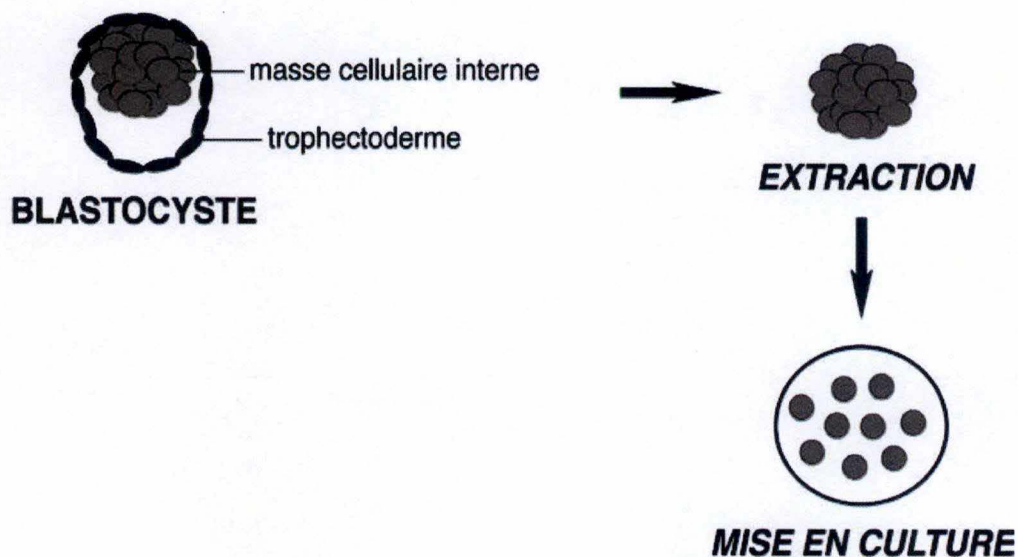


Figure 9: localisation des cellules ES dans la masse cellulaire interne du blastocyste (G. Fuhrmann, Gynécologie Obstétrique & Fertilité 33 (2005) 813-818).

Les cellules ES sont cultivées sur une monocouche de fibroblastes embryonnaires de souris (MEF). Les cellules MEFs sont prélevées après 14 jours de gestation et servent de cellules nourricières aux cellules ES et permettent également de les maintenir dans un état indifférencié.

2. Techniques liées à la manipulation de cellules

2.1. Ensemencement des cellules

Le nombre approximatif de cellules présent dans une suspension peut être déterminé au moyen d'une chambre de Bürker. Une chambre de comptage ou cellule de Bürker consiste en deux plateformes de verres quadrillées de dimensions connues, et d'une lamelle délimitant la profondeur. Le volume de la cellule étant connue, il est donc possible de déterminer la concentration cellulaire de l'échantillon.

Afin de déterminer cette concentration cellulaire, un volume connu de la suspension de cellules est diluée X fois avec du bleu Trypan. Ensuite, les cellules diluées sont déposées dans la cellule de Bürker et observées au microscope optique inversé. En comptant le nombre total de cellules présent dans la chambre et en tenant compte du facteur de dilution X et des dimensions de la cellule de Bürker, la concentration cellulaire par millilitre peut être calculée. Par la suite, un nombre déterminé de cellules peut être ensemencé, dans un volume adéquat de milieu complet.

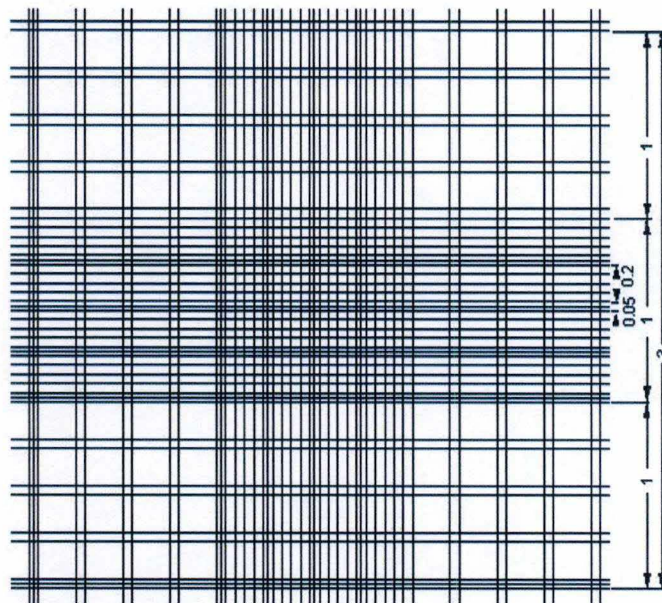


Figure 10: Représentation schématique d'une chambre de Bürker.

2.2. Transfection des cellules au phosphate de calcium ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

Pour des cellules ensemencées en boîte de Pétri (60mm) à une densité de 3×10^5 cellules par boîte

- Mettre un total de $6 \mu\text{g}$ d'ADN en eppendorf
- Ajouter $50 \mu\text{l}$ de CaCl_2 1,25M goutte à goutte

- Ajouter 250 µl de HBS 2x goutte à goutte
- Laisser 20 minutes à RT
- Pipeter légèrement (2X)
- Mettre goutte à goutte en boîte de Pétri
- Incuber à 37°C, 5% CO₂

2.3. Transfection des cellules à l'Exgen500

La technique de la lipofection a été utilisée afin de transférer les cellules: l'ADN et les liposomes (contenus dans l'Exgen500) sont incubés ensemble (en présence de NaCl), ce qui va permettre l'inclusion de l'ADN dans ces derniers. Les cellules sont alors incubées avec le mélange. Les liposomes étant des micelles capables de fusionner avec les membranes cellulaires, l'ADN qu'ils renferment va pouvoir pénétrer dans la cellule.

2.4. Colony formation assay (CFA)

Lors de cette étude, les cellules SAOS-2 ont été semées en plaque 6 puits, à une densité de 2×10^4 cellules par puits. Leur capacité à former des foci sera ensuite évaluée. Les cellules ont été transfectées soit par pCDNAI-MAGEA1 ; soit par pRCCMVp53 ; soit par la combinaison des deux plasmides. Le contrôle de l'efficacité de transfection a été obtenu en transfectant des cellules par un vecteur vide et un vecteur pBABEpuro qui confère aux cellules une résistance à la puromycine. Les cellules seront cultivées dans du milieu complet supplémenté par 2.5µg/ml de puromycine. Après 14 jours de culture à 37°C, 5% CO₂.

2.5. Dosage de l'activité luciférase

L'enzyme Luciférase « *Firefly* » est couramment utilisée pour étudier la fonction et la régulation de gènes. Elle sert de rapporteur chez les cellules et tissus dépourvues d'expression endogène de cette enzyme. La Luciférase catalyse l'oxydation de la luciférine en présence d'ATP en oxyluciférine, cette réaction libérant de la lumière. Cette émission de lumière, par ajout d'un lysat cellulaire, peut être quantifiée au moyen d'un luminomètre. Vingt-quatre heures après transfection et/ou stimulation, les cellules sont lysées dans 150µl de Passive Lysis Buffer (PLB). Ensuite 10µl de lysat sont ajoutés à 50µl de substrat luciférine (LARII). L'activité luciférase est mesurée pendant 10 secondes après un délai d'attente de 2 secondes.

3. Techniques immunologiques

3.1. Western Blotting

Le Western Blotting est une technique de détection de protéines spécifiques grâce à leur séparation sur un gel d'acrylamide selon leur taille et leur reconnaissance par des anticorps spécifiques. Le principe consiste à extraire les protéines des cellules en cultures et de les doser par la méthode du Bradford. Les protéines sont ensuite séparées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE, transférées sur membrane et mises en présence d'anticorps.

Tableau 4: Composition du tampon de lyse

Produits	
HEPES pH 7.9	10mM
KCl	10mM

Matériels et méthodes

EDTA	0.1mM
NP40	0.05%

Tableau 5: Dosage des protéines (Bradford)

Produits	
Pierce [®] BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific (REF : 23225)

Tableau 6: Composition du tampon de charge Laemmli (5X)

Produits	
Tris-base pH6.8	250mM
DTT	500mM
SDS	10%
Bleu de bromophénol	0.5%
Glycérol	50%

Tableau 7: Composition des gels SDS-PAGE

Gel de concentration	
Tris-HCl 1M	1.5ml
Acrylamide	0.6ml
SDS 10%	0.06ml
Ammonium persulfate (APS) 10%	0.06ml
TEMED	0.006ml
H ₂ O mQ	3.8ml

Gel de séparation	
Tris-HCl 1.5M	5ml
Acrylamide	5ml
SDS 10%	0.2ml
APS 10%	0.2ml
TEMED	0.01ml
H ₂ O mQ	9.7ml

Tampon de migration (1X)	
Tris-base	6.056g
Glycine	11.26g
SDS 10%	10ml
H ₂ O mQ	Porter à 1L
Tampon de transfert (1L)	
Tris-base	3.03g
Glycine	14.4g
Méthanol	200ml
H ₂ O mQ	Porter à 1L

Tableau 8: Anticorps utilisés en Western Blotting

Anticorps	Caractéristiques	Références	Dilution
Anti-p53 (clone PAb240)	Anticorps monoclonal de souris dirigés contre la protéine p53	Millipore (CBL 404)	1/1000

Anti-p21 (clone SX118)	Anticorps monoclonaux de souris dirigés contre la protéine p21	BD Pharmingen	1/1000
Anti-Caspase 3	Anticorps polyclonal de lapin dirigés contre la protéine Caspase-3	Cell Signaling (Asp175) (#9961)	1/500
Anti-Mageal (clone 6C1)	Anticorps monoclonal de souris dirigés contre la protéine Mageal	Invitrogen	1/500
Anti-Ku80	Anticorps polyclonal de lapin dirigés contre la protéine Ku80	Serotec (AHP317)	1/400
Anti- β actine (clone AC74)	Anticorps monoclonal de souris dirigés contre la protéine β -actine	Sigma (A5316)	1/5000
Anti-Souris	Anticorps polyclonal de lapin dirigés contre les immunoglobulines de souris conjugués à la peroxydase	Dako (P0447)	1/2000
Anti-Lapin	Anticorps polyclonal de lapin dirigés contre les immunoglobulines de souris conjugués à la peroxydase	Dako (P0448)	1/2000

3.2.Méthodes

3.2.1. Extraction totale de protéines

Les culots cellulaires sont repris dans du tampon de lyse Ripa-Like 1X (Ripa-Like 1X : Tris 50 mM pH 8,0 ; NaCl 150 mM ; EDTA 5 mM ; 1% NP40 ; 0,5% Désoxycholate de sodium) et d'inhibiteurs de protéases (*Proteoblock*, *Protease Inhibitor Cocktail*, Fermentase 100X) et incubés 30 minutes dans la glace. Le tampon de lyse permet de libérer les protéines cytoplasmiques et nucléaires par rupture des membranes cellulaires. Les protéines totales sont ensuite récupérées après centrifugation à 15 700 rcf pendant 15 minutes à 4°C et conservées à -80°C. La quantité de protéines est évaluée par dosage colorimétrique au spectrophotomètre.

3.2.2. Dosage des protéines

La gamme étalon est réalisée avec 0, 0.032, 0.125, 0.25, 0.5 et 1 mg/mL de BSA (Albumine bovine sérique fraction V, Sigma). Deux μ L d'extrait protéique total sont mélangés avec le réactif de PIERCE (Thermo Scientific) dans un volume final d'un mL puis dosés à 562 nm au spectrophotomètre. La concentration en protéines est déterminée en se référant à la droite étalon obtenue.

3.2.3. Western Blotting

Les protéines cellulaires sont dénaturées en présence de tampon de Laemmli 5X (Laemmli 1X : 0,5% SDS ; 10% glycérol ; 6,25 mM Tris pH 6,8 ; 0,003% bleu de bromophénol et 25 mM DTT) à 95°C pendant 5 minutes. Les protéines sont ensuite séparées selon leur poids moléculaire par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. La migration se fait sous un courant constant de 80V, dans un tampon de migration. Les protéines sont ensuite transférées par transfert liquide sur une membrane PVDF (PolyVinylineDiFluoride, BioRad) dans du tampon de transfert sous un courant constant de 100V pendant 1h30. Les sites libres de la membrane sont saturés dans du PBS 1X, 0,05% Tween20, 5% lait demi-écrémé, pendant 30 minutes à température ambiante. Puis, la membrane est incubée over-night à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS 1X, 0,05% Tween20, 1% lait. La membrane est lavée trois fois dans du PBS 1X, Tween20 0,05%, incubée avec l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase, dilué dans du PBS 1X, 0,05% Tween20, 1% lait pendant une heure à température ambiante et lavée six fois avec du PBS 1X, Tween20 0,05%. Les substrats de la peroxydase (*SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate*, Thermo Scientific) sont ensuite utilisés pour révéler la présence de la protéine d'intérêt, suivi d'une autoradiographie.

4. Techniques liées à la manipulation d'ADN

4.1. Culture bactérienne

- Dans un falcon stérile, ajouter 5ml de LB et 5µl d'ampicilline 100mg/ml (Roche)
- Ensemencer ce milieu avec une colonie isolée de bactéries
- Incuber une nuit, sous agitation, à 37°C

4.2. Préparation d'ADN plasmidique

4.2.1. Mini-préparation

L'extraction et la purification d'ADN plasmidiques contenus dans les bactéries furent réalisées au moyen du kit « *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* » de Fermentas. Le protocole de purification a été suivi sans modification. L'ADN ainsi purifié a ensuite été stocké à -20°C.

4.2.2. Maxi-préparation

L'extraction et la purification d'ADN plasmidiques contenus dans les bactéries furent réalisées au moyen du kit « *NucleoBond Plasmid Purification* » de Macherey-Nagel. Le protocole de purification, pour les plasmides high-copy, a été suivi sans modification. L'ADN ainsi purifié a ensuite été stocké à -20°C.

4.3. Electrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose permet de séparer les fragments d'ADN dans un champ électrique en fonction du poids moléculaire. Le pourcentage d'agarose est inversement proportionnel au poids moléculaire des fragments à séparer. Au gel d'agarose est ajouté du Bromure d'Ethidium, un agent intercalant, permettant la visualisation des fragments d'ADN

sous UV. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le marqueur de 1Kb fourni par Invitrogen.

4.4. Restriction sur plasmide

Dans un tube à eppendorf, ajouter :

- Tampon 1X correspondant à l'enzyme
- 1 unité d'enzyme de restriction par μg d'ADN plasmidique à restreindre
- $X\mu\text{l}$ de plasmide
- Incuber 2h à 37°C

4.5. Déphosphorylation d'un plasmide linéarisé

- Ajouter 1 μl de phosphatase alcaline de veau (CIP) au produit de restriction
- Incuber 1h à 37°C
- Ajouter 1 μl d'EDTA 500mM
- Incuber 10 minutes à 75°C
- Ajouter 1 volume de phénol CIAA, vortexer et centrifuger 15 minutes à 14000rpm
- Ajouter 1 volume de chloroforme à la phase aqueuse, vortexer et centrifuger 15 minutes à 14000rpm
- Précipiter à l'EtOH 100%
- Rincer le culot obtenu à l'EtOH 70%
- Sécher le culot et le reprendre dans du TE

4.6. Ligation d'un vecteur

Ajouter le vecteur et l'insert dans un rapport moléculaire (1 :3) à :

- 2 μl de tampon T4 DNA ligase 10X (NEB)
- 1 μl de DNA T4 ligase (NEB)
- Porter à 20 μl avec de l'eau
- Incuber une nuit à 16°C

4.7. Purification de l'ADN sur colonne (*Kit Promega Wizzard SV Gel and PCR Clean-Up System*)

Le *Wizzard SV Gel and PCR Clean-Up System* permet la purification de fragments d'ADN simple ou double brin. Le principe de purification est basé sur la liaison sélective de l'ADN sur une membrane de silice en condition fortement salée. Le protocole de purification, fourni par le kit, a été suivi sans modification.

4.8. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Cette technique permet l'amplification exponentielle d'une séquence d'ADN d'intérêt. Des amorces sont conçues à partir des séquences bordant le fragment à amplifier. La PCR comprend plusieurs étapes, la matrice d'ADN est dénaturée par chauffage en présence d'un excès d'oligonucléotides et de dNTPs. La température est ensuite diminuée pour permettre l'hybridation spécifique des amorces. Finalement, la Taq polymérase « GoTaq » (Promega)

thermorésistante, amplifie la séquence située entre les amorces. Ce cycle de dénaturation-élongation est répété 30 fois.

Programme :

- Dénaturation de 5 minutes à 94°C
- Trente cycles d'amplification divisés en trois étapes :
 - 30 secondes à 94°C
 - 30 secondes à X°C (hybridation) où X= Tm-5°C
 - Y minute(s) à 72°C pour l'élongation où Y= taille du fragment à amplifier (Kb)
- Elongation finale de 10 minutes à 72°C

Tableau 9: Amorces utilisés pour les PCR et séquençages.

Amorces	Séquences (5'→3')
5MAGEA1_AgeI (sens)	CTT-ACC-GGT-GCC-CTG-ACG-AGA-GTC-ATC
3MAGEA1_AgeI (antisens)	CTT-ACC-GGT-GAA-TGG-GCC-TCA-TGT-CAC-ACG-A
pCR8F	GTT-GTA-AAA-CGA-CGG-CCA-GTC-T
pTM837S (sens)	ACC-TCT-CAC-TAG-TAC- CCT-CG
pTM1113AS (antisens)	AGA-GGA-ACT-GCT-TCC-TTC-AC

5. Techniques liées à la manipulation d'ARN

5.1.Extraction d'ARN total

Les ARN totaux sont extraits grâce au *High Pure RNA Isolation Kit* de Roche. Le protocole d'extraction, fourni par le kit, a été suivi sans modification. Les cellules adhérentes sont resuspendues dans du PBS et lysées par ajout du Lysis/-Binding Buffer (4.5M guanidine-HCl, 50mM tris-HCl, 30% Triton X-100 (w/v), pH 6.6). Le lysat est ensuite déposé sur une colonne permettant la purification de l'ARN. Après une première centrifugation sur colonne de la DNase est ajouté afin de dégrader l'ADN génomique (10 KU de DNaseI, 1M NaCl, 20mM Tris-HCl, 10mM MnC₂, pH 7.0). La colonne est lavée au moyen de deux tampons de lavage (Wash buffer I : 5M guanidine hydrochloride, 20mM Tris-HCl, pH 6.6, 20ml éthanol ; Wash buffer II : 20mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH 7.5, 40ml éthanol). Les ARN sont finalement élués dans un faible volume de tampon d'éluion (eau doublement distillée, Nuclease-free).

5.2.Rétro-transcription après extraction de l'ARN

La rétro-transcription est effectuée sur une quantité fixe d'ARN : 1 µg d'ARN totaux dans un volume final de 10µL est incubé avec 0,2 ng d'amorces aléatoires (Amersham) et 0,5 mM de dNTP pendant 5 minutes à 65°C. Puis, dans du tampon 1X, 10 mM de DTT, et 40 U de *RNAseOUT* sont ajoutés et les tubes sont incubés pendant 2 minutes à 25°C. 200 U de *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen) sont ajoutées à chacun des tubes qui sont ensuite placés à 25°C pendant 10 minutes. La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) est effectuée pendant 50 minutes à 42°C ; l'enzyme est ensuite inactivée par chauffage à 70°C pendant 15 minutes.

5.3. Amplification par PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Dans un volume final de 5 μL , sont mélangés 1,2 μL de Master Mix contenant du SYBR-GREEN (Roche) et 3,4 μM de chacune des amorces sens et anti-sens spécifiques du gène d'intérêt à amplifier. A ces 5 μL sont ajoutés 1,67 μL d'ADNc dilués au $1/20^{\text{ème}}$ pour les lignées ou au quart pour les cellules primaires. L'amplification par PCR est réalisée par le Light Cycler® (Roche). La quantité de produit d'amplification est déterminée grâce au SYBR-GREEN, une molécule fluorescente capable de s'intercaler dans l'ADN double brin au moment de la phase d'élongation.

Résultats

1. Construction de vecteurs lentiviraux d'expression de *MAGEA1*

Nous avons entrepris la construction de vecteurs lentiviraux afin d'établir des lignées cellulaires stables exprimant de manière constitutive *MAGEA1*. Ces lignées nous permettront d'étudier l'effet de *MAGEA1* sur la prolifération cellulaire. Ces vecteurs permettront non seulement d'étudier le rôle de *MAGEA1* *in vitro* mais également son rôle *in vivo* dans les tissus de souris.

Les vecteurs viraux sont des particules virales véhiculant un génome artificiellement modifié en regard de celui de la souche virale dont le vecteur est dérivé. La stratégie est d'amplifier la partie codante *MAGEA1* déjà présent dans une construction afin de le cloner dans le plasmide pCR8. Cette construction intermédiaire (pCR8-*MAGEA1*) sera utile pour une autre construction visant à produire une lignée de souris exprimant de manière conditionnelle *MAGEA1*. *MAGEA1* sera excisé du pCR8-*MAGEA1* et ligué dans le vecteur lentiviral pTM898 (FIGURE 10). pTM898 est un vecteur lentivirus permettant d'exprimer de manière modérée (promoteur PGK) notre gène d'intérêt.

1.1. Amplification de la partie codante de *MAGEA1*

Des amorces, possédant des sites de restriction AgeI, ont été synthétisées afin d'amplifier par PCR la partie codante *MAGEA1* présent dans un plasmide disponible au laboratoire (FIGURE 11).

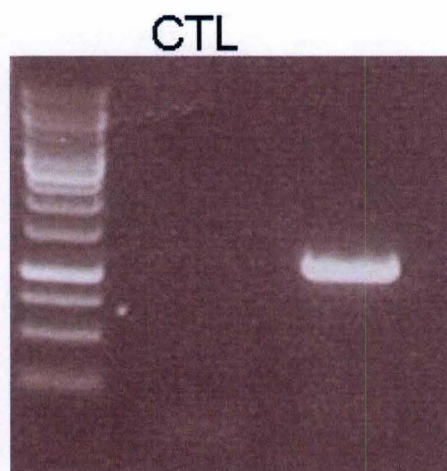
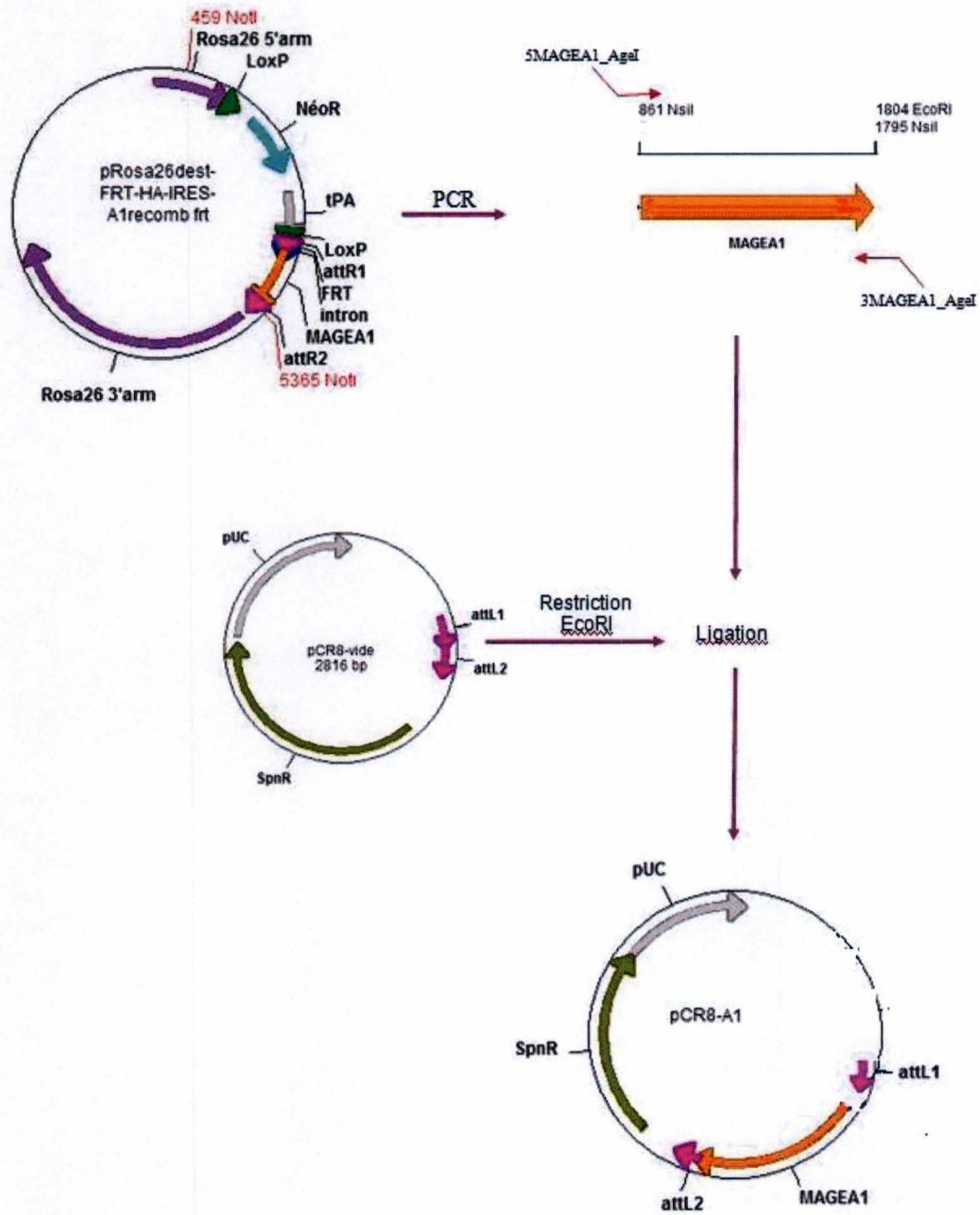


Figure 11: Image prise sous UV après migration en gel agarose 1% du produit PCR obtenu après amplification de la partie codante *MAGEA1* présent dans pROSA26dest-FRT-HA-IRES-A1 au moyen des amorces 5*MAGEA1*_AgeI et 3*MAGEA1*_AgeI.



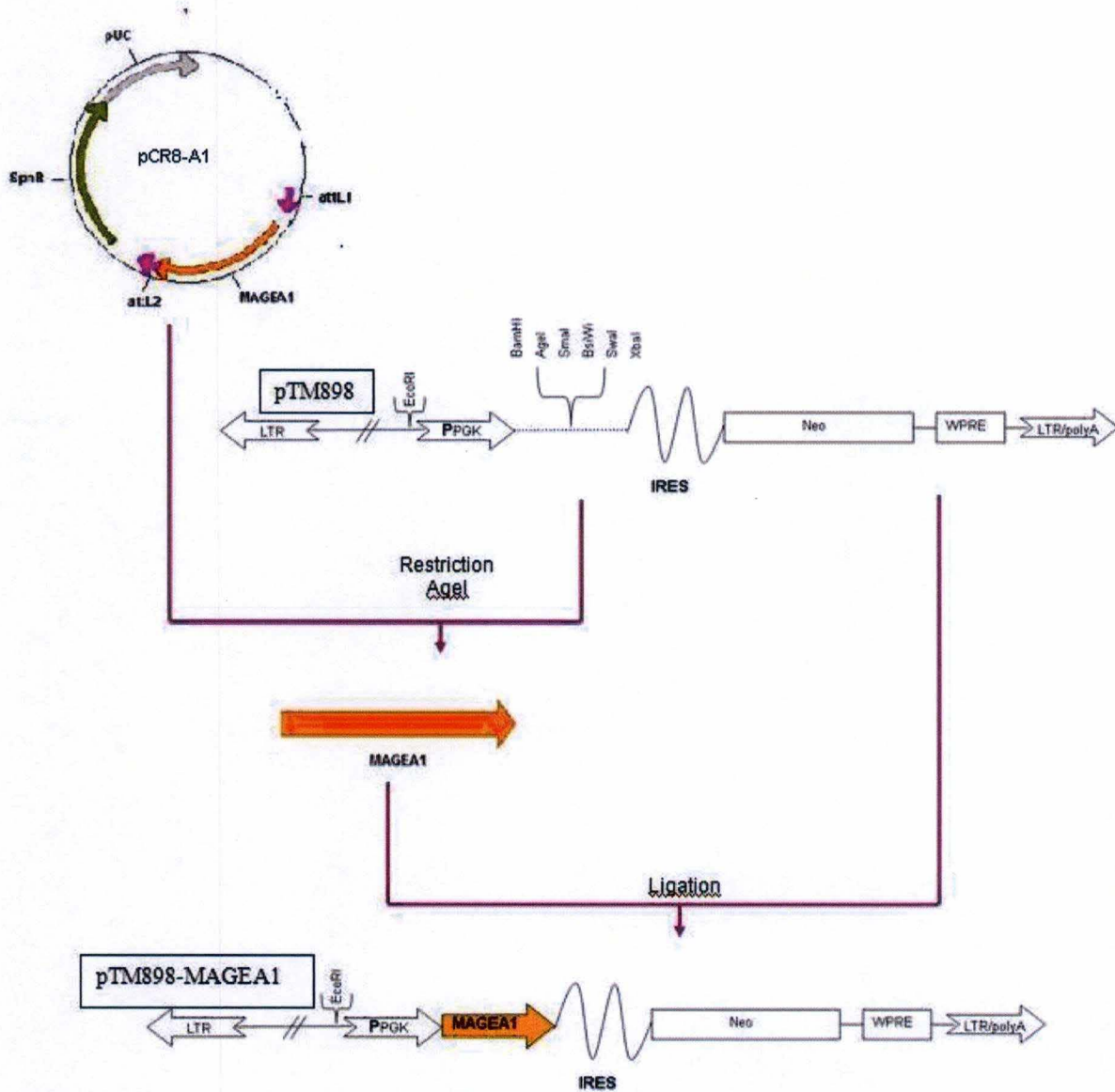


Figure 20: Stratégie utilisée pour la construction du vecteur viral. Une PCR a été réalisée avec les amorces 5MAGEA1_AgeI et 3MAGEA1_AgeI afin d'amplifier le gène *MAGEA1* présent dans un vecteur. Ensuite, le produit PCR de *MAGEA1* et le plasmide pCR8 ont été digérés par AgeI et ligués. Le mélange de ligation a servi à électroporer des bactéries électrocompétentes qui ont été sélectionnées sur milieu solide LB Spectinomycine. Pour finir, la partie codante de *MAGEA1* a été excisée de pCR8 par digestion enzymatique AgeI et liguée dans le vecteur pTM898 préalablement digéré par AgeI également. Un séquençage du plasmide pCR8-A1 et du plasmide pTM898-A1 a été réalisé afin de s'assurer que le cadre de lecture était respecté et qu'aucune mutation ne s'était produite.

1.2. Insertion de *MAGEA1* dans le plasmide pCR8

Le produit d'amplification de *MAGEA1* et le plasmide pCR8 ont tous deux été digérés par l'enzyme *AgeI*, puis purifiés et ligués. Le mélange de ligation a servi à électroporer des bactéries électrocompétentes qui ont ensuite été sélectionnées sur milieu solide LB Spectinomycine. Dix colonies résistantes à la Spectinomycine ont été criblées par PCR afin de détecter la présence de l'insert (FIGURE 12). Pour effectuer cette PCR, nous avons utilisé une amorce sens s'appariant dans le plasmide pCR8 (pCR8F), ainsi qu'une amorce antisens, 3*MAGEA1*_AgeI, s'appariant dans l'insert.



Figure 12: Image prise sous UV après migration en gel agarose 1% des produits PCR réalisés sur colonies ayant intégré le plasmide pCR8-*AI*. Les bandes représentent notre gène d'intérêt ayant été intégré dans le vecteur pCR8. Les colonies 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9 et 10 contiennent le plasmide recombinant.

1.3. Sous-clonage de la partie codante de *MAGEA1* dans le vecteur pTM898

Nous avons séparé *MAGEA1* du vecteur pCR8 par restriction enzymatique *AgeI* (Figures 13 et 14). Ensuite, le fragment d'intérêt a été ligué avec du pTM898 préalablement digéré par *AgeI* et déphosphorylé (Figure 14). Le nouveau plasmide pTM898-*AI* a été introduit dans des bactéries électrocompétentes (sélection sur milieu solide LB Ampicilline). Une PCR sur différentes colonies a été réalisée afin de détecter les clones recombinants. Au final, 3 colonies se sont révélées positives (Figure 15).

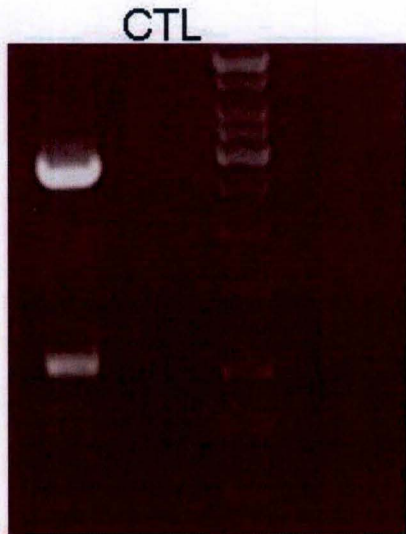


Figure 13: Image prise sous UV après migration en gel agarose 1% de pCR8-*MAGEA1* digéré par *AgeI*. Cette restriction permet de ressortir notre insert *MAGEA1* d'intérêt à la bande attendue.

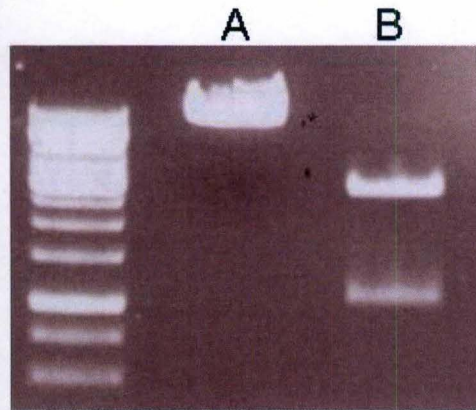


Figure 14: Image prise sous UV après migration en gel agarose 1% de pTM898 (A) et pCR8-*MAGEA1* (B) digérés par *AgeI*. Nous observons la linéarisation du vecteur pTM898 (A) ainsi que notre insert d'intérêt (B) à la taille attendue (~1000bp).

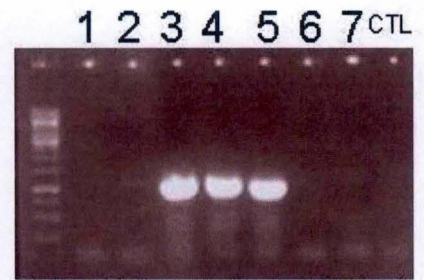


Figure 15: Image prise sous UV après migration en gel agarose 1% des produits PCR obtenus en utilisant les amorces 5*MAGEA1*_AgeI et 3*MAGEA1*_AgeI. Les bandes à 1000bp pour les clones 3-4-5 indiquent la présence de notre gène d'intérêt dans le vecteur pTM898.

1.4.Séquençage du vecteur final pTM898-*A1*

Un séquençage à l'aide des amorces pTM837S (sens) et pTM1113AS (antisens) a permis de confirmer qu'il n'y avait pas de mutations dans l'insert et que celui-ci était correctement orienté.

2. Validation des cellules transduites par le lentivirus gouvernant l'expression de *MAGEA1* par Western Blot

Les cellules MCF-7 et MCF-10A ont été transduites par le lentivirus *MAGEA1* dans le laboratoire du professeur De Plaen, à l'institut de Duve. Une sélection pendant trois semaines a été réalisée afin d'obtenir des populations de cellules MCF-7 et MCF-10A transduites de manière stable par le lentivirus contenant *MAGEA1* et par le vecteur lentiviral vide.

Avant de procéder aux expérimentations sur les différentes lignées cellulaires, nous avons vérifié l'expression de *MAGEA1* sur les cellules transduites par les vecteurs lentiviraux.



Figure 16: Analyse en Western Blot d'extraits protéiques révélés par l'anticorps anti-MAGEA1. (A et C) Révélation par l'anticorps 6C1 anti-MAGEA1 de lysats cellulaires provenant des cellules MCF-7 et MCF-10A transduites par le lentivirus vide. (B et D) Révélation par l'anticorps anti-MAGEA1 des extraits protéiques provenant des cellules MCF-7 et MCF-10A exprimant *MAGEA1*.

Une analyse par Western Blot confirme l'expression de *MAGEA1* dans les cellules MCF-7 et MCF-10A transduites par pTM898-*A1*, comparées à celles transduites par le lentivirus vide (contrôle négatif) (Figure 16).

3. Effets de *MAGEA1* sur l'apoptose et la prolifération cellulaire

La fonction des protéines MAGE de type I reste peu connue jusqu'à présent. Les travaux réalisés sur les *MAGE* de type A suggèrent un rôle de ces protéines dans la survie cellulaire et l'apoptose dépendante de p53.

Des expériences antérieures réalisées dans notre laboratoire ont mis en évidence une diminution de l'expression de p53 et de la caspase-3 dans des cellules souches embryonnaires de souris (ES) exprimant *MAGEA1*. Pour étudier l'effet de *MAGEA1* sur l'apoptose et la prolifération cellulaire, nous avons comparé l'expression de p53 et de p21 dans les MCF-7 et les MCF-10A exprimant ou n'exprimant pas *MAGEA1*. Nous avons aussi réalisé des tests de formation de colonies par des cellules SAOS-2 transfectées par p53 avec ou sans *MAGEA1*.

3.1. Effet de *MAGEA1* sur l'induction de p53, de p21 et sur l'activation de la caspase-3 dans les cellules embryonnaires de souris traitées à l'Etoposide

Nous avons voulu confirmer les résultats préliminaires qui ont mis en évidence une diminution de l'expression de p53 et de la caspase-3 dans les cellules souches embryonnaires de souris (ES) exprimant *MAGEA1*. Nous avons donc analysé l'expression de p53, de p21 et de la forme active de la caspase-3 en présence de *MAGEA1* (FIGURE 17). Pour cela, des cellules ES exprimant ou pas *MAGEA1* (transfection stable) ont été traitées à l'Etoposide. Nous observons une augmentation de l'expression de p53 dans les cellules ES non-transfectées après 6h de traitement tandis que l'expression de p53 semble ne pas être augmentée dans les cellules ES exprimant *MAGEA1*. Nous pouvons également observer une induction de l'expression de p21 après 4h de traitement à l'Etoposide dans les cellules non-transfectées tandis que l'induction de l'expression de p21 semble moins forte en présence de *MAGEA1*. L'expression de la caspase-3 est fortement induite après 4h de traitement dans les cellules ES non-transfectées. Nous observons également une induction de l'expression de la caspase-3 dans les cellules exprimant *MAGEA1* avec une induction maximale à 24h mais cette

expression est fortement réduite en comparaison à l'induction observée dans les cellules non-transfectées. Ces résultats indiquent que l'expression de p53, de p21 et de la forme active de la caspase-3 semble être réprimée en présence de *MAGEA1*. Dans ce modèle de cellules ES, *MAGEA1* semblent inhiber l'induction de p53 et de la caspase-3, favorisant ainsi la survie des cellules ES. On remarque que l'expression de la protéine humaine *MAGEA1* a un effet dans les cellules de souris. Ces résultats obtenus *in vitro* sont encourageants en vue de l'élaboration d'une lignée de souris transgéniques exprimant *MAGEA1* afin de tester son effet oncogène.

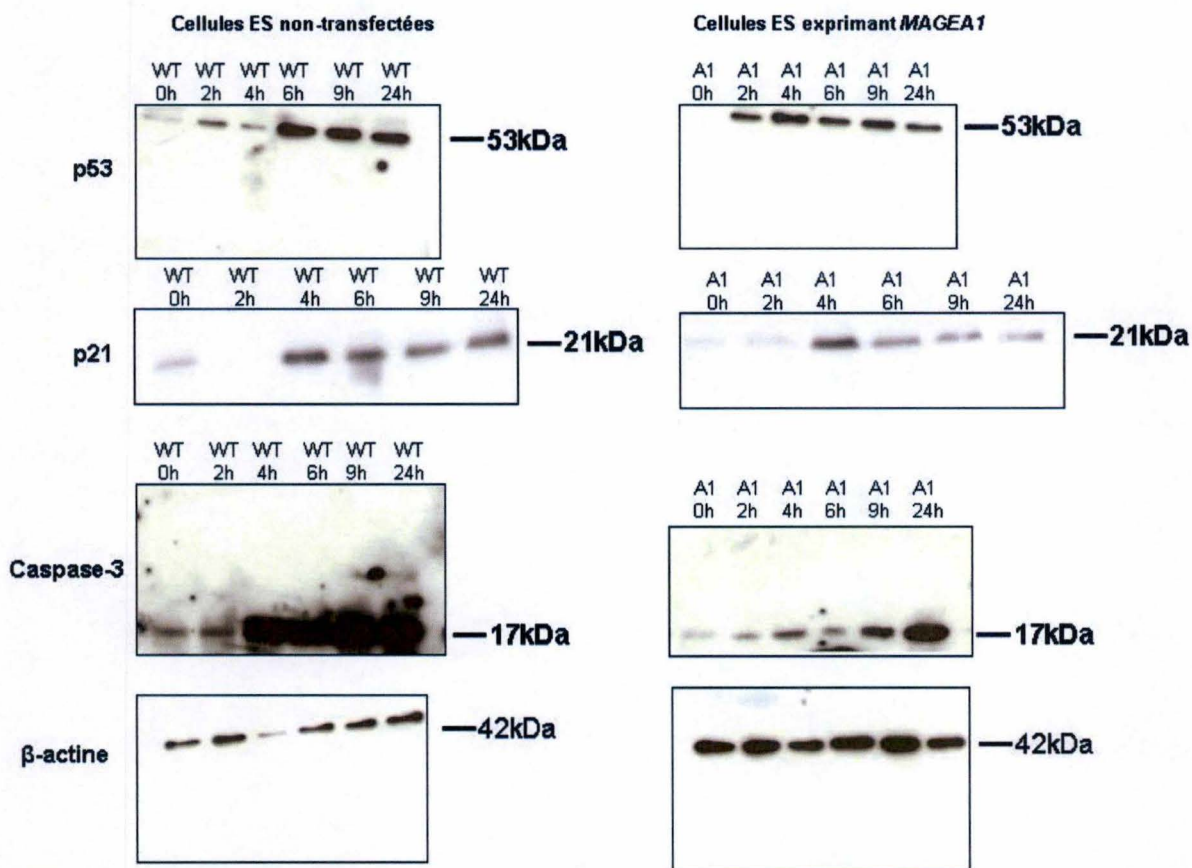


Figure 17: Analyse en Western Blot de p53, de p21 et de caspase-3 à partir d'extraits protéiques de cellules ES non-transfectées et exprimant *MAGEA1*. Analyse de p53 après traitement à l'Etoposide (50µM), au cours d'une cinétique de 24h, sur des cellules ES non-transfectées et exprimant *MAGEA1*. Analyse de p21 après traitement à l'Etoposide (50µM), au cours d'une cinétique de 24h, sur des cellules ES non-transfectées et exprimant *MAGEA1*. Analyse de caspase-3 clivée après traitement à l'Etoposide (50µM), au cours d'une cinétique de 24h, sur des cellules ES non-transfectées et exprimant *MAGEA1*. Le contrôle de charge est la β -actine.

3.2.Effet de *MAGEA1* sur l'expression de p53 et de p21 dans des cellules MCF-10A traitées à l'Etoposide

Nous avons étudié l'expression de p53 et de p21 en présence de *MAGEA1* dans des cellules MCF-10A. La lignée cellulaire MCF-10A est une lignée de cellules mammaires humaines immortalisées non transformées. Pour cela, nous disposons de cellules MCF-10A transduites par le lentivirus vide ou par le lentivirus *MAGEA1*. Le même mode opératoire utilisé pour les cellules ES a été appliqué lors de ces expériences. L'expression de p53 (FIGURE 18 1A et 1B) et de p21 (FIGURE 18 2A et 2B) était semblable dans les deux types cellulaires traités à l'Etoposide (FIGURE 18).

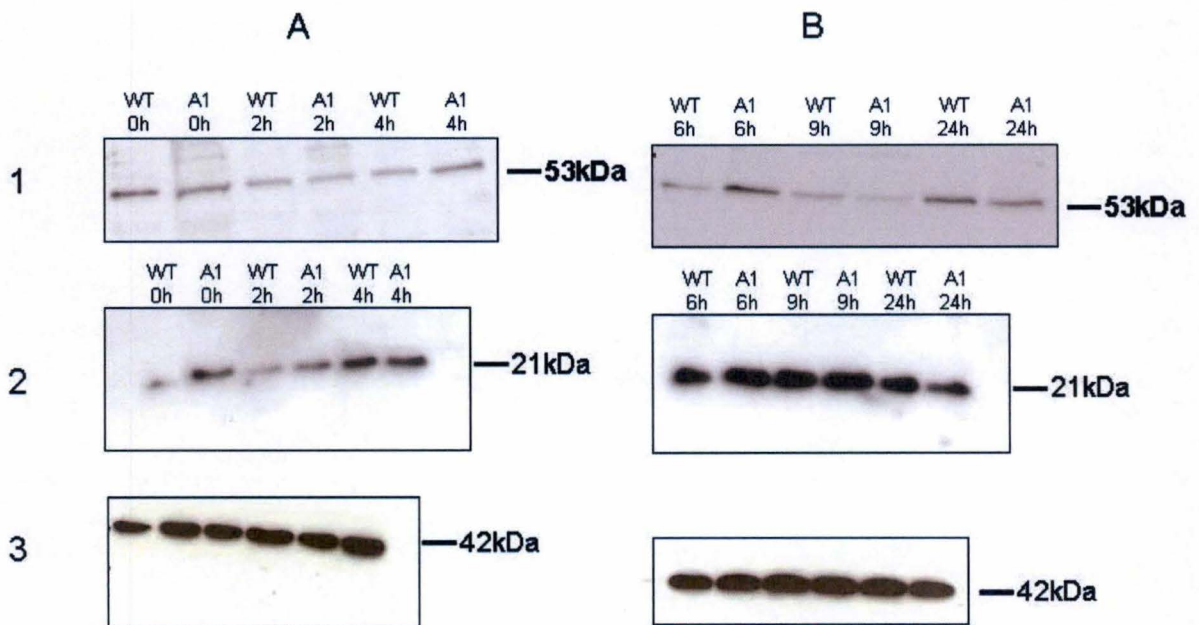


Figure 18: Analyse en Western Blot de p53 et de p21 à partir d'extraits protéiques de cellules MCF-10A transduites par le lentivirus vide ou exprimant *MAGEA1* traitées à l'Etoposide (50µM). (1A et 1B) : Analyse de p53 sur une cinétique de 24h chez les cellules transduites par le lentivirus vide ou exprimant *MAGEA1*. (2A et 2B) : Analyse de p21 sur une cinétique de 24h chez les cellules transduites par le lentivirus vide ou exprimant *MAGEA1*. (3A et 3B) : contrôle de charge β-actine.

Dans ce modèle cellulaire, aucune induction de p53 n'a été observée. L'induction de p21 est faible mais n'est pas modifiée par l'expression de *MAGEA1*.

3.3.Effet de *MAGEA1* sur l'expression de p53 et de p21 dans des cellules MCF-7 traitées à l'Etoposide

Nous avons également étudié l'effet de *MAGEA1* sur l'expression de p53 et de p21 dans un contexte tumoral. Pour cela, nous disposons de cellules MCF-7 (cancer du sein) transduites par le lentivirus vide ou contenant *MAGEA1*. Le même mode opératoire utilisé pour les cellules ES a été appliqué lors de ces expériences. Contrairement à ce que nous avons observé pour les cellules ES, nous n'avons pas mis en évidence d'effet de *MAGEA1* sur le changement de l'expression de p53 après traitement à l'Etoposide entre les cellules transduites par le lentivirus vide et exprimant *MAGEA1* (FIGURE 19 1A et 1B). Cependant, nous avons observé une diminution de l'induction de p21 en présence de *MAGEA1*. Ces résultats suggèrent que dans ce modèle, *MAGEA1* pourrait moduler non pas la stabilité de p53 mais son activité transcriptionnelle, p21 étant une cible directe de p53 (FIGURE 19 2A et 2B).

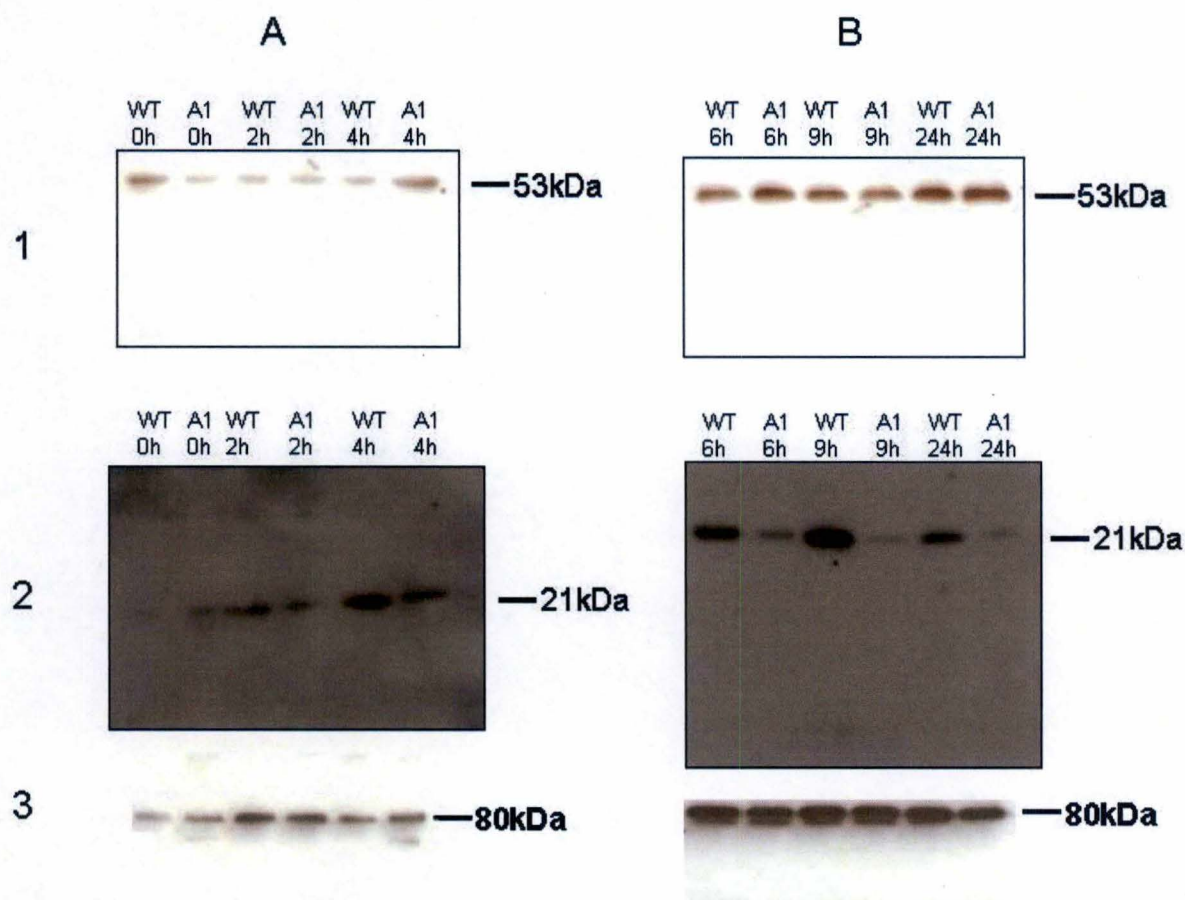


Figure 19: Analyse en Western Blot de p53 et de p21 à partir d'extraits protéiques de cellules MCF-7 transduites par le lentivirus vide ou exprimant *MAGEA1* traitées à l'Etoposide (50 μ M). (1A et 1B) : Analyse de p53 sur une cinétique de 24h dans les cellules transduites par le lentivirus vide ou exprimant *MAGEA1*. (2A et 2B) : Analyse de p21 sur une cinétique de 24h dans les cellules transduites par le lentivirus vide ou exprimant *MAGEA1*. (3A et 3B) : contrôle de charge Ku80.

3.4. Etude de l'effet de *MAGEA1* sur l'activité du promoteur de p21 après traitement à l'Etoposide

Les résultats précédents suggèrent que *MAGEA1* inhibe l'activation transcriptionnelle de p21 par p53. Nous avons testé l'effet de *MAGEA1* sur l'activité du promoteur de p21 dans des cellules ayant subi des lésions à l'ADN. Pour cela, nous disposons d'une construction dans laquelle le promoteur de p21 est en amont d'un gène rapporteur luciférase. Nous avons mesuré l'activité du promoteur de p21 dans des cellules HeLa transfectées, traitées à l'Etoposide (FIGURE 20). Nous avons observé une diminution très significative ($p=0.002$ avec $n=2$) de l'induction de p21 en présence de *MAGEA1* après un traitement à l'Etoposide.

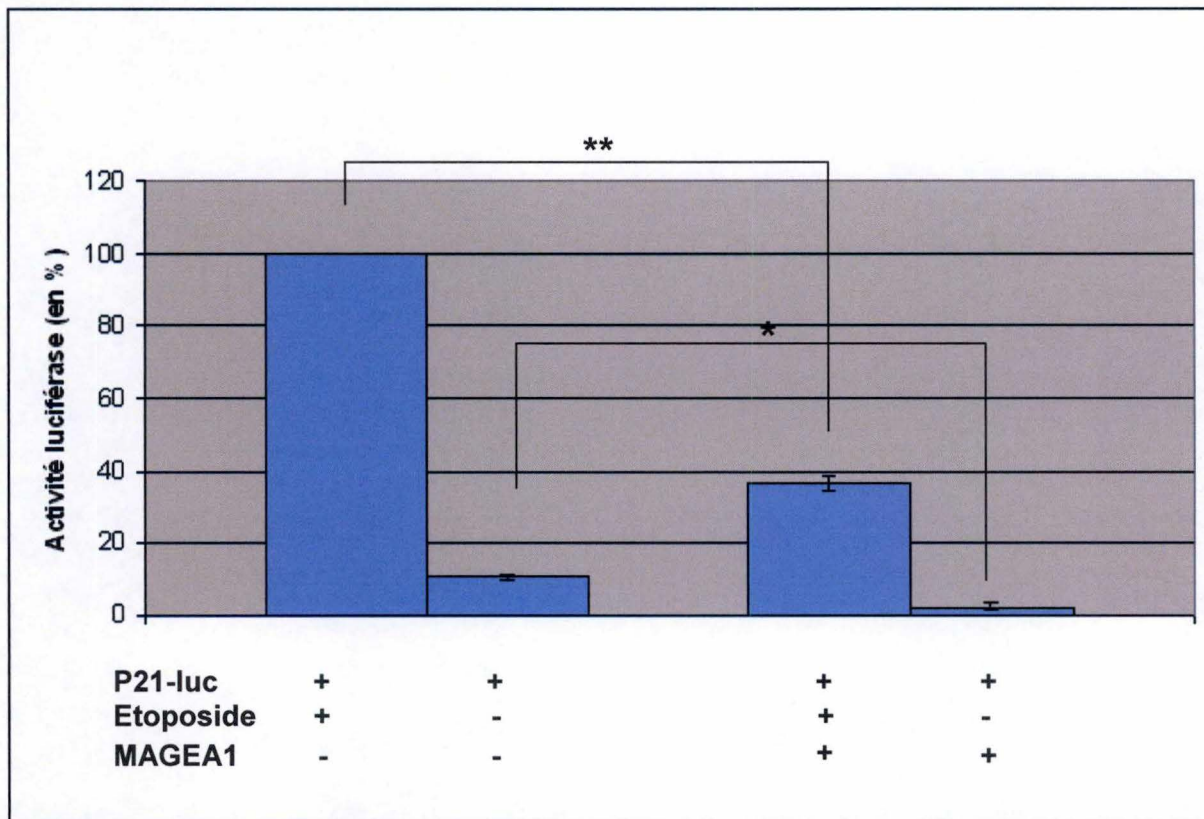


Figure 30: Activité du promoteur p21 en absence ou en présence de *MAGEA1* dans des cellules HeLa traitées à l'Etoposide (n=2). Activité du promoteur p21 en absence ou en présence de *MAGEA1* après traitement à l'Etoposide. Des cellules HeLa ont été transfectées et traitées à l'Etoposide (25µM) afin d'activer le promoteur de p21. L'induction du promoteur p21-luciférase dans les cellules traitées à l'Etoposide a été prise comme valeur de référence (100% d'activité). En présence de *MAGEA1*, l'induction du promoteur p21 est inhibée de manière très significative lors de la stimulation à l'Etoposide. L'induction du promoteur p21 est aussi significativement inhibée en présence de *MAGEA1* en absence d'Etoposide.

Il semblerait donc que *MAGEA1* réprime l'activité du promoteur de p21 en condition de stress génotoxique.

3.5.Effet de *MAGEA1* sur la formation de foci par des cellules SAOS-2 transfectées par p53

Afin d'étudier l'effet de *MAGEA1* sur la prolifération et la survie cellulaire, des tests de formation de colonies ont été réalisés sur des cellules SAOS-2 (p53^{-/-}) transfectées par p53 et/ou *MAGEA1*. Le test de formation de colonies est un test *in vitro* qui évalue la capacité d'une cellule à survivre et à croître jusqu'à former une colonie. Les résultats, montrés dans la figure 21, montrent qu'il n'y a pas de différence significative (p=0.0659) du nombre de colonies entre les cellules transfectées par *MAGEA1* et les cellules transfectées par le vecteur vide (contrôle négatif). La transfection des cellules par p53 induit l'arrêt de la prolifération et la mort des cellules. Ainsi, on observe une différence très significative (p=0.0025) du nombre de colonies formées par les cellules transfectées par p53 comparées aux cellules transfectées par le vecteur vide. Le nombre de colonies formé par les cellules cotransfectées par *MAGEA1*

et *p53* est plus élevé que celui formé par les cellules transfectées par *p53* seul.

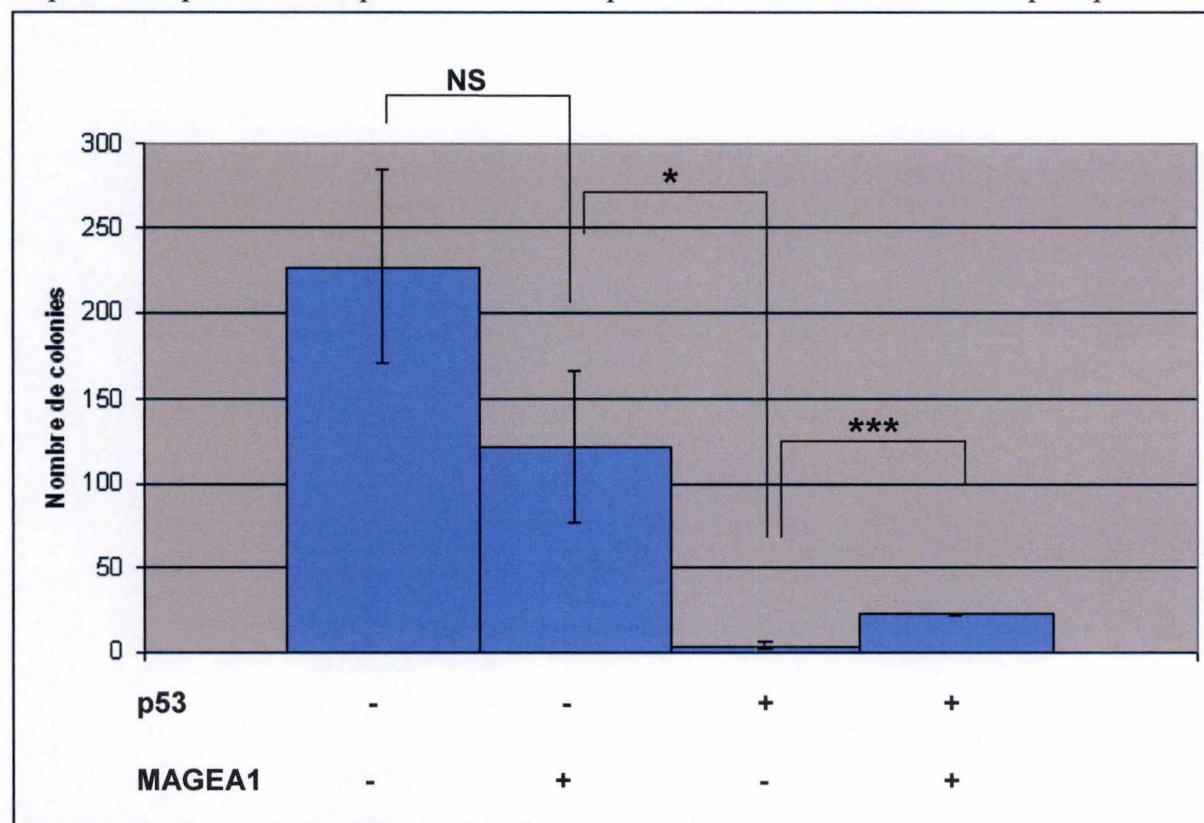


Figure 21 : Test de formation de colonies sur par des cellules SAOS-2 (n=3). Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules transfectées par le vecteur vide (contrôle de transfection) et les cellules transfectées par *MAGEA1*). Une différence hautement significative du nombre de colonies formées a été observée entre les cellules transfectées par *p53* et les cellules cotransfectées par *p53* et *MAGEA1*.

Il semblerait donc que *MAGEA1* protège les cellules de l'effet toxique de *p53*.

4. Etude de l'effet de *MAGEA1* sur la résistance des cellules face à des drogues chimiothérapeutiques

Le phénomène de multirésistance aux drogues chimiothérapeutiques est un problème fréquemment observé. Comme certains gènes *MAGEA* sont exprimés dans de nombreux cancers de différents types histologiques, nous avons étudié l'effet de *MAGEA1* sur la résistance des cellules à des drogues utilisées en chimiothérapie. Nous avons choisi trois drogues ayant une action différente au sein de la cellule : la Doxorubicine, le Docetaxel et le 5-Fluorouracil. La Doxorubicine est un agent intercalant qui agit en inhibant la topoisomérase II et en provoquant des cassures double brin dans l'ADN. Elle peut aussi produire des radicaux libres et inhiber la synthèse de l'ARN ribosomal. Le Docetaxel est un taxane apparenté au Paclitaxel, il agit au niveau des fuseaux mitotiques en empêchant leur dépolymérisation ; ceci conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose. Le 5-Fluorouracil inhibe l'activité de la thymidylate synthase, ce qui affecte la synthèse des pyrimidines. Nous avons choisi comme modèles cellulaires les cellules MCF-10A (non-transformées) et les cellules MCF-7 (transformées).

4.1. Détermination des IC50 à 48h pour les cellules MCF-10A et MCF-7

L'IC50 à 48 heures a été déterminée pour chacune des trois drogues sur les cellules transduites par le lentivirus vide. L'IC50 ou concentration inhibitrice à 50% est considérée comme étant la concentration de la drogue à laquelle 50% des cellules restent vivantes. Les IC50 pour les MCF-7 sont de 0.4 μ M (Doxorubicine); 50 μ M (Docetaxel) et 0.5 μ M (5-Fluorouracil). Pour les cellules MCF-10A, les IC50 sont de 0.5ng/ml (Doxorubicine), 15nM (Docetaxel) et 20 μ M (5-Fluorouracil).

4.2. Effet de *MAGEA1* sur la résistance des cellules MCF-10A à la Doxorubicine, au Docetaxel et au 5-Fluorouracil

Nous disposons de cellules MCF-10A transduites par un lentivirus vide et des cellules MCF-10A transduites de manière stable par un lentivirus gouvernant l'expression de *MAGEA1*. Les cellules ont été mises en présence des drogues pendant quatre jours et nous avons suivi la viabilité cellulaire par test MTT. Comme nous pouvons l'observer, la viabilité cellulaire diminue au cours du temps dans les deux types cellulaires, et ce, pour toutes les drogues utilisées (FIGURE 22). Nous pouvons observer une légère reprise de la croissance après trois jours de traitement pour les cellules exprimant *MAGEA1* mais cette différence n'est pas significative. Nous pouvons conclure de cette expérience que l'expression de *MAGEA1* dans les MCF-10A ne confère pas de résistance aux drogues testées.

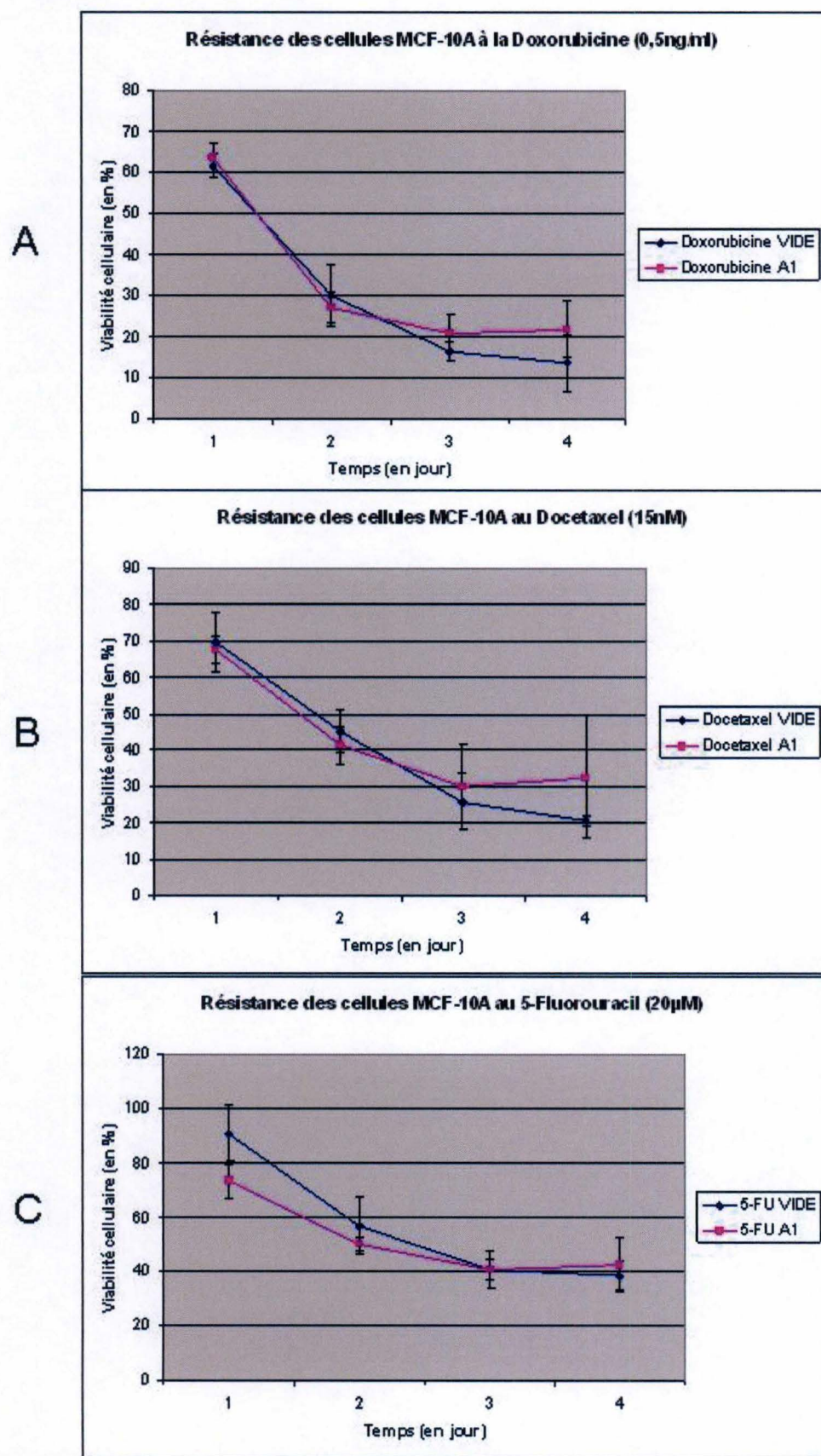


Figure 22 : Test de résistance des cellules MCF-10A traitées sur une période de quatre jours aux drogues chimiothérapeutiques. **(A)** Cellules MCF-10A traitées à la Doxorubicine. **(B)** Cellules MCF-10A traitées au Docetaxel. **(C)** Cellules MCF-10A traitées au 5-Fluorouracil. Aucune différence significative de la viabilité cellulaire n'a été observée pour les trois drogues chimiothérapeutiques testées. La viabilité cellulaire a été déterminée par MTT.

4.3. Résistance des cellules MCF-7 à la Doxorubicine, au Docetaxel et au 5-Fluorouracil en présence de *MAGEA1*

Nous avons testé l'effet de la Doxorubicine, du Docetaxel et du 5-Fluorouracil sur la résistance des cellules MCF-7 qui n'expriment pas de *MAGE* de type I. Nous disposions de cellules MCF-7 transduites par un lentivirus vide et des cellules MCF-7 transduites de manière stable par *MAGEA1*. Nous pouvions ainsi analyser l'effet de *MAGEA1* en présence de ces trois agents chimiothérapeutiques dans un contexte tumoral. Dans un premier temps, nous pouvons observer une diminution de la viabilité cellulaire au cours du temps en présence des drogues (FIGURE 23). Mais, contrairement aux résultats obtenus pour les cellules MCF-10A, nous avons observé une résistance des cellules MCF-7 exprimant *MAGEA1* à la Doxorubicine et au Docetaxel après un traitement de 72h. En effet, une différence significative ($p=0.0427$) et ($p=0.0340$) est observée pour le Docetaxel et la Doxorubicine respectivement (FIGURES 23A et 23B). Concernant la Doxorubicine, une différence très significative apparaît après 96h de traitement ($p=0.0047$) (FIGURE 23A). Par contre, aucune résistance des cellules au 5-Fluorouracil n'a été observée (FIGURE 23C).

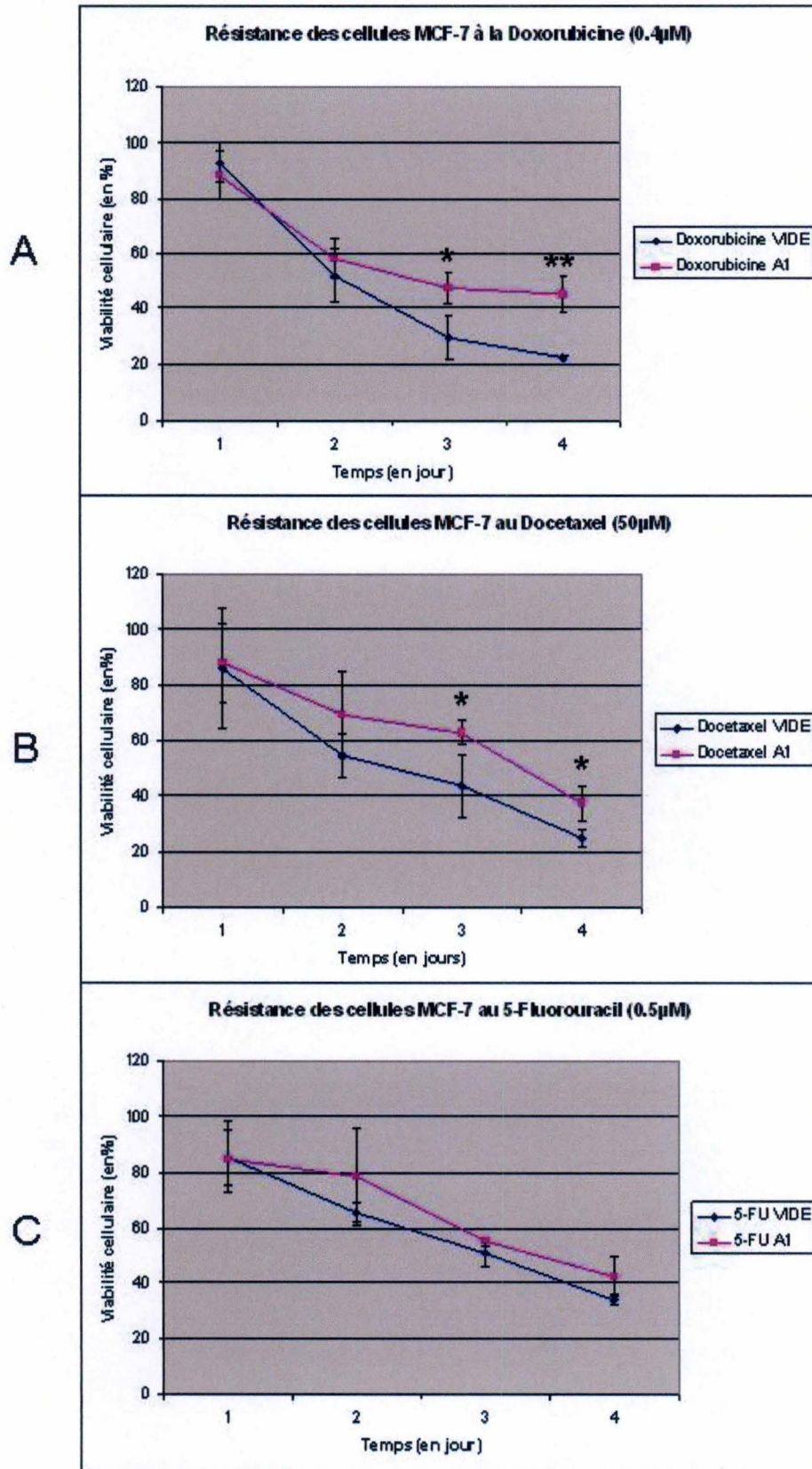


Figure 24: Test de résistance des cellules MCF-7 traitées sur une période de quatre jours. (A) Cellules MCF-7 traitées à la Doxorubicine. (B) Cellules MCF-7 traitées au Docetaxel. (C) Cellules MCF-7 traitées au 5-Fluorouracil. Une différence significative de la viabilité cellulaire après traitement à la Doxorubicine et au Docetaxel par les cellules exprimant *MAGEA1* a été observée. Aucune différence significative de la viabilité cellulaire n'a été observée après traitement des cellules MCF-7 au 5-Fluorouracil. La viabilité cellulaire a été déterminée par MTT.

Discussion

Les gènes *MAGE* de type I sont spécifiquement exprimés dans un grand nombre de tumeurs de divers types histologiques. Ceci suggère que ces gènes pourraient être impliqués dans l'oncogenèse et/ou dans la résistance aux drogues chimiothérapeutiques.

1. *MAGEA1*, p53 et l'apoptose

L'hypothèse selon laquelle les gènes *MAGE* de type I ont un rôle dans l'oncogenèse est supportée par des données récentes montrant que plusieurs protéines *MAGE* interfèrent avec la voie de p53 (Monte et al, 2006 ; Yang et al, 2007 ; Doyle et al, 2010 ; Marcar et al, 2010). (1) En effet, Monte et ses collaborateurs ont montré que *MAGEA2* était capable d'interagir avec p53 au niveau du promoteur du gène *BAX* et de recruter l'histone déacétylase HDAC3 avec pour conséquences, une diminution de la forme acétylée de p53 et de ses sites de liaisons. (2) Yang et ses collaborateurs ont montré que *MAGEA* lie KAP1 et faciliterait ainsi la dégradation de p53. (3) Plus récemment, Doyle (2010) a analysé plusieurs protéines *MAGE* et a montré que toutes ces protéines interagissent avec des protéines RING (dont TRIM27 et TRIM28) qui sont des E3 Ubiquitine ligases. Ainsi les protéines *MAGE* de type I pourraient favoriser la tumorigenèse par ubiquitylation et dégradation de p53. (4) Toujours en 2010, Marcar propose un autre mécanisme d'action par lequel les protéines *MAGE* diminuent l'apoptose dépendante de p53. en interagissant avec son domaine de liaison à l'ADN.

Nos résultats ont montré que, dans les cellules ES traitées à l'étoposide, *MAGEA1* provoque une diminution de l'expression de p53 et de l'activation de la caspase-3. Cette diminution de la stabilisation de p53 pourrait faire intervenir les mécanismes décrits plus haut (Yang et al, 2007 ; Doyle et al, 2010).

Dans les cellules MCF-10A la présence de *MAGEA1* ne modifie ni l'expression de p53 et ni celle de p21 après traitement à l'étoposide. Dans les cellules MCF-7 traitées à l'étoposide, la présence de *MAGEA1* ne modifie pas l'expression de p53. Cependant, nous avons observé une diminution de l'induction de p21 en présence de *MAGEA1*. Ces résultats suggèrent que dans ce modèle cellulaire, *MAGEA1* ne modifie pas la stabilisation de p53 mais agit plutôt sur son activité transcriptionnelle comme proposé par Marcar et Monte (Monte et al, 2006 ; Marcar et al, 2010).

Une répression du promoteur de p21 par *MAGEA1* a également été observée dans des tests luciféras. p21 est un inhibiteur des kinases dépendantes des kinases et est activée par des voies dépendantes et indépendantes de p53. p21 joue un rôle important dans la régulation du cycle cellulaire et plus spécifiquement dans l'arrêt du cycle en phase G1 (Hengst et al, 1998). L'équipe de Sakurai a montré que la protéine *MAGEA4* clivée (*MAGEA4ΔN1*) associée à Miz-1 liait le promoteur p21^{Cip1} et réprimait sa transcription (Sakurai et al, 2004). Nos résultats montrant la répression de l'expression de p21 par *MAGEA1* suggère que *MAGEA1* puisse jouer un rôle au niveau du cycle cellulaire.

Nous avons également analysé l'effet de *MAGEA1* sur le long terme à l'aide d'un test de formation de colonies par des cellules SAOS-2 (p53^{-/-}) transfectées par p53 avec ou sans *MAGEA1*. Nous avons observé que l'expression de *MAGEA1* protégeait les cellules de la « toxicité » de p53.

2. Rôle de *MAGEA1* dans la résistance des cellules à des agents chimiothérapeutiques

La résistance aux drogues chimiothérapeutiques est un problème fréquemment observé et de récentes études ont montré que l'expression des gènes *MAGEA* était corrélée avec une chimiorésistance.

Nous avons observé des effets différents de *MAGEA1* sur la résistance aux drogues dans les cellules MCF-10A et les cellules MCF-7. En effet, aucune résistance à la doxorubicine, au docetaxel et au 5-fluorouracil n'a été observée dans les cellules MCF-10A exprimant *MAGEA1*. Ceci suggère que l'expression de *MAGEA1* seul dans ce contexte de cellules non-transformées ne suffit pas pour conférer une résistance aux drogues. Mais *MAGEA1* conférait une résistance à la doxorubicine et au docetaxel dans le contexte tumoral.

En 2006, l'équipe du Dr. Schneider a montré que *MAGEA2* cible la fonction transactivationnelle de p53 par le recrutement de l'histone déacétylase 2 et confère une résistance aux agents chimiothérapeutiques (Monte et al. 2006). De plus, l'équipe de Duan (2003) a montré que la surexpression de *MAGEA2* et *MAGEA6* dans les cellules ovariennes OVCAR8, conférait une résistance à la doxorubicine et au paclitaxel (Duan et al, 2003). L'équipe de Barboule a montré que le Paclitaxel augmentait l'expression de p21 induisant de ce fait l'arrêt du cycle cellulaire dans les cellules MCF-7. Or nous avons montré que *MAGEA1* était capable de réprimer l'expression de p21 dans ces cellules. Cette action de *MAGEA1* sur le promoteur p21^{Cip1} pourrait expliquer la résistance au Docetaxel que nous avons observée (Barboule et al, 1997). Au cours de cette étude, aucune résistance au 5-fluorouracil des cellules MCF-7 n'a été observée. Deux mécanismes d'apoptose sont décrits en réponse au 5-fluorouracil : un mécanisme p53-dépendant et un second p53-indépendant. L'absence d'effet de *MAGEA1* sur la sensibilité des MCF-7 au 5-fluorouracil pourrait être expliquée en considérant que l'effet du 5-fluorouracil, dans ce modèle cellulaire, passerait majoritairement par la voie indépendante de p53.

Perspectives

MAGEA1 n'a pas d'effet sur le niveau d'expression de p53 dans les cellules MCF-7 et MCF-10A traitées à l'étoposide. Ce résultat est inattendu et devra être confirmé. Nous pourrions analyser le profil de phosphorylation et d'acétylation de p53. En effet, l'équipe de Knight a décrit que l'acétylation du résidu K373 par l'acétyl transférase p300 favorise la phosphorylation des résidus sérine 15, 46 et 383. Une fois phosphorylés, ces résidus entraînent la rétention de p53 dans le noyau et augmentent son affinité pour certains promoteurs de gènes pro-apoptotiques tels que PUMA et AIP1 (Knights et al, 2006 ; Oda et al, 2000 ; Li et al, 2005).

Nous avons montré que *MAGEA1* réprimait le promoteur de p21 dans un système *in vitro* utilisant un rapporteur luciférase. Afin de déterminer si *MAGEA1* est recruté au niveau de ce promoteur, des tests TransAM, EMSA ou CHIP pourront être réalisés. De plus, sachant que p21 a pour rôle de bloquer le cycle cellulaire en G1/S et d'ainsi permettre la réparation de l'ADN, nous pourrions étudier par FACS s'il y a diminution du blocage du cycle en G1/S en présence de *MAGEA1*.

Nous avons observé que *MAGEA1* conférait une résistance des cellules MCF-7 au docetaxel et à la doxorubicine. Concernant le docetaxel, il existe des mécanismes d'activation du Taxol indépendants de p53. Dès lors, il serait intéressant d'étudier dans des cellules p53^{-/-} (SAOS-2) si l'expression de *MAGEA1* et confère une résistance au Taxol indépendamment de p53.

La construction de lentivirus portant d'autres gènes *MAGEA* (*MAGEA2*, *-A3*, *-A10*) permettra d'étudier l'effet de ces gènes *MAGE* sur l'apoptose dépendante de p53. De plus, la construction de ces lentivirus nous permettra d'étudier le rôle des gènes *MAGEA* dans le processus de transformation cellulaire.

Enfin, l'élaboration de souris transgéniques exprimant *MAGEA1* de manière inducible nous permettra de déterminer le rôle oncogène de *MAGEA1* dans des tissus spécifiques. Les résultats obtenus *in vitro* dans les cellules ES sont encourageants en vue de l'élaboration d'une telle lignée de souris.

Bibliographie

Bibliographie

1. Aprelikova O., Pandolfi S., Tackett S., Ferreira M., Salnikow K., Ward Y., Risinger J.I., Barrett J.C., Niederhuber J., MAGE-11 inhibits the hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase PHD2 and activates hypoxic response, *Cancer Res.*, **69** (2009) : 616-624.
2. Barboule N., Chadebecq P., Baldin V., Vidal S., Valette A., Involvement of p21 in mitotic exit after paclitaxel treatment in MCF-7 breast adenocarcinoma cell line, *Oncogene*, **15** (1997) : 2867-2875.
3. Barker P.A., Salehi A., The MAGE Proteins : Emerging Roles in Cell Cycle Progression, Apoptosis, and Neurogenetic Disease, *Journal of Neuroscience Research*, **67** (2002) : 705-712.
4. Chomez P., Williams R., De Backer O., Boon T., Vennström B., The SMAGE gene family is expressed in post-meiotic spermatids during mouse germ cell differentiation, *Immunogenetics*, **43** (1995) : 97-100.
5. Chomez P., De Backer O., Bertrand M., De Plaen E., Boon T., Lucas S., An Overview of the MAGE Gene Family with the Identification of All Human Members of the Family, *Cancer Research*, **61** (2001) : 5544-5551.
6. Clotman F., De Backer O., De Plaen E., Boon T., Picard J., Cell- and stage-specific expression of MAGE genes during mouse spermatogenesis, *Mammalian Genome*, **11** (2000) : 696-699.
7. De Backer O., Verheyden A-M., Martin B., Godelaine D., De Plaen E., Brasseur R., Avner P., Boon T., Structure, Chromosomal Location, and Expression Pattern of Three Mouse Genes Homologous to the Human MAGE Genes, *Genomics*, **28** (1995) : 74-83.
8. De Smet C., Courtois S.J., Faraoni I., Lurquin C., Szikora J-P., De Backer O., Boon T., Involvement of Ets binding sites in the transcriptional activation of MAGE1 gene, *Immunogenetics*, **42** (1995) : 282-290.
9. De Smet C., De Backer O., Faraoni I., Lurquin C., Brasseur F., Boon T., The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93** (1996) : 7149-7153.
10. De Smet C., Lurquin C., Lethé B., Martelange V., Boon T., DNA Methylation Is the Primary Silencing Mechanism for a Set of Germ Line- and Tumor-Specific Genes with a CpG-Rich Promoter, *Molecular and Cellular Biology*, **19** (1999) : 7327-7335.
11. Dolan M.E., Roy S.K., Fasanmade A.A., Paras P.R., Schilsky R.L., Ratain M.J., O⁶-benzylguanine in humans : metabolic, pharmacokinetic, and pharmacodynamic findings, *Journal of Clinical Oncology*, **16** (1998) : 1803-1810.
12. Doyle J.M., Gao J., Wang J., Yang M., Potts P.R., MAGE-RING Protein Complexes Comprise a Family of E3 Ubiquitin Ligases, *Molecular Cell*, **39** (2010) : 963-974.

Bibliographie

13. Duan Z., Duan Y., Lamendola D.E., Overexpressed of *MAGE/GAGE* Genes in Paclitaxel/Doxorubicin-Resistant Human Cancer Cell Lines, *Clinical Cancer Research*, **9** (2003) : 2778-2785.
14. Epstein A.C.R., Gleadle J.M., McNeill L.A., Hewitson K.S., O'Rourke J., Mole D.R., Mukheriji M., Metzen E., Wilson M.I., Dhanda A ;, Tian Y-M. Masson N., Hamilton D.L., Jaakkola P., barstead R., Hodgkin J., Maxwell P.H., Pugh C.W., Schofield C.J., Ratcliffe P.J., C. elegans EGL-9 and Mammalian Homologs Define a Family of Dioxygenases that Regulate HIF by Prolyl Hydroxylation, *Cell*, **107** (2001) : 43-54.
15. Fan T-J., Han L-H., Cong R-S., Liang J., Caspase Family Proteases and Apoptosis, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **37** (2005) : 719-727.
16. Friedman J.R., Jensen D.E., Speicher D.W., Huang X.P., Neilson E.G., Rauscher F.J. III, KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain, *Genes Dev.*, **10** (1996) : 2067-2078.
17. Fulda S., Inhibitor of Apoptosis (IAP) Proteins : Novel Insights into the Cancer-Relevant Targets for Cell Death Induction, *ACS Chemical Biology*, **4** (2009) : 499-501.
18. Gottesman M.M., Mechanisms of Cancer Drug Resistance, *Annu. Rev. Med.*, **53** (2002) : 615-627.
19. Hait W.N., Targeted cancer therapeutics, *Cancer Research*, **69** (2009) : 1263-1267.
20. Haupt S., Berger M., Goldberg Z., Haupt Y., Apoptosis – the p53 network, *Journal of Cell Science*, **116** (2003) : 4077-4085.
21. Hengst L., Gopfert U., Lashuel H.A., Reed S.I., Complete inhibition of Cdk/cyclin by one molecule of p21 Cip1, *Gene Dev.*, **12** (1998) : 3882-8.
22. Johnstone R.W., Ruefli A.A., Lowe S.W., Apoptosis : A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy, *Cell*, **108** (2002) : 153-164.
23. Knights C.D., Catania J. Di Giovanni S., Muratoglu S., Perez R., Swartzbeck A., Quong A.A., Zhang X., Beerman T., Pestell R.G., Avantaggiati M.L., Distinct p53 acetylation cassettes differentially influence gene-expression patterns and cell fate, *The Journal of Cell Biology*, **173** (2006) : 533-544.
24. Komarova N.L., Wodarz D., Drug resistance in cancer : Principles of emergence and prevention, *PNAS*, **102** (2005) : 9714-9719.
25. Laduron S., Deplus R., Zhou S., Kholmanskikh O., Godelaine D., De Smet C., Hayward S.D., Fuks F., Boon T., De Plaen E., MAGE-A1 Interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription, *Nucleic Acids Research*, **32** (2004) : 4340-1350.
26. Launay S., Hermine O., Fontenay M., Kroemer G., Solary E., Garrido C., Vital functions for lethal caspases, *Oncogene*, **5** (2005) : 5137-5148.

Bibliographie

27. Li X., Dumont P., Della Pietra A., Shetler C., Murphy M.E., The Codon 47 Polymorphism in p53 Is Functionally Significant, *The Journal of Biological Chemistry*, **280** (2005) : 24245-24251.
28. Marcar L., MacLaine N.J., Hupp T.R., Meek D.W., Mage-A cancer/testis antigens inhibit p53 function by blocking its interaction with chromatin, *Cancer Research*, **70** (2010) : 10362-10370.
29. May P., May E., Rôles de p53 dans le cycle cellulaire, l'apoptose et le cancer, *Revue Française des Laboratoires*, **311** (1999) : 35-42.
30. Mihara M., Erster S., Zaika A., Petrenko O., Chittenden T., pancoska P., Moll U.M., p53 Has a Direct Apoptogenic Role at the Mitochondria, *Molecular Cell*, **11** (2003) : 577-590.
31. Monte M., Simonatto M., Peche L.Y., Bublik D.R., Gobessi S., Pierotti M.A., Rodolfo M., Schneider C., MAGE-A tumor antigens target p53 transactivation function through histone deacetylase recruitment and confer resistance to chemotherapeutic agents, *PNAS*, **103** (2006) : 11160-11165.
32. Nagao T., Higashitsuji H., Nonoguchi K., Sakurai T., Dawson S., Mayer R.J., Itoh K., Fujita J., MAGE-A4 Interacts with the Liver Oncoprotein Gankyrin and Suppresses Its Tumorigenic Activity, *The Journal of Biological Chemistry*, **278** (2003) : 10668-10674.
33. Oda K., Arakawa H., Tanaka T., Matsuda K., Tanikawa C., Mori T., Nishimori H., Tamai K., Tokino T., Nakamura Y., Taya Y., *p53AIP*, a Potential Mediator of p53-Dependent Apoptosis, and Its Regulation by Ser-46-Phosphorylated p53, *Cell*, **102** (2000) : 843-862.
34. Ottaviani S., Zhang Y., Boon T., Van der Bruggen P., A MAGE-1 antigenic peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 tumor cells, *Cancer Immunol Immunoter*, **54** (2005) : 1214-1220.
35. Qiu G., Fang J., He Y., 5' CpG island methylation analysis identifies the MAGE-A1 and MAGE-A3 genes as potential markers of HCC, *Clinical Biochemistry*, **39** (2006) : 259-266.
36. Saikumar P., Dong Z., Mikhailov V., Denton M., Weinberg J.M., Venkatachalam M.A., Apoptosis : Definition, Mechanisms, and Relevance to Disease, *The American Journal of Medicine*, **107** (1999) : 489-506.
37. Sakurai T., Itoh K., Higashitsuji H., Nagao T., Nonoguchi K., Chiba T., Fujita J., A Cleaved Form of MAGE-A4 Binds to Miz-1 and Induces Apoptosis in Human Cells, *The journal of Biological Chemistry*, **279** (2004) : 15505-15514.
38. Schultz D.C., Ayyanathan K., Negorev D., Maul G.G., Rauscher F.J. III, SETDB1 : a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that

Bibliographie

- contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic gene by KRAB zinc-finger proteins, *Genes Dev.*, **16** (2002) : 919-932.
39. Solyanik G.I., Multifactorial nature of tumor drug resistance, *Experimental Oncology*, **32** (2010) : 181-185.
40. Suzuki T., Yoshida K., Wada Y., Hamai Y., Sentani K., Oue N., Yasui W., Melanoma-associated antigen-A1 expression predicts resistance to docetaxel and paclitaxel in advanced and recurrent gastric cancer, *Oncology reports*, **18** (2007) : 329-336.
41. Takahashi K., Shichijo S., Noguchi M., Identification of MAGE-1 and MAGE-4 Proteins in Spermatogonia and Primary Spermatocytes of Testis, *Cancer Research*, **55** (1995) : 3478-3482.
42. Theyer D., Hamilton G., Rôle de la résistance multi-drogues dans les tumeurs génito-urinaires, *Progrès en Urologie*, **3** (1993) : 385-392.
43. Traversari C., Van der Bruggen P., Luescher I.F., Lurquin C., Chomez P., Van Pel A., De Plaen E., Amar-Costesec A., Boon T., A Nonapeptide Encoded by Human Gene MAGE-1 Is Recognized on HLA-A1 by Cytolytic T Lymphocytes Directed against Tumor Antigen MZ2-E, *J. Exp. Med.*, **176** (1992) : 1453-1457.
44. Van der Bruggen P., Traversi C., Chomez P., Lurquin C., De Plaen E., Van den Eynde B., Knuth A., Boon T. A Gene Encoding an Antigen Recognized by Cytolytic T Lymphocytes on a Human Melanoma, *Science*, **254** (1991) : 1643-1647.
45. Van der Bruggen P., Zhang Y., Chaux P., Stroobant V., Panichelli C., Schultz E.S., Chapiro J., Van den Eynde B.J., Brasseur F., Boon T., Tumor-specific antigenic peptides recognized by human T cells, *Immunological Reviews*, **188** (2002) : 51-64.
46. Wang C., Ivanov A., Chen L., Fredericks W.J., Seto E., Rauscher F.J. III, Chen J., MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation, *The EMBO Journal*, **24** (2005) : 3279-3290.
47. Wang X., Tang J., Xing L., Shi G., Ruan H., Gu X., Liu Z., Wu X. Gao X. Xu Y., Interaction of MAGED1 with nuclear receptors affects circadian clock function, *The EMBO Journal*, **29** (2010) : 1389-1400.
48. Westman J.J., Fabijonas B.R., Kern D.L., Hanson F.B., Compartmental Model for Cancer Evolution : Chemotherapy and Drug Resistance, (2001).
49. Wischniewski F., Pantel K., Schwarzenbach H., Promoter Demethylation and Histone Acetylation Mediate Gene Expression of *MAGE-A1*, *-A2*, *-A3* and *-A12* in Human Cancer Cells, *Mol Cancer Res*, **4** (2006) :339-349
50. Yang B., O'Herrin S.M., Wu J., Reagan-Shaw S., Ma Y., Bhat K.M.R., Gravekamp C., Setaluri V., Peters N., Hoffmann F.M., Peng H., Ivanov A.V., Simpson A.J.G., Longley B.J., MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C Proteins Form Complexes with

Bibliographie

KAP1 and Suppress p53-Dependent Apoptosis in MAGE-Positive Cell Lines, *Cancer Res*, **67** (2007) : 9954-9962.

51. Yang B., O'Herrin S., Wu J., Reagan-Shaw S., Ma Y., Nihal M., Longley B.J., Select Cancer testes Antigens of the MAGE-A, -B and -C Families Are Expressed in Mast Cell Lines and Promote Cell Viability *In Vitro* and *In Vivo*, *Journal of Investigative Dermatology*, **127** (2007) : 267-275.