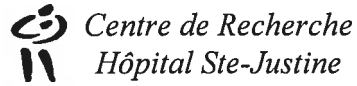




Université de Montréal



RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DU GENE SMN1
DANS LES CELLULES EMBRYONNAIRES P19 DE SOURIS.

par

Raphaël Rouget

Programme de biologie moléculaire
Faculté des Études Supérieures

Mémoire présentée à la Faculté des Études Supérieures en vue de l'obtention du
grade de Maîtrise de biologie moléculaire (M. Sc).

Janvier, 2004

©, Rouget, 2004



QH

506

U34

2904

v. 020

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire intitulé :

Régulation transcriptionnelle du gène SMN1 dans les cellules
embryonnaires P19 de souris.

présenté par :
Raphaël Rouget

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jacques Michaud
président-rapporteur

Dre Louise Simard
directeur de recherche

Dre Muriel Aubry
membre du jury

RÉSUMÉ

Chez l'enfant, l'amyotrophie spinale (AS) est une maladie génétique neuromusculaire de transmission autosomale récessive. Le locus de l'AS se situe sur le chromosome 5 et contient 2 gènes « Survival of Motor Neuron » : les gènes SMN1 et SMN2. Les enfants atteints de l'AS-5q sont homozygotes pour des délétions/mutations du gène SMN1. Cette maladie causée par un effet de dosage de la protéine SMN pleine-longueur (issue majoritairement du gène SMN1), affecte de façon quasi-exclusive les motoneurons α de la moelle épinière. La restauration des niveaux protéiques pleine-longueur SMN, basée sur l'épissage, est l'une des stratégies thérapeutiques les plus étudiées. Cependant, très peu d'informations ont été rapportées sur la régulation cellulaire de son expression. L'étude des promoteurs SMN1 et SMN2, menée dans la lignée cellulaire P19 de souris, suggère l'existence d'une régulation transcriptionnelle conservée entre les promoteurs SMN1 (humain) et Snn (souris) au cours de la différenciation des cellules P19, induite par l'acide rétinoïque (P19AR). L'approche utilisée dans cette analyse, nous a permis de réduire les promoteurs SMN1 et Snn de 0.132 Kb et 1.14 Kb respectivement ainsi que d'établir une implication fonctionnelle des éléments cis conservés +58Sp1, NFIL6 RE et +104Ets dans l'activité promotrice basale SMN1. Nous avons clairement démontré une action mutuelle des sites NFIL6 RE et +104Ets ainsi qu'une conservation fonctionnelle entre les sites +104Ets (SMN1) et +114Ets (Snn). Cette étude transcriptionnelle établit donc pour la première fois un rôle fonctionnel critique des régions promotrices conservées pour l'expression de SMN1.

Mots clés : *SMN1, Snn, promoteur, Ets, NFIL6 RE, Sp1, acide rétinoïque, P19.*

ABSTRACT

Childhood Spinal Muscular Atrophy (SMA) is an autosomal recessive neuromuscular disorder. The SMA locus is located on chromosome 5 which contains 2 Survival of Motor Neuron genes: the SMN1 and SMN2 genes. SMA children are homozygous for deletions/mutations involving the SMN1 gene. Thus, the disease is caused by a dosage effect of full-length SMN protein, the principle product of the SMN1 gene. This dosage effect seems to affect almost exclusively the anterior horn α motor neurons of the spinal cord. Until recently, restoration of full-length SMN levels by targeting alternative splicing of SMN2 gene was the most studied therapeutic approach. At this time, little is known regarding regulation of SMN1 expression. Previous transcriptional studies using the P19 mouse cell line, revealed that the SMN1 promoter is down-regulated during retinoic acid-induced differentiation, a response that should be conserved in the *Smn* (mouse) promoter which should be conserved with *Smn* (mouse) promoter. In this study, we have reduced the length of the SMN1 and *Smn* promoters by more than 130 bp and 1.14 kb, respectively and have provided evidence for the functional implication of 3 conserved *cis* elements, namely +58Sp1, NFIL6 RE and +104Ets, in basal SMN1 promoter activity. We have clearly demonstrated a mutual action between the NFIL6 RE and +104Ets sites as well as the functional conservation between +104Ets (SMN1) and +114Ets (*Smn*) sites. This study is the first to establish a functional and critical role for the conserved promoter regions in regulating SMN1 gene expression.

Key words: *SMN1, Smn, promoter, Ets, NFIL6 RE, Sp1, retinoic acid, P19.*

TABLE DES MATIÈRES

<u>LISTE DES FIGURES</u>	VIII
<u>LISTE DES SCHÉMAS</u>	VIII
<u>LISTE DES TABLEAUX</u>	IX
<u>LISTE DES ABBRÉVIATIONS</u>	X
<u>REMERCIEMENTS</u>	XIII
<u>DÉDICACE</u>	XIV
<u>INTRODUCTION</u>	1
1) VERS L'IDENTIFICATION DU LOCUS GÉNIQUE DE LA MALADIE	5
2) LES ALTÉRATIONS DU GÈNE SMN1 ET L'AMYOTROPHIE SPINALE	7
3) LES GÈNES MODIFICATEURS DU PHÉNOTYPE CLINIQUE	11
4) EXPRESSION DU GÈNE SMN1	14
5) LES FONCTIONS DE LA PROTÉINE SMN	16
5.1) <i>La protéine SMN et ses partenaires protéiques</i>	17
5.2) <i>La protéine SMN et ses orthologues</i>	21
5.3) <i>Fonction(s) de la protéine SMN impliquée(s) dans l'AS</i> :.....	23
6) LES APPROCHES THÉRAPEUTIQUES DE LA MALADIE	25
7) PROJET DE RECHERCHE	29

7.1) <i>Les promoteurs SMN et Smn</i>	29
7.2) <i>Modèle de différenciation cellulaire : Le modèle P19</i>	30
7.3) <i>Objectifs et description</i>	32

MATÉRIELS ET MÉTHODES.....35

1) CONSTRUCTION GÈNE-RAPPORTEUR LUCIFÉRIQUE DES PROMOTEURS SMN1 ET Smn.....36

2) CULTURE ET DIFFÉRENCIATION « NEURECTODERMALE » DE LA LIGNÉE P19.....37

3) TRANSFECTIONS TRANSITOIRES DES CONSTRUCTIONS prSMN1-pGL3 ET prSmn-pGL3 DANS LES CELLULES P19 NON-DIFFÉRENCIÉES ET DIFFÉRENCIÉES.....38

3.1) Analyse statistique des activités promotrices SMN1 et Smn.....39

4) ANALYSE *In silico* DES PROMOTEURS MINIMAUX SMN1 ET Smn : EMPREINTE PHYLOGÉNÉTIQUE DU PROMOTEUR SMN1.....40

4.1) Alignement des promoteurs minimaux SMN1 et Smn.....41

4.2) Recherche d'éléments cis candidats.....41

5) ANALYSE DES ÉLÉMENTS CIS CANDIDATS PAR COMPÉTITION EN GEL RETARD ET IMMUNOLIAISON.....43

5.1) Design des sondes ADN double-brins utilisées pour l'analyse.....43

5.2) Préparation des extraits nucléaires.....45

5.3) EMSA (« Electrophoretic Mobility Shift Assay »): gels retards.....46

6) MUTAGENÈSES DIRIGÉES DES PROMOTEURS SMN1 ET Smn.....47

RÉSULTATS.....49

1) IDENTIFICATION DE LA RÉGION PROMOTRICE MINIMALE SMN1 ET Smn. EFFET DE LA DIFFÉRENCIATION « NEURECTODERMALE » INDUITE PAR L'ACIDE RÉTINOÏQUE.....50

2) EMPREINTE PHYLOGÉNÉTIQUE DU PROMOTEUR SMN1 ET ÉLÉMENTS CIS CANDIDATS SÉLECTIONNÉS.....53

3) IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES ÉLÉMENTS CIS CANDIDATS À LA RÉGULATION DU PROMOTEUR SMN1.....55

3.1) Liaison du facteur de transcription Sp1 au promoteur SMN1	56
3.2) L'élément cis +104Ets module l'activité promotrice basale SMN1 et présente une conservation fonctionnelle.....	59
3.3) Action mutuelle des sites NFIL6 RE et +104Ets dans l'activité basale du promoteur SMN1 et exclusion du site candidat AhR	64
<u>FIGURES</u>	67
<u>DISCUSSION</u>	78
1) L'ÉLÉMENT DE RÉPONSE NFIL6.....	81
2) LES ÉLÉMENTS CIS ETS.....	85
3) LES ÉLÉMENTS CIS SP1.....	88
4) EFFETS DE LA DIFFÉRENCIATION CELLULAIRE	89
5) CONCLUSION(S) ET PERSPECTIVE(S).....	90
<u>CONCLUSIONS</u>	95
<u>INDEX BIBLIOGRAPHIQUE</u>	96
<u>ANNEXES</u>	107

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Détermination de la région promotrice minimale SMN1 et Smn.....	68
Figure 2 : Empreinte phylogénétique du promoteur SMN1.....	70
Figure 3 : Criblage par compétition froide en gel retard des sondes double-brins pV, pVI, pVII et pVIIa (EMSA).....	72
Figure 4 : Criblage par compétition froide en gel retard des sites candidats Ets à l'aide des sondes pVII et pVIIa (EMSA).	74
Figure 5 : Mutagenèse dirigée des sites candidats retenus sur le promoteur SMN1 m15p117.....	75
Figure 6 : Criblage des sites candidats mutés par transfections transitoires des constructions prSMN1-pGL3 m15p117 dans les cellules P19 et P19AR.	76
Figure 7 : Conservation fonctionnelle du site +114Ets du promoteur de souris m46p125 dans les cellules P19 et P19AR.	77

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 1 : Organisation du locus SMA	7
Schéma 2 : Représentation schématique des délétions (A) et des allèles SMN1 (B) fréquemment retrouvées chez les patients atteints.....	9
Schéma 3 : Représentations schématiques de la protéine SMN : Les domaines SMN (A) et le complexe SMN (B).....	19
Schéma 4 : Description schématique du modèle mécanistique de la régulation transcriptionnelle basale du promoteur SMN1.....	91

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau I</u> : Mutations ponctuelles retrouvées dans le gène SMN1.....	8
<u>Tableau II</u> : Sondes marquées utilisées pour l'analyse en gel retard.....	44
<u>Tableau III</u> : Oligonucléotides double-brins utilisés dans le criblage de candidats par compétition froide en gel retard.....	45
<u>Tableau IV</u> : Constructions mutantes pGL3 prSMN1-pGL3 et prSmn-pGL3.	48

LISTE DES ABBREVIATIONS

°C	unité degrés Celcius
α 2M	α 2 macroglobuline
α MEM/DMEM	α ou D Minimum Essential Medium
5q11.2-13.3	Région du bras long du chromosome 5 de 11.2 à 13.3
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique Complémentaire
AhR	Aromatic hydrocarbon Receptor
AP-1	Activating enhancer binding Protein 1
AP-2	Activating enhancer binding Protein 2
APRF	Acute Phase response Factor
AR	Acide Rétinoïque
ARN	Acide Ribonucléique
ARNhn	Acide Ribonucléique hétéro-nucléaire
AS	Amyotrophie Spinale
ATP	Adenosine 5' -TriPhosphate
Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2 protein
C/EBP β	CAAT-Enhancer Binding Protein β
CeSMN	Orthologue de SMN chez <i>Caenorhabditis Elegans</i>
ChIP	Chromatin ImmunoPrecipitation
CMV	CytoMegaloVirus
CNTF	Ciliary NeuroTrophic Factor
CO ₂	Carbon dioxyde
CT-1	Cardiotrophin-1
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylene Diamine Tetra-Acetic acid
EGTA	Ethylene Glycol Tetra-Acetic acid
EHMN	Embryonic Human Motor Neuron cell line
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
ESE	Exonic Splice Enhancer
ESS	Exonic Splice Silencer
Ets-1	Erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1
Ets-2	Erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2
FBS	Foetal Bovine Serum
Fli1	Friend leukemia integration 1 TF
fmol	unité femtomole
[γ ³² P]dCTP	Cytosine Triphosphate marquée au ³² P
g/mL	unite gramme par millilitre (g.mL ⁻¹)
GABP (NRF2)	GA-Binding Protein (Nuclear Respiratory Factor 2)
GAGA	Trithorax-like protein
GC-rich	Séquence riche en Guanine et Cytosine
GDNF	Glial-Derived Neurotrophic Factor
h	heure

HEPES	HydroxyEthylPiperazine EthanoSulfonic acid
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HTH	Helix-Turn-Helix
IgG	Immunoglobuline de type G
IL6	Interleukine 6
Inr	Elément initiateur
IRF-1	Interferon Response Factor 1
ISRE	Insulin Stimulated Response Element
JAK	Janus Activated Kinase
kb	kilobase
KCl	Potassium Chloride
kDa	kiloDalton
KH₂PO₄	Postassium Phosphate, dibasic
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LM-PCR	Ligation-Mediated Polymerase Chain Reaction
µg	unité microgramme (10 ⁻⁶ gramme)
µL	unité microLitres (10 ⁻⁶ Litre)
M	unité molaire (mol.L ⁻¹)
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MAZ	Myc-Associated Zinc finger protein
Mb	Megabase (10 ⁶ paire de bases)
MgCl₂	Magnesium Chloride
MgSO₄	Magnesium Sulfate
min	minute
mM	unite millimolaire (mmole.L ⁻¹)
Na₂HPO₄	Phosphate de sodium, monobasique
NaCl	Chlorure de sodium
NaH₂PO₄	Phosphate de sodium, dibasique
NAIP	Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein
NFIL6 RE	C/EBPβ (NFIL6)-related Response Element
NFIL6 RE-BPs	Nuclear Factor IL6 RE Binding Proteins
NGF	Neuronal Growth Factor
NMDA R1	N-methyl D-Aspartate Receptor 1
NMDA	N-methyl D-Aspartate
ONPG	O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside
pb	unité pair de bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEA3	Polyomavirus Enhancer Activator 3
PFN II	Profiline II
PMSF	PhenylMethylSulfonylFluoride
polydIdC	acide poly-deoxyInosinodeoxyCytidylique
PU.1	Spi-I TF (Ets TF)
RC	Région Conservée
SERF1A	Small EDRK-Rich Factor 1A
SIP1	SMN Interacting Protein 1

SMA	Spinal Muscular Atrophy
SMN	Survival of Motor Neuron
SMNΔ7	Protéine SMN dépourvue de l'exon 7
snRNPs	small nuclear RiboNucleoParticles
siRNA	small interference RNA
SPI-3	Serum Protease Inhibitor 3
Stat1	Signal transducer and activator transcription 1
Stat3	Signal transducer and activator transcription 3
SV40	Simian Virus 40
TBE	Tampon Tris-Borate-EDTA
TEL	Translocation Ets Leukemia
URL	Unité Relative Luciférase
V/cm	unité de migration en Volt par centimètre ($V \cdot cm^{-1}$)
Yab8p	Orthologue de SMN chez <i>Saccharomyces Pombe</i>
YAC	Yeast Artificial Chromosome
Yip1p	Orthologue de SIP1 (<i>gemin2</i>) chez <i>S. Pombe</i>
ZfSMN	Orthologue de SMN retrouvé chez <i>Danio Rerio</i>

REMERCIEMENTS

Je remercie ma directrice de recherche, le Docteur Louise Simard, pour m'avoir accueilli au centre de recherche de l'hôpital Sainte-Justine de Montréal, pour mon intégration au sein de son équipe et le projet de recherche qui m'a été confié, ainsi que toute la confiance accordée au cours de ma formation.

Je tiens à remercier Mademoiselle Circé Codio, Mesdames Sandra Morissette et Camille Rochette pour leurs assistance technique, leurs conseils précieux et avisés, et sans qui ce projet n'aurait pu être mené à bien.

Je remercie également le Docteur André Tremblay pour nous avoir fournis le luminomètre nécessaire à notre analyse, ainsi que le Docteur Mounib Elchelby pour son assistance technique.

Enfin, je remercie dans le désordre le Docteur Tahar Aboukassim, Mesdemoiselles Géraldine Mathonnet, Julie Desnoyers et M. Yannick Auclair pour leurs commentaires pertinents lors de la rédaction de ce mémoire.

A mes parents, Claude et Gérard pour leur soutien inconditionnel...

INTRODUCTION

INTRODUCTION

L'Amyotrophie Spinale (AS) est une maladie génétique neuromusculaire infantile. Cette dernière souvent létale, de transmission autosomale récessive, est caractérisée par une dégénérescence des motoneurones α de la corne antérieure de la moelle épinière. De plus, l'AS est associée à une atrophie musculaire proximale et bilatérale ainsi qu'à une paralysie progressive. Les enfants atteints de la maladie présentent une fonte musculaire ainsi qu'une faiblesse plus importante au niveau de la racine des membres inférieurs que supérieurs, incluant une atteinte diaphragmatique dans les formes aiguës de la maladie (1).

L'incidence élevée de l'amyotrophie spinale de 1/6000 naissances et sa fréquence de porteurs de 1/50, en font la cause la plus importante de mortalité infantile parmi les défaillances monogéniques. Cette incidence et cette fréquence semblent sensiblement les mêmes quelle que soit la population étudiée (1;2).

Une re-classification récente de la maladie, basée sur la sévérité motrice et l'âge d'apparition de la maladie des individus atteints d'AS, décrit 4 types d'AS, avec des profils cliniques chevauchants et hétérogènes (3;4).

La forme d'AS de type I, connue également comme la maladie de Werdnig-Hoffmann, est la forme la plus sévère sur le plan clinique. Les symptômes apparaissent dans les 6 premiers mois de vie et le décès survient dans 80 % des cas bien avant l'âge de 2 ans. Les enfants affectés par ce type d'AS ne peuvent adopter de posture assise de façon autonome. Les muscles proximaux semblent plus

affectés, avec une paralysie plus prononcée pour les membres inférieurs. La cause du décès est majoritairement imputée à une faiblesse des muscles respiratoires et bulbaires conduisant à des arrêts respiratoires bien souvent fatal.

L'AS de type II, aussi dénommée forme intermédiaire ou encore amyotrophie spinale infantile chronique, se caractérise par une apparition plus tardive de la maladie et un profil clinique moins sévère que le type I. Les symptômes se manifestent dans les premières années de vie, en moyenne entre 8 et 12 mois. Ce type d'AS possède une grande variabilité de sévérité clinique. Les enfants atteints possèdent la capacité de s'asseoir de façon autonome et survivent jusqu'à l'âge de 20 ans en moyenne. Cependant ils ne peuvent marcher de façon autonome, ce qui démontre une atteinte motrice importante. La progression de la maladie est plus lente que le type I.

La troisième forme d'AS ou type III (maladie de Kugelberg-Welander), est une forme non létale et juvénile en raison de l'apparition progressive de la maladie dans les 10 premières années de vie. Les individus atteints peuvent marcher de façon autonome. Les profils cliniques hétérogènes de cette forme permettent de classer les individus en 2 groupes au regard de la précocité des difficultés motrices de la marche.

Enfin, le type IV, d'apparition plus tardive, est la forme la moins sévère de la maladie. La progression est très lente et les individus affectés par cette forme gardent leur autonomie motrice tout au long de la maladie, seules quelques difficultés motrices légères au niveau de la marche peuvent apparaître. Ce type reste

une forme rare, très différente des autres formes d'AS car elle n'est pas liée avec la région chromosomique impliquée dans les types I, II et III.

La plupart des études cliniques concluent à une perte progressive de la fonction motrice au cours du temps. Les données électromyographiques d'enfants atteints d'AS montrent une importante dénervation musculaire profonde avec un nombre diminué d'unités motrices (4;5). Les autopsies pratiquées sur des nouveau-nés atteints d'AS de type I montrent un nombre réduit de motoneurones dans la corne antérieure de la moelle épinière. Cette perte observée des motoneurones α impliquerait une augmentation de la mort neuronale via des mécanismes apoptotiques débutant vraisemblablement durant la période fœtale et se prolongeant durant la période post-natale (3-5).

Même si la recherche a réalisé des progrès importants, actuellement il n'existe aucun traitement pour empêcher la dégénérescence musculaire. Jusqu'à présent, les sujets atteints de la maladie doivent se contenter de soins non-curatifs, afin de vivre mieux avec la maladie. Des interventions d'ordre kinésithérapeutiques et orthopédiques permettent considérablement d'améliorer le quotidien mais n'empêchent en rien la progression de la maladie et l'issue fatale qui en résulte bien souvent.

1) Vers l'identification du locus génique de la maladie.

Depuis le milieu des années 1980, des efforts intensifs ont été déployés pour identifier la région chromosomique critique de la maladie. Au début des années 1990, des analyses de liaison ont permis de localiser les formes I, II et III de l'AS au chromosome 5, au niveau de la région 5q11.2-13.3 (6;7). Cette dernière est à présent identifiée comme étant le locus SMA (« Spinal Muscular Atrophy »). Cette région, instable par la présence d'un grand nombre d'éléments transposables et de séquences répétées, a rendu les travaux de cartographie difficiles (6). En effet, ce locus est assujéti à des événements fréquents de duplication et de délétion. En 1995, le gène SMN1 (« Survival of Motor Neuron ») fut identifié comme le gène causal de la maladie (6). Le clonage positionnel classique par criblage d'une librairie YAC (« Yeast Artificial Chromosome ») a permis dans un premier temps la réduction du locus génique de la maladie ainsi que l'identification du gène SMN1 comme gène causal de l'AS. Le gène SMN existe sous deux formes: les gènes SMN1 et SMN2, aussi connus respectivement sous les noms de SMN-télomérique (SMNt) et SMN-centromérique (SMNc) au regard de leur proximité du centromère. Le gène SMN2 résulte d'une duplication inversée (500 kb) de la région contenant les gènes SERF1A (« Small EDRK-Rich Factor 1A », anciennement nommé H4F5, protéine de fonction inconnue), SMN1, NAIP (« Neuronal Apoptosis Inhibitory Protein ») et p44 (facteur de transcription basal p44TFIIH).

Les gènes SMN1 et SMN2, homologues à 98 %, consistent en 9 exons (exons 1, 2a, 2b et 3 à 8) interrompus par 8 introns. Seuls les exons de 1 à 7 codent

la protéine SMN pleine-longueur constituée de 294 acides-aminés (6;8) (**Schéma 3**). Bien qu'il existe 31 polymorphismes, il n'y a que 8 différences nucléotidiques permettant de distinguer SMN1 de SMN2. C'est en particulier une différence nucléotidique C(SMN1)→T(SMN2) en position 6 de l'exon 7 qui conduit à la perte de cet exon par épissage alternatif du transcrit pré-messager (ARN^{hn}) provenant du gène SMN2 (9;10). En effet, le gène SMN1 produit majoritairement des transcrits pleine-longueur (>90%) alors que SMN2 produit principalement des transcrits dépourvus de l'exon 7 par épissage alternatif, produisant ainsi majoritairement la protéine SMN Δ 7 (**Schéma 1**). Plus précisément, il fut proposé que la transition C→T, présente au niveau du site d'épissage entraîne une déstabilisation fonctionnelle de l'amplificateur (« enhancer ») d'épissage exonique (ESE) nécessaire à l'inclusion de cet exon (11). Cependant, très récemment, il fut montré que la transition C/T n'abolit pas l'ESE mais crée plutôt un silencier (« silencer ») exonique d'épissage (ESS), excluant ainsi l'exon 7 lors de l'épissage des pré-messagers SMN2 (12). Ainsi, seulement 30% des transcrits pleine-longueur seront produits par SMN2.

La duplication de la région contenant le gène SMN1 semble s'être produite après la divergence souris-primate. Il fut démontré que le gène *Smn* de souris existe en une seule copie (13) et que cette duplication SMN1 s'est produite avant la divergence humain-chimpanzé, il y a plus de 5 millions d'années (14). En revanche, SMN2 semble être apparu après la divergence de ces 2 espèces. En effet, le chimpanzé présente 2 à 5 copies du gène SMN avec des niveaux indétectables des

messagers SMN Δ 7 (SMN2), indiquant ainsi que l'émergence de SMN2 ne s'est produite que chez Homo-sapiens (14).

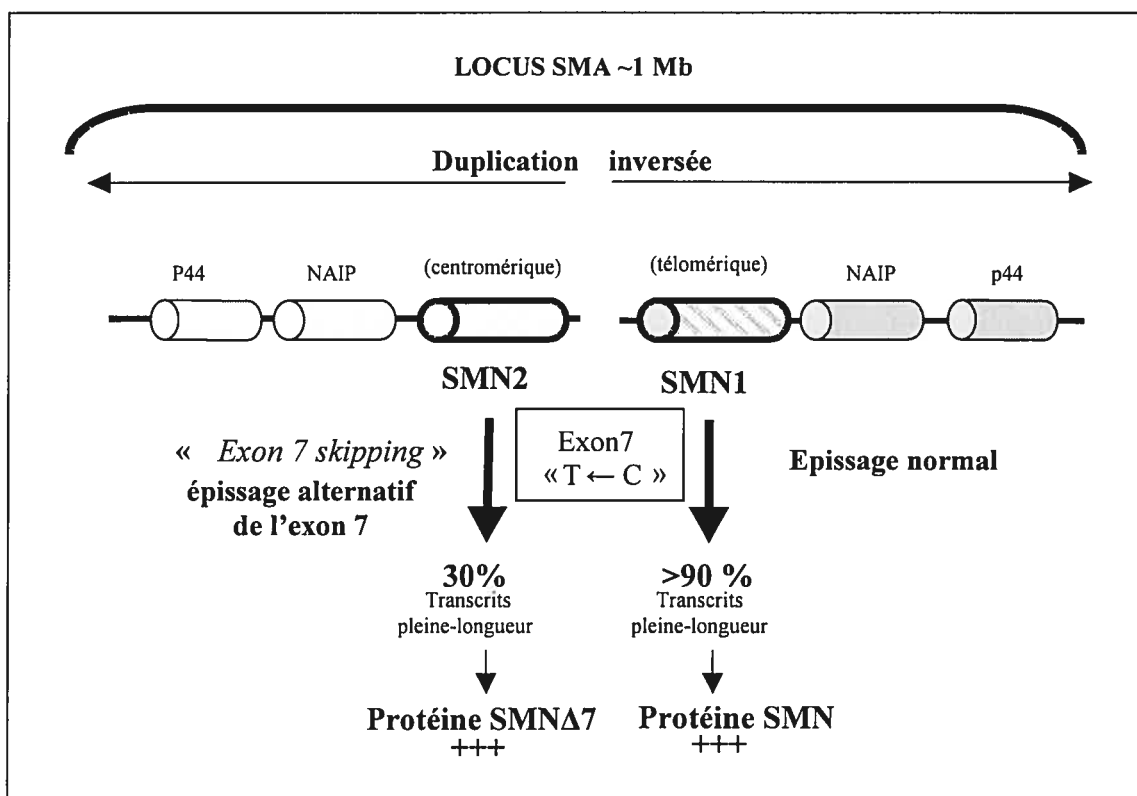


Schéma 1 :

Organisation du locus SMA .

2) Les altérations du gène SMN1 et l'amyotrophie spinale.

Lefebvre *et al.* (6) ont montré que le gène SMN1 est muté dans 93 % des enfants atteints de la forme I et l'existence d'une très faible proportion d'individus atteints ayant des mutations ponctuelles homozygotes pour SMN1. Une partie de

ces individus de sont issus de familles consanguines. Ces observations prouvent que des mutations homozygotes du gène SMN1 sont nécessaires et suffisantes pour entraîner l'apparition du phénotype clinique de la maladie (**Schéma 2**). En effet, 2% des individus atteints ne présentant pas de délétions homozygotes de SMN1, possèdent une mutation ponctuelle de SMN1 sur une allèle et une délétion/conversion génique de SMN1 en SMN2 sur l'autre allèle. Les mutations ponctuelles, résumées dans le **Tableau I**, sont souvent des mutations faux-sens ou non-sens.

Tableau I : Mutations ponctuelles retrouvées dans le gène SMN1.

Mutation ponctuelle SMN1*	Localisation	Type de mutation
Q15X	Exon 1	Non-sens ou « frameshift »
124+T	Exon 2a	
241/242+4	Exon 2b	
430Δ4	Exon 3	
472Δ5	Exon 3	
542ΔGT	Exon 4	
591ΔA	Exon 4	
618+T	Exon 4	
800+11	Exon 6	
802+11	Exon 6	
868-10Δ7	Intron 6	Épissage
921+4Δ4	Intron 7	
A2G	Exon 1	faux-sens
E134K	Exon 3	
P245L	Exon 6	
S262I	Exon 6	
Y272I	Exon 6	
T274I	Exon 6	
G275S	Exon 6	
G279C/V	Exon 7	

*Wirth *et al.* (15)

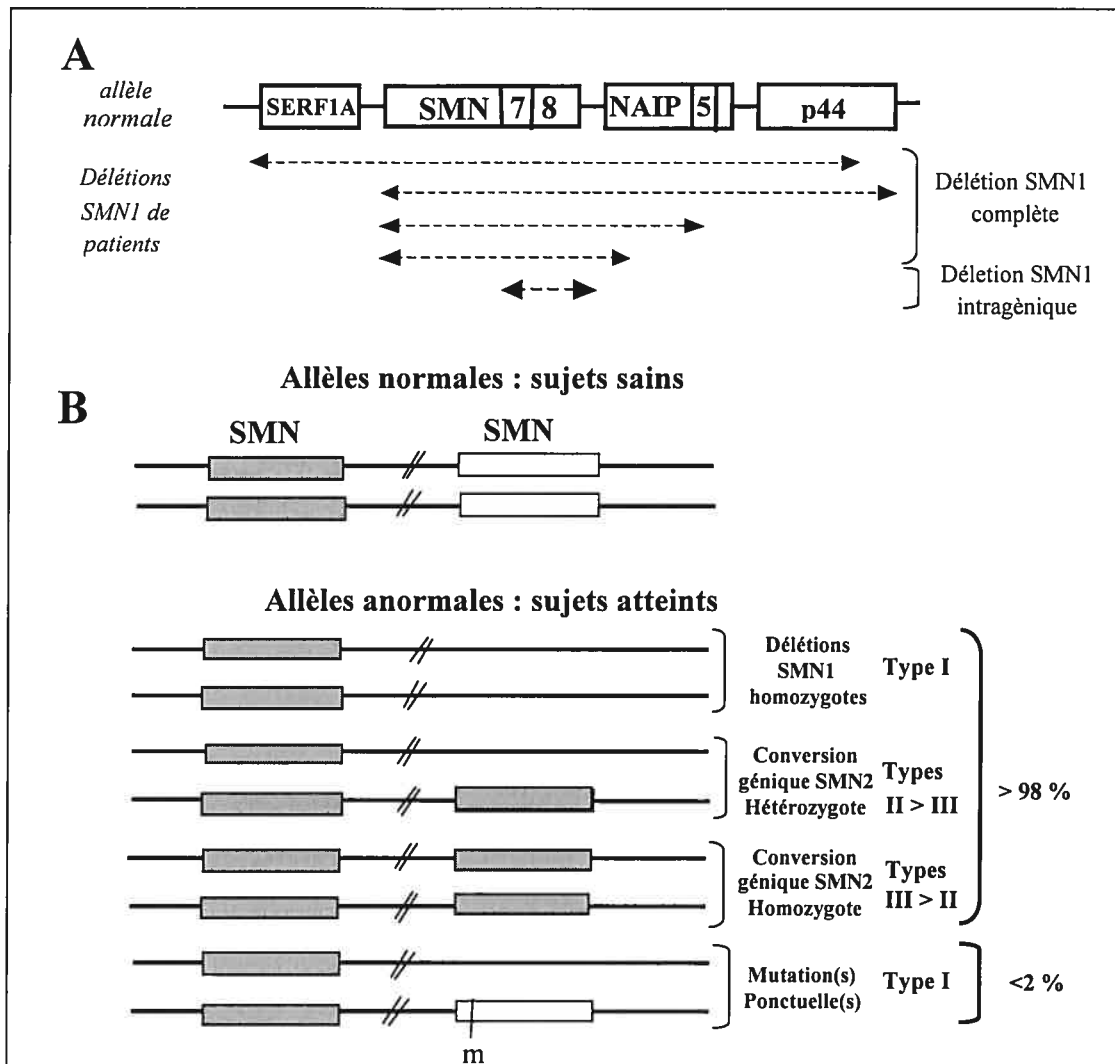


Schéma 2 :

Représentation schématique des délétions (A) et des allèles SMN1 (B) fréquemment retrouvés chez les patients atteints. (↔) représente l'étendue des délétions. (m) indique le(s) mutation(s) ponctuelle(s).

Les bases moléculaires de la maladie suggèrent un effet de dosage de la protéine SMN pleine-longueur sur le phénotype clinique de la maladie. En effet, les individus affectés par l'AS de type I ne disposent que de SMN2 en raison de l'absence homozygote (délétion/conversion génique) de SMN1 et présenteront donc une quantité importante de SMN Δ 7 comparée à la protéine SMN pleine-longueur

(Schéma 1 et 2). Cette défaillance quantitative de protéine pleine-longueur entraîne le développement de la maladie, affectant spécifiquement les motoneurones et indiquant ainsi une corrélation entre les niveaux de protéines SMN pleine-longueur et l'expression clinique de la maladie (16).

L'absence des 2 copies de l'exon 7 du gène SMN1 est bien entendu un moyen puissant et fiable pour le diagnostic de la maladie, et ceci pour plus de 98% des patients atteints de l'AS liée au chromosome 5q. Cependant, cette approche ne permet pas de diagnostiquer les sujets porteurs d'une délétion et/ou conversion génique, ainsi que les patients atteints qui possèdent une allèle SMN1 ponctuellement mutée. Des méthodes quantitatives ont été mises au point pour quantifier les gènes SMN1 et SMN2 afin de déterminer le génotype des porteurs. Ces méthodes basées sur la PCR permettent en effet l'estimation du nombre de copies SMN1 et SMN2 (ratio SMN1/SMN2), par détection de l'inclusion de l'exon 7, différenciant ainsi SMN1 de SMN2 (17). Les méthodes de PCR quantitative en temps réel s'avèrent très fiables puisqu'elles permettent le diagnostic d'individus porteurs ainsi que la prédiction de la sévérité de la maladie grâce au ratio SMN1/SMN2 (18). Ces techniques présentent l'avantage de posséder un coût et un temps de manipulation très réduits. De plus, chez les patients non délétés pour le gène SMN1, ces approches permettent d'identifier les patients potentiellement hétérozygotes pour une délétion/conversion et présentant une mutation ponctuelle sur l'autre allèle. L'identification des mutations ponctuelles est réalisée seulement sur la base de recherche.

3) Les gènes modificateurs du phénotype clinique.

Afin de comprendre comment les mutations retrouvées dans le gène SMN1 contribuent à l'hétérogénéité clinique, il est nécessaire d'établir des corrélations entre le génotype et le phénotype clinique de l'AS. En effet, l'établissement des bases moléculaires génétiques de la maladie ont rendu possible l'étude des corrélations génotype-phénotype permettant ainsi d'expliquer, en partie seulement, les formes sévères et moins sévères de l'AS.

La grande majorité des patients atteints du type I présentent des délétions plus importantes de SMN1 que les enfants présentant le type II et III (19). Ces derniers, présentent cependant des conversions géniques SMN2 affectant SMN1 (**Schéma 2**), nous indiquant ainsi que la taille des délétions et les événements de conversion génique altérant SMN1, modulent l'expression phénotypique de la maladie conduisant à des profils cliniques de sévérité variable et hétérogènes. L'ensemble de ces observations et la grande variabilité intra-familiale de sévérité d'AS, suggèrent l'existence d'un ou plusieurs loci modificateurs distincts de SMN1.

Les analyses du nombre de copies des gènes SMN chez des individus porteurs et atteints de la maladie, ont mis en évidence une association possible entre le nombre de copies SMN2 et la sévérité de la maladie (20). Campbell *et al.* (21) ont montré un nombre plus élevé de copies SMN2 chez des individus atteints du type II et du type III que chez les enfants atteints du type I. En effet, ce que ces auteurs

pensaient être des délétions de SMN1 étaient en fait, dans certains cas, des conversions géniques SMN2 démontrant ainsi que la forme de l'AS ne résulte pas toujours d'événements de délétions SMN1 mais résulterait plutôt d'évènements de conversion génique au profit de SMN2. C'est pourquoi il n'est pas rare de trouver 2 à 3 copies du gène SMN2 chez des patients atteints du type II et 3 copies ou plus chez les types III. L'ensemble de ces observations indique un effet de dosage possible de la protéine SMN pleine-longueur sur la sévérité clinique de l'AS et que le gène SMN2 est un gène modificateur du phénotype clinique de cette dernière.

L'effet de dosage de la protéine SMN pleine-longueur a été confirmé dans les modèles animaux de la maladie. L'inactivation homozygote de ce gène ($Smn^{-/-}$) est létal chez la souris (22) et l'inactivation hétérozygote ($Smn^{+/-}$) entraîne une perte importante des motoneurones durant la période post-natale. Ces souris $Smn^{+/-}$, ayant des doses réduites de protéines SMN pleine longueur, expriment un phénotype d'AS qui ressemble au type III observé chez l'humain (23). De plus, l'intégration du gène SMN2 (humain) dans les souris « Knock-out » $Smn^{-/-}$ entraîne l'apparition du phénotype clinique de la maladie et contrecarre la létalité embryonnaire observée chez les souris $Smn^{-/-}$ (24). L'ensemble des observations récoltées dans les souris modèles $Smn^{+/-}$ et $Smn^{-/-}$ -SMN2 confirment bien un effet de dosage du transcrit SMN pleine-longueur et la restauration partielle des fonctions SMN1. De plus, les souris ayant un nombre élevé de copies SMN2 ne présentent pas le phénotype clinique de la maladie. Cette compensation partielle pour les souris ayant un nombre plus faible de copies SMN2, implique que la protéine SMN Δ 7 est moins fonctionnelle que la protéine SMN.

Avant que le gène SMN1 soit déterminé comme le gène causal de l'AS, les cartes génétiques et physiques établies à partir du locus SMA ont permis de proposer 2 gènes candidats à la maladie : le gène SMN1 et NAIP (25). Le gène NAIP, à défaut d'être le gène causal de l'AS, fut proposé comme gène modificateur du phénotype clinique de la maladie, en raison d'une part de ses fréquentes délétions associées avec SMN1 (**Schéma 2A**) et son rôle dans l'inhibition de l'apoptose neuronale, pouvant ainsi contribuer, d'autre part, à la dégénérescence observée des motoneurones chez les sujets affectés de l'AS. En effet, en plus des délétions du gène SMN1, les individus affectés par l'AS de type I présentaient dans 45 % des cas des délétions homozygotes du gène NAIP au niveau de l'exon 5 et 6 (25). Par contre, 1/3 des enfants atteints par cette forme sévère, ne présentaient pas de délétion de NAIP. Il semble donc qu'il n'y ait pas de relations significatives directes entre les délétions de NAIP observées et la sévérité de la maladie. On ne peut cependant pas exclure un rôle même mineur de ce dernier, dans l'hétérogénéité clinique de la maladie. Novelli et al. (26) ont par ailleurs rapporté que la délétion de NAIP est fortement associée au phénotype sévère chez les filles. Cette corrélation n'est pas significative chez les garçons. NAIP pourrait donc jouer un rôle sur les variations phénotypiques sexe-dépendantes observées.

Malgré les corrélations avec l'âge d'apparition de la maladie et l'effet de dosage de la protéine pleine-longueur, la variabilité clinique au sein de formes similaires de l'AS, reste encore inexplicée. Les variabilités d'expression cliniques intra-familiale suggèrent l'existence de gènes modificateurs du phénotype lié ou non

au chromosome 5q. Scharf *et al.* (27), ont suggéré que le gène SERF1A, contenu dans la région SMA dupliquée, pourrait être un gène modificateur du phénotype. En effet, ces auteurs ont démontré que dans 94% des cas de type I, ce gène est partiellement délété (jusqu'à l'exon H4F5 3b) et plus faiblement délété dans le type II et III.

Dans le but de déterminer si les gènes NAIP et SERF1A sont des gènes modificateurs potentiels du phénotype clinique de l'AS, des souris modèles de la maladie et altérées au niveau de ces gènes sont nécessaires.

4) Expression du gène SMN1.

Depuis l'identification du gène SMN1, de nombreuses équipes se sont efforcées d'élucider le rôle de la protéine SMN impliquée dans la pathologie de la maladie. L'établissement de l'expression de SMN1 devraient permettre de comprendre les fonctions impliquées dans la maladie. Diverses approches ont été utilisées dans ce but, permettant de découvrir plusieurs fonctions à SMN. Les approches conventionnelles d'étude de l'expression ont permis de lui voir attribuer diverses fonctions dont celle de gène « house-keeping ».

Des études d'expression effectuées chez le rat ont montré une expression ubiquitaire de la protéine SMN avec des différences spatiales et temporelles (28). En effet, cette protéine se retrouve dans de nombreux tissus et organes tels que le pancréas, les cellules lymphoïdes, le foie, les poumons, le thymus, le muscle squelettique et dans les tissus nerveux. Des niveaux plus abondants de SMN sont

retrouvés au niveau du système nerveux central dans la moelle épinière. Ces niveaux plus élevés se retrouvent plus particulièrement dans des populations neuronales spécifiques, comme les neurones des noyaux cérébelleux profonds et les neurones moteurs de la moelle épinière. L'étude de Battaglia *et al.* (28), menée également chez le rat, a permis de mettre en évidence, une expression différentielle de la protéine SMN dans les motoneurones selon le stade du développement embryonnaire et post-natal. En effet, la faible abondance de SMN retrouvé chez l'adulte contraste fortement avec les niveaux retrouvés dans les tissus fœtaux. La Bella *et al.* (28b) ont confirmé ces observations. Ils ont d'ailleurs montré chez l'adulte que le cerveau, la moelle épinière, le muscle, le foie ainsi que le poumon présentent une importante réduction de la protéine SMN. Ces auteurs mettent en évidence notamment l'existence d'isoformes à la protéine SMN : 45 kDa, 35 kDa et 32 kDa. L'expression de ces isoformes semble régulée au cours du développement, avec des niveaux abondants durant la période embryonnaire et périnatale, suivie d'une diminution importante jusqu'au stade adulte. Les auteurs suggèrent que ces isoformes seraient issues de modifications post-traductionnelles.

Chez l'humain, outre l'établissement d'une corrélation entre la sévérité de la maladie et les niveaux de messagers SMN pleine-longueur (effet de dosage), il fut montré une expression plus importante dans les motoneurones fœtaux (6;16) comparé à l'adulte. De plus, par hybridation *in situ* et immunohistochimie, Mirabella *et al.* (29) rapportent que le taux de protéine SMN est négligeable chez les patients affectés de la forme I, et que les messagers de SMN2 ne présentent aucune différence d'abondance comparé aux individus sains. La sous-expression de la

protéine SMN n'est donc pas la conséquence d'une transcription inefficace ou différentielle. Cependant, la faible sensibilité quantitative de la technique d'hybridation *in situ* tissulaire utilisée dans leur étude ne permet pas d'exclure des différences plus faibles des messagers SMN entre les individus sains et atteints.

Les études d'expression de la protéine SMN menées chez l'humain et le rat établissent clairement que les niveaux de protéine SMN sont fortement diminués chez les individus atteints de l'AS et que ces niveaux sont régulés au cours du développement. Cependant, les mécanismes de régulation de l'expression de la protéine SMN restent encore peu connus.

5) Les fonctions de la protéine SMN.

Les approches conventionnelles d'étude d'identification des protéines interagissant avec SMN ont permis d'identifier divers partenaires à SMN et de lui attribuer des fonctions précises. Cependant, durant ces dernières années, le nombre de protéines interagissantes avec SMN n'a cessé d'augmenter, ne faisant ainsi qu'accroître la complexité de ses fonctions, dont celles impliquées dans la maladie. C'est ce rôle dans l'épissage des ARN messagers et son expression ubiquitaire qui ont permis de qualifier la fonction SMN de fonction « house-keeping ». De plus, les observations récoltées chez des sujets atteints de la maladie permettent d'établir un lien entre la formation des snRNPs et la maladie. Cependant, il reste difficile de comprendre comment un gène « house-keeping » et d'expression ubiquitaire entraîne particulièrement une dégénérescence des motoneurones α de la corne

antérieure de la moelle épinière. L'identification d'autres partenaires de SMN1 ont néanmoins permis d'éclaircir les fonctions impliquées dans la pathologie de la maladie.

Une autre façon d'étudier les fonctions cellulaires de la protéine SMN consiste à rechercher l'existence d'orthologues à la protéine SMN afin d'en déterminer les degrés de conservation de séquence et de fonctions au cours de l'évolution. Au moment de sa caractérisation, la protéine SMN ne présentait aucune homologie de séquence avec des protéines connues. Depuis, des orthologues lui furent découverts à divers degrés d'homologie chez les mammifères, le poisson zèbre, la levure et le nématode. Il semble donc exister une certaine conservation phylogénétique de cette protéine, laissant ainsi sous-entendre une conservation sur le plan fonctionnel.

5.1) La protéine SMN et ses partenaires protéiques.

Dès 1996, grâce aux travaux initiés par l'équipe du Dr Dreyfuss dans les cellules HeLa, les premiers partenaires protéiques de SMN furent identifiés, ainsi que sa localisation subcellulaire. En effet, la protéine SMN a été localisée dans des structures ponctuelles nucléaires inconnues jusqu'à cette époque. Ces structures furent désignées comme les corps *gems* « *gemi* *of* *coiled* *bodies* » en raison de leur proximité spatiale et leur similarité avec les corps de Cajal « *coiled* *bodies* » (30b). Il existe différents types de corps nucléaires, la plus connue de ces structures discrètes est le corps de Cajal. Ces corps nucléaires sont supposés être le lieu de stockage et d'assemblage de complexes fonctionnels tels que les

ribonucléoparticules « snRNP : small nuclear RiboNucleoProteins ». Les corps de Cajal et les gems sont des structures dynamiques qui s'assemblent et se désassemblent tout au long du cycle cellulaire. Les protéines SMN se retrouvent dispersées dans le noyau et dans le cytoplasme mais avec un enrichissement important dans les gems au niveau nucléaire. Ces dernières sont principalement composées de snRNPs et du complexe SMN (30) (**schéma 3B**).

L'identification des composantes structurales de la protéine SMN a permis d'élucider certaines interactions fonctionnelles. Il fut mis en évidence au niveau de l'extrémité N-terminale l'existence d'un domaine de liaison aux acides nucléiques, codé par l'exon 2 (31), ainsi qu'un domaine d'oligomérisation de la protéine SMN dans la région conservée C-terminale, indiquant que la protéine SMN est capable d'interagir avec elle-même (32). L'extrémité N-terminale de SMN est très conservée au cours de l'évolution et médie entre autres les interactions avec les protéines SIP1 (*gemin2*) (33). L'extrémité C-terminale interagit avec les protéines *gemin3* (34) et *gemin4* (35). La région centrale se compose principalement d'un domaine favorisant les interactions SMN-Sm : le domaine Tudor, en raison de son homologie avec la protéine *Tudor* de *Drosophila Melanogaster*, (36) (**Schéma 2A**). Les interactions avec les protéines Sm se font dans la région C-terminale, facilitées par le domaine Tudor.

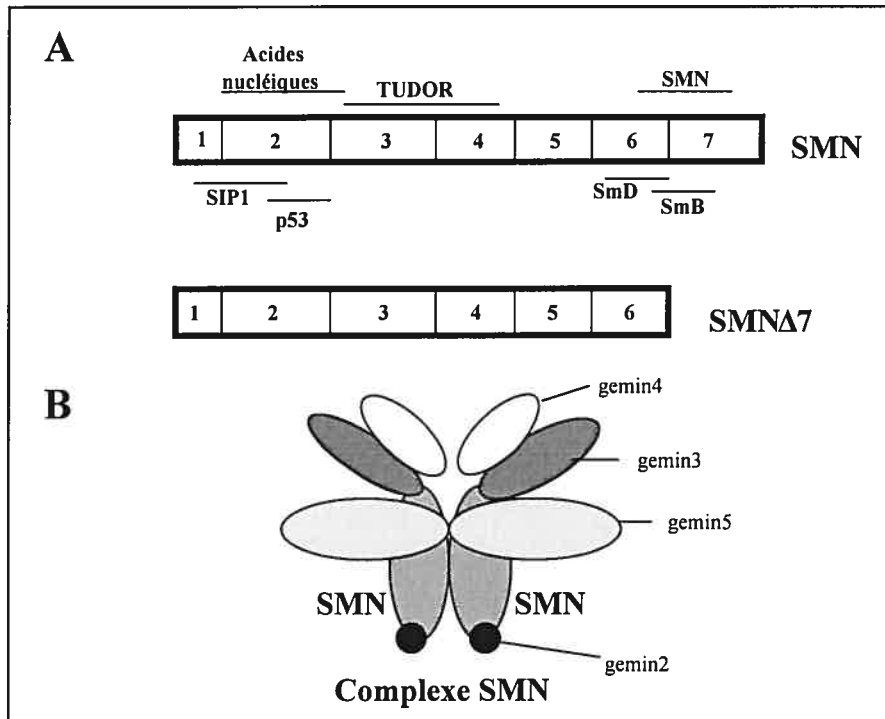


Schéma 3 :

Représentations schématiques de la protéine SMN : Les domaines SMN (A) et le complexe SMN (B).

Le complexe SMN comprend gemin2, gemin3, gemin4, gemin5, gemin6 et la protéine SMN (**Schéma 3**). Ce complexe entre en interaction avec les snRNPs, qui sont des composantes essentielles à la formation des complexes d'épissage des ARNs messagers (30). L'expression d'un mutant dominant-négatif de SMN abolit le processus d'épissage (38), ce qui suggère un rôle important de la protéine SMN dans la biogenèse des snRNPs et donc indirectement dans l'épissage des messagers cellulaires. Certaines formes mutantes de la protéine SMN, retrouvées chez des individus atteints d'AS, ne peuvent lier les snRNPs de manière fonctionnelle (39).

Il est donc clair que SMN joue un rôle important dans l'assemblage des snRNPs et plus particulièrement dans la génération des complexes splicéosomiaux actifs (complexes d'épissage). Jablonka *et al.* (40) ont d'ailleurs démontré que l'assemblage défectueux des snRNPs est corrélé avec une dégénérescence des motoneurones chez des souris transgéniques exprimant de faibles niveaux de SMN et *gemin2*.

Iwahashi *et al.* (41) ont établi que SMN semble favoriser la fonction anti-apoptotique de *bcl-2* dans les cellules HeLa. De plus, Kerr *et al.* (42) ont établi que la protéine SMN module l'apoptose neuronale en utilisant un système vectoriel du virus Sindbis afin d'exprimer divers mutant de la protéine SMN. Ils ont en effet montré que des mutations dans la région C-terminale de la protéine SMN convertissent la protéine SMN en une forme proapoptotique, et ce pour les formes protéiques mutées SMN Δ 7 et SMN (Y272I). D'autres travaux récents ont permis d'établir que SMN inhibe l'apparition de l'apoptose induite par une déprivation du milieu en NGF « Neuronal Growth Factor » dans des cellules PC12 différenciées, et ce en inhibant l'activation de la voie apoptotique mitochondriale (43). La région C-terminale de SMN est impliquée dans la fonction anti-apoptotique de SMN (44). Dernièrement Young *et al.* (44) ont caractérisé une interaction directe entre SMN et la protéine p53, médiée par l'exon 2 de SMN. Une mutation retrouvée chez certains individus atteints entraîne une inhibition de cette interaction, suggérant que les faibles niveaux de SMN augmentent la disponibilité de p53 et entraînent ainsi une apoptose des motoneurones. Il fut également montré que SMN interagit avec une ARN Hélicase (RHA), elle-même associée à l'ARN polymérase II (45). Ceci

suggère que SMN est impliquée dans la formation des transcriptosomes, structures importantes pour la transcription génique. De plus, SMN semble posséder une fonction d'activateur transcriptionnel, en raison de son interaction activatrice avec le facteur de transcription viral E2 (46). Un grand nombre de ces interactions furent colocalisées par immuno-histochimie dans les gems et les corps de Cajal. Ces structures semblent jouer un rôle central dans les processus d'épissages et transcriptionnels par la formation des complexes macromoléculaires, déterminants pour la survie et la fonction des motoneurons.

5.2) La protéine SMN et ses orthologues.

L'identification d'orthologues à SMN et de leur(s) fonction(s) permet de définir des relations structure-fonction de la protéine SMN. À l'aide d'organismes génétiquement manipulables et de la disponibilité de leur séquence génomique complète, il est possible à présent d'effectuer ce type d'analyse.

L'orthologue de *C. elegans*, CeSMN, fut identifié en 1999 (47). Ces travaux, basés sur le clonage de cDNA de CeSMN, ont permis d'établir une homologie globale de 36 % de CeSMN avec la protéine SMN. Ces travaux montrent également que l'orthologue CeSMN est impliqué au cours du développement puisque sa sous-expression (médiée par les ARNs, « siRNA ») ainsi que sa sur-expression entraîne une diminution importante de la progéniture avec apparition de divers défauts locomoteurs chez cette dernière. Ceci implique que SMN est fortement impliquée dans les processus développementaux de *C. elegans*.

De façon concomitante à l'identification de CeSMN, Hannus *et al.* (48) ainsi que Owen *et al.* (49), ont caractérisé un orthologue chez la levure *Schizosaccharomyces Pombe*, connu sous les noms de Yab8p ou smn1⁺. L'inhibition du gène orthologue par « knock-out » a permis d'établir que smn1⁺ est impliqué dans la viabilité cellulaire de la levure (49). De plus, ils mettent en évidence que le « Knock-out » de Yab8p entraîne une accumulation des messagers poly(A) dans le noyau, ce qui identifie Yab8p comme nouveau facteur d'épissage des messagers chez *S. Pombe* (48). Il est intéressant de noter qu'il n'y a pas d'homologue à SMN chez la levure *S. Cerevisiae*, probablement en raison de la non conservation des mécanismes d'épissage, ces derniers étant beaucoup plus conservés entre *S. Pombe* et les mammifères. Cette même équipe a caractérisé Yip1p, homologue de SIP1 (gemin2), qui est un partenaire connu de SMN. Ils ont démontré que Yip1p et Yab8p peuvent interagir *in vitro*, indiquant qu'il existe une conservation des partenaires protéiques inter-agissant avec SMN et ce, même avec un faible degré de conservation de séquence. D'ailleurs, Bertrand *et al.* (50) ont caractérisé l'orthologue de SMN chez *Danio rerio* (zfSMN) et mis en évidence une conservation de la propriété de liaison de SMN aux ARN messagers dans cet organisme.

Il semble donc que les fonctions de SMN soient conservées au cours de l'évolution. Les souris modèles générées jusqu'à présent ont permis de démontrer la létalité du « knock-out » Smn, ainsi que l'effet de dosage de la protéine pleine longueur et l'axonopathie résultant d'une délétion monoallélique de l'exon 7 (51). Tout cela indique clairement la grande conservation fonctionnelle de gène SMN

ainsi que des mécanismes d'expression phénotypique. La poursuite d'études de fonction dans ces organismes génétiquement manipulables devraient apporter de nouvelles informations sur les diverses fonctions de la protéine SMN.

5.3) Fonction(s) de la protéine SMN impliquée dans l'AS.

Toutes mutations ou événements conduisant à l'inhibition de la formation du complexe SMN1 entraîneraient la maladie via une mort neuronale affectant exclusivement les motoneurones. Jusqu'à présent, l'affection quasi-exclusive des motoneurones observée par une déficience de SMN reste encore incomprise. Les motoneurones appartiennent aux cellules les plus actives de notre corps. Ces cellules pourraient donc nécessiter des niveaux de protéines SMN plus importants que les autres cellules ou tissus en raison de leur grande activité métabolique et donc, être particulièrement sensible à des perturbations métaboliques des ARNs messagers. De plus, durant l'embryogenèse, et plus particulièrement au cours de leur différenciation et l'établissement de leurs connexions fonctionnelles motrices, les motoneurones sont soumis à une mort cellulaire programmée massive qui pourrait être excessive dans le contexte de la maladie. En effet, cette hypothèse corrèle fortement l'effet de dosage observé de la protéine SMN pleine-longueur avec la dégénérescence ou le déficit accru des motoneurones présenté par les souris modèles de l'AS et les individus de type I (52).

D'autres études suggèrent un rôle important de la protéine SMN dans la maturation et l'organisation terminale des axones moteurs et des jonctions

neuromusculaires. Des souris génétiquement manipulées ont permis cependant d'éclaircir l'impact de la délétion de l'exon 7 de la protéine SMN sur la physiopathologie de la maladie (51;52). Ces souris, possédant le gène *Smn* dépourvu de l'exon 7 de façon homozygote, présentent des défauts moteurs importants conduisant à une paralysie complète puis à la mort de l'animal. Ces souris montrent notamment des diminutions importantes d'innervation des muscles squelettiques (axonopathies), ainsi qu'une organisation aberrante du cytosquelette des extrémités axonales (51). De plus, Fan *et al.* (53) ont récemment mis en évidence la localisation de la protéine SMN au niveau des cônes de croissance des cellules P19. Ces observations suggèrent une fonction possible de SMN dans l'organisation du cytosquelette à l'extrémité axonale, et que cette fonction pourrait être abolie par SMN Δ 7. Il reste à définir si l'axonopathie terminale résulte de la mort des motoneurones exprimant majoritairement SMN Δ 7.

Giesemann *et al.* (54) ont montré que les motifs polyproline retrouvés chez SMN peuvent lier préférentiellement la profiline II (PFN II), protéine impliquée dans le contrôle dynamique de la polymérisation de l'actine. L'impact de cette interaction au niveau de gems avec la pathologie de la maladie reste inconnue.

Les avancées importantes réalisées ne permettent pas d'exclure une fonction neuronale spécifique de la protéine SMN autre que sa fonction « house-keeping » et anti-apoptotique. Cependant, il n'a pas été prouvé que les interactions de SMN avec ses partenaires soient impliquées de façon majeure dans la maladie et la dégénérescence des motoneurones. La maladie pourrait être causée par un effet combiné d'une dysfonction dans l'épissage des messagers et dans l'activité pro-

apoptotique de certains mutants. Il ne faut pas exclure que la pathologie de la maladie pourrait être aussi causée par un effet combiné de toutes les fonctions de SMN via l'effet de dosage de la protéine SMN pleine-longueur, combinant ainsi les effets pro-apoptotiques de SMN Δ 7 et sa dysfonction dans la connexion des unités motrices axone-muscle. Le caractère progressif de l'amyotrophie spinale reste cependant encore inexpliqué. Des études plus approfondies sur le développement et la maturation des unités motrices dans le contexte de la maladie sont nécessaires pour établir des liens entre la sévérité de la maladie et les fonctions SMN affectées chez les individus atteints.

6) Les approches thérapeutiques de la maladie.

Bien qu'il n'existe aucune thérapie de la maladie, il y a néanmoins beaucoup d'espoir pour qu'un traitement curatif de la maladie soit cliniquement disponible dans un futur proche. Un traitement efficace de la maladie devrait répondre idéalement aux critères suivants : le traitement devrait empêcher la progression de la maladie et remplacer les motoneurones perdus dans les formes les plus sévères de la maladie ainsi que restaurer les niveaux protéiques SMN dans les motoneurones. Au cours de ces dernières années, de nouvelles études ont toutefois permis d'envisager de nouvelles voies thérapeutiques de la maladie et plusieurs stratégies thérapeutiques sont actuellement à l'étude. L'utilisation d'animaux modèles de la maladie est indispensable au développement de ces stratégies. Certaines d'entre elles consistent en l'administration d'agents pharmacologiques afin de favoriser

l'expression de la protéine SMN pleine-longueur à partir du gène SMN2. Des stratégies de thérapies géniques sont aussi envisagées, afin de compenser l'absence du gène SMN1 par introduction du gène SMN1, habituellement délété. Des stratégies basées sur l'utilisation des cellules souches font également l'objet d'étude afin de contrecarrer la perte motrice progressive constatée chez les patients atteints de l'AS.

La présence de SMN2 permet d'envisager une voie thérapeutique pharmacologique sans recours à la thérapie génique et les difficultés qui y sont souvent associées. Cette approche constituerait simplement à restaurer les niveaux SMN pleine-longueur à partir de SMN2 en ciblant spécifiquement l'ESE ou l'ESS de l'exon 7 dans tout les motoneurones. Cette approche fait actuellement l'objet d'un programme de recherche de l'industrie pharmaceutique, basée sur le criblage à haut-débit d'agents pharmacologiques visant à rétablir les niveaux de protéines SMN pleine-longueur. Ce type d'approche a permis notamment d'identifier l'aclarubicine comme agent favorisant l'inclusion de l'exon 7 lorsqu'il est ajouté au milieu de culture de fibroblastes d'individus atteints d'AS de forme I (55). Cependant, l'aclarubicine est un agent chimiothérapeutique connu, de toxicité non-négligeable qui ne permet pas de l'envisager comme traitement prénatal et périnatal de l'AS. Néanmoins, d'autres recherches permirent d'identifier le butyrate de sodium et l'acide valproïque comme agents thérapeutiques possibles de la maladie (56;57). En effet, un traitement au butyrate de sodium entraîne non seulement une augmentation des messagers SMN2 mais entraîne également une augmentation des messagers pleine-longueur par la simple administration orale de ce produit à des

souris transgéniques femelles gestantes, modèles de la maladie ayant le gène SMN2 à la place du gène Smn (24). Le butyrate de sodium n'est cependant pas un traitement efficace de la maladie, car des élévations de seulement 10 % de protéines SMN pleine-longueur furent observées, accompagnées d'une très légère amélioration phénotypique de la progéniture. Il n'existe aucune information disponible concernant une amélioration motrice réelle de cette progéniture. Récemment, Brichta *et al.* (57) ont démontré que l'administration de faibles doses d'acide valproïque, agent pharmacologique anticonvulsivant couramment utilisé dans diverses formes d'épilepsie, peut lui aussi entraîner une augmentation des messagers plein-longueur issus de SMN2. En effet, ces auteurs observent une augmentation de 2 à 4 fois des messagers SMN pleine-longueur après traitement de fibroblastes de patients de type I en culture.

Très récemment, d'autres approches (58-62) basées sur la restauration des niveaux de protéine SMN pleine-longueur nous montrent, entre autre, que l'expression du gène SMN à l'aide d'un vecteur adénoviral entraîne la formation de corps nucléaires, semblables aux gems, dans les fibroblastes d'individus de type I, normalement absents ou très réduits chez ces derniers (58). Cette approche semble prometteuse sous la condition que cette restauration fonctionnelle puisse s'effectuer dans les tissus nerveux moteurs de la moelle épinière (59).

Certaines stratégies comme le remplacement des cellules motrices par des motoneurones sains font aussi l'objet d'une attention particulière. Par exemple, le remplacement de cellules satellites au niveau musculaire et le remplacement des cellules motrices font théoriquement partie des stratégies les plus efficaces car cela

permet de « reconstruire » la motricité de l'enfant atteint d'AS (63;63b). Bien que le développement de ce type de stratégies en soit encore à ses débuts, il est aujourd'hui possible de repeupler les motoneurones dégénérés par injection de cellules souches ou de progéniteurs. En effet, les cellules souches neuronales contenues dans la moelle épinière sont capables de se différencier en une grande variété de cellules neuronales et gliales dont les motoneurones. De façon semblable aux cellules souches hématopoïétiques, ces cellules souches neuronales ont la caractéristique de migrer jusqu'aux sites des lésions par la simple injection de ces cellules dans le liquide cérébro-spinal (64). De plus, ces cellules existent dans l'embryon et aussi chez l'adulte, rendant ainsi possible l'utilisation du patient ou de sa fratrie comme donneur potentiel de ces cellules. Kerr *et al.* (64) ont notamment montré que la greffe de cellules dérivées de cellules germinales embryonnaires peut améliorer la motricité chez des rats rendus paralytiques par neuropathie motrice d'origine virale (Virus Sindbis neuro-adaptés). Ces cellules souches exprimant des marqueurs neuronaux pourraient être utilisées comme traitement efficace embryonnaire ou post-natal de l'AS pour les individus déjà atteints. Bien entendu, la poursuite de ces recherches et des essais cliniques sont nécessaires afin d'évaluer exactement le potentiel thérapeutique de ce type de stratégie.

L'ensemble de ces études révèle d'une part que des agents pharmacologiques comme le butyrate de sodium et l'acide valproïque, déjà connus pour leur utilisation thérapeutique dans d'autres pathologies, sont aussi capables d'agir positivement sur l'inclusion de l'exon 7 lors de l'épissage des messagers issus du gène SMN2. De plus, leur faible toxicité et leur administration aisée (orale

ou sous cutanée) pourraient, d'autre part, permettre de les envisager comme agents thérapeutiques dans le cadre de co-traitement lors de la transplantation de cellules souches dans le but d'obtenir une amélioration phénotypique rapide de la maladie.

7) Projet de recherche.

7.1) Les promoteurs SMN et Smn.

Suite à l'identification du gène SMN, les promoteurs SMN1 et SMN2 furent caractérisés (65). La région de 3.4 kb, en amont de l'exon 1, possède seulement 12 différences nucléotidiques, permettant de les distinguer (66). Cette forte homologie de séquence entre les promoteurs SMN laisse supposer que les gènes SMN1 et SMN2 s'expriment de façon identique. Le promoteur Smn de souris a lui aussi été caractérisé (67). Ce dernier présente peu d'homologie avec les promoteurs SMN humain en dépit d'une courte région d'une centaine de paires de bases, relativement bien conservée. De plus, les promoteurs SMN humains et Smn souris possèdent deux sites d'initiation transcriptionnelle dont un site d'initiation utilisé préférentiellement par les tissus adultes (site d'initiation adulte) et un autre site utilisé principalement dans les tissus embryonnaires (site d'initiation fœtal) (68). La présence de ces deux sites d'initiation transcriptionnelle vient renforcer l'existence probable d'une régulation transcriptionnelle développementale des gènes SMN.

Germain-Desprez *et al.* (68) ont également montré que les promoteurs SMN sont régulés au cours de la différenciation « neurectodermale » des cellules embryonnaires P19 de souris. En effet, la différenciation des cellules P19 induites

par l'acide rétinoïque entraîne une répression de l'activité transcriptionnelle des promoteurs SMN1 et SMN2. De plus, ces promoteurs possèdent une régulation identique de l'activité promotrice de la région -140/+150. Jusqu'à présent, aucune expression différentielle significative entre ces deux promoteurs n'a été rapportée (66;68). Cependant, il fut toutefois observé une légère différence d'activité transcriptionnelle entre les promoteurs SMN1 et SMN2 dans les cellules EHMN (lignée immortalisée de motoneurones embryonnaires)(69). Il ne faut toutefois pas exclure une expression différentielle entre ces deux promoteurs en raison de leur localisation génomique distincte, pouvant entraîner un contexte d'expression différentiel, par exemple, via des modifications d'accessibilité de ces promoteurs aux facteurs de transcription.

Il semble également que d'autres facteurs soient aussi capables de moduler l'activité des promoteurs SMN. En effet, divers traitements comme le NMDA (69) et les interférons (70) peuvent entraîner des variations des niveaux transcriptionnels SMN1 et SMN2. Notamment, ces derniers sont augmentés par traitement aux interférons via la fixation du facteur de transcription IRF-1 sur les promoteurs SMN, conduisant ainsi à une augmentation d'activité transcriptionnelle.

7.2) Modèle de différenciation cellulaire : Le modèle P19.

La lignée P19 est une lignée cellulaire isolée par implantation d'un embryon de souris âgé de 7 jours sous la capsule testiculaire d'un adulte (71;72). Cette implantation a entraîné la formation d'une tumeur et un seul clone fut utilisé

comme clone fondateur. Cette lignée fut qualifiée de lignée teratocarcinomale embryonnaire en raison de son origine et son caractère multipotent.

Les cellules P19 ont un phénotype similaire aux cellules de l'ectoderme primitif et se répliquent sans limite apparente en culture primaire (73;74). Ces cellules expriment divers marqueurs embryonnaires précoces et présentent la particularité d'envahir et de coloniser un embryon hôte pour se joindre aux multiples lignées cellulaires de ce dernier.

Les cellules P19 présentent également l'avantage d'être induites aisément à se différencier en culture en un spectre large de types cellulaires tels que les cellules neuronales, myocardiques et myocytaires (74). En effet, les cellules P19, en présence d'acide rétinoïque, ont la particularité de se différencier en lignée neuronale. Ces cellules P19 forment des agrégats à partir desquels les cellules P19 se différencient en lignée post-mitotique NLC («Neuron-Like Cells») et GLC («Glial-Like Cells»). La lignée NLC possède les caractéristiques primaires des cellules neuronales comme de nombreux processus cytoplasmiques très semblables aux neurites et aux cônes de croissance. Ces cellules NLC sont aussi électriquement excitables. En effet, ces cellules expriment les marqueurs neuronaux propres aux lignées neuronales et présentent l'énorme avantage de posséder des phénotypes GABAergique et glutamatergique bien souvent absents dans la plupart des lignées neuronales utilisées en culture (74).

7.3) Objectifs et description .

En dépit des progrès énormes réalisés depuis l'identification du gène SMN, il reste très peu de choses connues sur la régulation de l'expression de la protéine SMN, en particulier au niveau transcriptionnel. Le projet de recherche suivant s'inscrit directement dans la continuité des travaux réalisés par Germain-Desprez *et al.* (68). L'absence de sites de liaison des récepteurs de l'acide rétinoïque sur la région promotrice -140/+150 indique que la répression des promoteurs SMN, observée dans les cellules P19, implique d'autres mécanismes que ceux exercés par ces récepteurs nucléaires. Les mécanismes régissant cette régulation restent encore inconnus, ainsi que ceux régissant l'activité promotrice basale observée dans les cellules P19 et P19 différenciées. Les implications des régions conservées entre le promoteur *Smn* de souris et SMN1 humain sur l'activité promotrice sont elles aussi non-déterminées.

Ce projet de recherche repose sur l'hypothèse d'une conservation des mécanismes responsables de l'activité promotrice SMN1 dans les cellules P19 entre l'humain et la souris. Les objectifs de ce projet de recherche visent à identifier les éléments *cis* et régulateurs *trans* nécessaires à l'activité basale du promoteur SMN et à caractériser les éléments *cis* impliqués dans la réduction d'activité promotrice observée lors de la différenciation des cellules P19 induites par l'acide rétinoïque. Notre approche analysera, en particulier, les implications des régions promotrices

conservées entre l'humain (SMN1) et la souris (Snn) afin d'établir s'il existe ou non une conservation fonctionnelle de ces régions dans l'expression de SMN1.

Dans le but de répondre à cette hypothèse et d'atteindre ces objectifs, il est nécessaire d'avoir recours à différentes méthodes. Dans un premier temps, il est important de déterminer la région promotrice minimale douée d'activité transcriptionnelle dans les cellules P19 (promoteur SMN minimal : SMN min). Puis, dans un deuxième temps, il est nécessaire de réaliser l'empreinte phylogénétique du promoteur à l'aide de l'alignement des régions promotrices SMN et Snn. La recherche d'éléments *cis* conservés se fera par interrogation de la base de donnée TRANSFAC et des logiciels comme TESS et MatInspector V2.2 afin de générer des sites de liaison de facteurs *trans*, candidats pour leur implication dans la modulation de l'activité promotrice. La sélection des facteurs candidats sera basée sur les propriétés fonctionnelles connues dans le contexte expérimental et sur le degré de conservation de l'élément *cis* impliqué. Dans un troisième temps, la caractérisation des sites de liaison candidats seront étudiés par compétition en gel retard (E.M.S.A : « Electrophoretic Mobility Shift Assay ») à l'aide de sondes non-marquées contenant le consensus candidat à tester. Enfin, pour confirmer l'implication fonctionnelle des candidats retenus, il sera introduit des mutations dans leur élément *cis*. Les effets des mutations seront visualisés par transfection transitoire du promoteur SMN minimal mutants.

Cette approche a permis de démontrer un rôle fonctionnel des régions promotrices conservées entre SMN1 et Snn dans la régulation transcriptionnelle

basale des promoteurs SMN au cours de la différenciation cellulaire. Nous avons également identifié une action mutuelle des sites conservés Ets et NFIL6 dans le maintien de l'activité promotrice basale. Cependant ce type d'approche ne tient pas compte de la présence possible d'amplificateurs (« enhancer ») ou de silencers (« silencer ») transcriptionnels introniques et exoniques localisés en amont ou en aval de l'exon1 du gène SMN1.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1) Construction gène-rapporteur luciférase des promoteurs SMN1 et Smn.

Afin de placer le gène rapporteur *luciférase* sous contrôle des promoteurs SMN et Smn, divers fragments de ces régions promotrices, amplifiés par PCR, furent insérés dans le vecteur rapporteur pGL3-basic (Promega), via un sous-clonage dans le vecteur pGem-TEasy (Promega). Ce dernier permettant le clonage direct et aisé de produits PCR grâce à ses extrémités « T » protubérantes.

Les fragments du promoteurs SMN1 correspondant aux constructions m107p156, m58p156, m107p127, m61p127, m15p127, m15p117, m61p46, m15p93 et ceux correspondants au promoteur Smn m105p125 et m46p125 ont été générés par PCR utilisant des amorces indiquées à l'**annexe 1**. Chaque produit PCR est sous-cloné dans le vecteur pGemTEasy (Promega Corp.) afin de les flanquer d'un site *EcoRI*. Ces inserts sont ensuite soumis à une digestion *EcoRI* (Invitrogen Life Technologies)) puis cloné dans le vecteur pGL3-basic au niveau du site *EcoRI* de la cassette de clonage. Le vecteur pGL3–basic a été légèrement modifié pour rajouter un site EcoRI entre les sites *BglIII* et *HindIII* de la cassette de clonage.

Les différentes constructions sont ensuite transformées dans la souche bactérienne *E. coli* DH5 α sur les recommandations du manufacturier (Invitrogen Life Technologies). La taille de l'insert est vérifiée par digestion enzymatique EcoR1 et l'orientation convenable, ainsi que la concatémérisation

possible des inserts, sont vérifiées par digestion *PstI/BstXI*. L'intégrité de la séquence promotrice est vérifiée par séquençage automatique à l'aide du séquenceur CFQ2000XL Beckman Coulter ou par séquençage manuel à l'aide du kit *Thermo-sequenase sequencing* (USB; Amersham Biosciences).

2) Culture et différenciation « neurectodermale » de la lignée P19.

Les cellules P19 (ATCC #CRL-1825), isolées d'un teratocarcinome, sont euploïdes avec un caryotype de sexe mâle normal. Ces cellules sont transférées dans des flacons de culture tissulaire T75 et T175 (Falcon) et maintenues en culture à 37°C dans un milieu minimal essentiel α -MEM ou DMEM (Wisent), supplémenté, sans antibiotique, avec 10 % (v/v) de sérum bovin fœtal (FBS, Wisent) et sous une atmosphère CO₂ 5 %. Plusieurs passages sont effectués lorsque les cellules sont confluentes, avec utilisation de 1/10^e des cellules pour le maintien en culture dans un nouveau flacon T75 ou T175.

La différenciation « neurectodermale » des cellules P19 (P19AR) est induite par 4 μ M d'acide rétinoïque (*all-trans* retinoic acid, Sigma-Aldrich Canada Ltd) selon la méthode décrite par Jones-Villeneuve et al. (73). Dans un premier temps, les cellules sont resuspendues dans milieu de culture α -MEM/FBS sur des pétris non-adhérents bactériens afin de promouvoir la formation d'agrégats durant 48 heures. Ces agrégats, dissociés mécaniquement, sont ensuite cultivés dans des flacons adhérents de culture tissulaire afin de permettre l'étalement des agrégats et de poursuivre leur différenciation durant une période de 6 jours. Après ce délai, les

cellules P19AR peuvent être récoltées pour l'extraction des protéines nucléaires ou pour les transfections transitoires.

3) Transfections transitoires des constructions prSMN1-pGL3 et prSmn-pGL3 dans les cellules P19 non-différenciées et différenciées.

Les transfections transitoires sont effectuées dans des assiettes de cultures à 12 puits par utilisation de 1.5×10^5 et 2×10^5 cellules/puits P19 et P19AR respectivement. Chaque transfections contient $0.15 \mu\text{g}$ d'ADN de vecteur pUT535, qui contient le gène β -galactosidase sous contrôle du promoteur CMV, et $0.35 \mu\text{g}$ de Vecteur pGL3 contenant les constructions promotrices SMN et Smn sauvages ou mutantes. Le Vecteur pUT535 est inclus pour normaliser l'efficacité de chaque transfection. Ces vecteurs sont dans un premier temps pré-incubés 15 minutes à température de pièce avec $1.5 \mu\text{L}$ de FuGENE 6 (Roche Diagnostics Corp.) par réaction. Dans un deuxième temps, le mélange ADN-FuGENE est additionné au milieu de culture et incubé 24 heures à 37°C . Le vecteur pGL3-promoteur, contenant le gène rapporteur luciférase sous contrôle du promoteur SV40 et le vecteur pGL3-basic dépourvue de promoteur servent de contrôles positifs et négatifs respectivement. Après chaque transfection, les cellules sont rincées avec du tampon PBS et récoltées avec un tampon de lyse (0.1 M KPO_4 , pH 7.8, 1 % de Triton X-100) et transférées dans un microtube et vortexées. Les débris cellulaires sont culottées, le surnageant est utilisé pour les essais d'activités enzymatiques β -galactosidase et luciférase. Le contenu en protéine totale est mesuré selon la

méthode de Bradford (Bio-Rad). L'activité β -galactosidase est mesurée de la façon suivante : 20 μ L/puits de lysats cellulaires sont déposés sur une assiette à 96 puits puis mélangés avec 20 μ L d'une solution d'ONPG (40 mM NaHPO₄, 60 mM Na₂HPO₄, 1 M KCl, 0.1 M MgCl₂, 50 mM β -Mercaptoethanol, 0.01 g/mL O-nitrophenyl β -D-galactopyranoside), incubée pour 30 minutes à 37°C. L'activité qui en résulte est mesurée à l'aide du luminomètre Wallac #1420. L'activité luciférase est mesurée de la façon suivante : 30 μ L de lysat cellulaire sont mélangés avec 30 μ L de solution luciférine (0.01 M tricine, 0.54 mM (MgCO₃)₄Mg(OH)₂·H₂O, 1.34 mM MgSO₄·7H₂O, 0.05 mM EDTA, 0.13 mg/mL D-Luciférine (Roche Diagnostics Corp.), 0.5 mM ATP, 0.2 mg/mL Coenzyme A, 0.5 mg/mL DTT). Les essais enzymatiques luciférase sont immédiatement mesurés au luminomètre après le mélange. L'activité *luciferase* est exprimée en Unités Relatives Luciferase (U.R.L.). Ces unités correspondent au nombre de photons émis par seconde (CSP) captés par la cellule photoréceptrice du luminomètre, à chaque essai (puits). La quantité de photons émise est directement proportionnelle à la quantité d'enzyme Luciférase présente dans l'essai, ce qui permet une mesure indirecte de l'activité promotrice des constructions prSMN1-pGL3 et prSnm-pGL3.

3.1) Analyse statistique des activités promotrice SMN1 et Snm.

L'activité promotrice de chaque construction est établie à partir d'un minimum de 2 transfections indépendantes, chacune représentée par un triplicata. Chaque construction a donc été transfectée 6 fois au minimum (N=6) dans les cellules P19 et P19AR. En raison du faible effectif de nos mesures, il n'est pas

permis d'utiliser un test paramétrique de comparaison de moyenne, l'application d'un test non-paramétrique de Wilcoxon-Mann-Whitney, plus puissant que le test de Cochran et approprié pour de petits échantillons (n_1 et $n_2 \leq 8$). Ce test, nous permet de comparer les constructions (N=6) deux à deux. L'hypothèse principale de ce test bilatéral, correspond à l'égalité des activités promotrices des constructions comparées (H_0). Notre hypothèse alternative propose une différence significative entre les deux activités promotrices comparées (induction ou répression). Ce test a été appliqué, d'une part, à la comparaison de l'activité promotrice de chaque construction humaine avec la construction prSMN1-pGL3 m107p156 au seuil de risque α de 5 %. Ce type de comparaison est également utilisé pour les constructions souris, comparées à la construction prSmn-pGL3 m1173p125. Dans un deuxième temps, ce test a été aussi appliqué à la comparaison au seuil $\alpha=0.05$ des activités promotrice des constructions mutantes avec les constructions sauvages humain ou souris (non-mutées) correspondantes.

4) Analyse *In silico* des promoteurs minimaux SMN1 et Smn : Empreinte phylogénétique du promoteur SMN1.

La réalisation de l'empreinte phylogénétique du promoteur SMN1 a nécessité dans un premier temps, l'alignement de séquences des promoteurs minimaux SMN1 avec Smn, et dans un deuxième temps, la recherche d'éléments *cis* candidats à l'aide de base de données regroupant les éléments *cis* reconnus par les facteurs de transcription.

4.1) Alignement des promoteurs minimaux SMN1 et Smn :

L'alignement des régions promotrices minimales des gène SMN1 (-15/+117; Genebank : *AF092925*) avec la région promotrice Smn (-46/+125 ;Genebank :*AF027688*) a été réalisée à l'aide du logiciel LALIGN (75) disponible gratuitement sur le réseau internet à l'adresse suivante : www.ch.embnet.org/cgi-bin/LALIGN/form.html. Les positions de la région promotrice SMN1 indiquées correspondent aux positions publiées par Germain-Desprez et al (68). Les positions de la région promotrice minimale Smn sont données par rapport à la position du site d'initiation (+1) de transcription adulte (non publiée). Les alignements globaux (sans introduction de lacunes) et locaux (avec introduction de lacunes) des promoteurs minimaux SMN1 et Smn consistent à délimiter et identifier les sous-régions promotrices minimales conservées entre l'humain et la souris. Ces 2 types d'alignements indiquent les mêmes régions conservées.

4.2) Recherche d'éléments *cis* candidats.

La présence d'éléments *cis* potentiels est détectée à l'aide des logiciels TESS (76) et MatInspector (77), en accès libre sur le réseau internet, par interrogation de la base de données TRANSFAC (78) à l'adresse suivante www.transfac.gbf.de.

Nous avons utilisé TRANSFAC pour la recherche de facteurs candidats en raison du nombre important de séquences liées par des facteurs de transcription présents dans cette base de données. Le logiciel TESS a été retenu pour l'analyse

en raison de sa meilleure sensibilité de recherche. Succinctement, TESS permet de réaliser 3 types de recherche qui correspondent à 2 types d'informations présentes dans TRANSFAC. Le premier type de recherche permet d'identifier les éléments *cis* potentiels de facteurs *trans* présents sur le promoteur par alignement de consensus (« string searching »). Un facteur *trans* donné peut avoir plusieurs séquences de reconnaissance au sein de la base TRANSFAC. Tous les éléments *cis* connus y sont ordonnés en fonction de leur taille. Les séquences sont utilisées de la plus longue à la plus courte. Cette recherche consiste donc à aligner les séquences, présentes dans la base de données, avec la région promotrice minimale SMN1 et Smn. Le deuxième type de recherche (« weight matrix searching ») est basée sur les matrices de poids modèles correspondantes à un facteur de transcription donné. Ces matrices de poids sont réalisées à partir d'alignements multiples de sites de liaison connus pour un même facteur. A chaque base de l'élément *cis* connue, une certaine valeur arbitraire lui est attribuée.

Nous avons utilisé, le troisième type de recherche, qui consiste à combiner les deux modes de recherche précédents. Ce type de recherche permet entre autre de sélectionner les éléments *cis* reconnus d'après deux paramètres dépendants de la reconnaissance de l'éléments *cis* : premièrement, le rapport de vraisemblance LLq (« Log-Likelihood ratio »), qui donne une valeur arbitraire à un alignement donné en fonction des bases alignées et de la taille de l'alignement et le deuxième paramètre donné par les matrices de poids représente la qualité de l'alignement (Qa). Un alignement parfait présente un LLq=1 et Qa=1. Ces valeurs représentent le meilleur alignement avec la meilleure reconnaissance. Ces modes de recherche

permettent d'assigner à la recherche certains seuils afin de faciliter la sélection. Nous avons fixé le maximum d'erreurs permises dans un alignement de 10 à 25 % avec un score LLq minimal de 0.5 et un taille minimum d'éléments *cis* de 6 bases. De plus, nous avons demandé de ne retenir que les alignements ayant une qualité minimum Qa de 0.6 à 0.8.

5) Analyse des éléments *cis* candidats par compétition en gel retard et immunoliation.

La méthode de gel retard (EMSA : « Electrophoretic Mobility Shift Assay ») permet de visualiser les complexes ADN-protéine formés à partir de sondes ADN double-brins marquées en présence d'extraits nucléaires. L'immunoliation ou « supershift » permet d'identifier le(s) facteur(s) *trans* lié(s) à l'ADN par liaison d'un anticorps dirigé contre ce(s) facteur(s). Cette liaison spécifique se traduit par un retard de migration important du complexe ternaire (IgG-ADN-protéine) par rapport au complexe binaire (ADN-protéine).

5.1) Design des sondes ADN double-brins utilisées pour l'analyse.

Nous avons divisé la région promotrice SMN1 minimale m15p117 en 3 sondes d'environ 50 nucléotides couvrant le région promotrice -3/+126. La dénomination, la séquence et la position des sondes marquées sont résumées dans le **Tableau II**. La séquence des sondes utilisées pour le criblage par compétition consensuelle spécifique de facteurs candidats, sont résumées dans le **Tableau III**.

Les sondes et oligonucléotides, utilisées dans cette analyse, sont synthétisées commercialement sous forme simple-brin, purifiés par HPLC en phase inverse et hybridées ensembles. L'hybridation des oligonucléotides a été effectuée en les chauffant à 90°C puis en les refroidissant lentement jusqu'à température de pièce. Les oligonucléotides consensus compétiteurs Ets-1/PEA3, Sp1, AP-1 ont été fournies commercialement (SantaCruz Biotechnology), déjà purifiés et sous forme double-brin.

Tableau II : Sondes marquées utilisées pour l'analyse en gel retard.

<u>Sondes</u>		<u>Séquence 5'→3'</u>	<u>Positions</u>
pV	S*	acgccacaaatgtgggagggcgataaccactcgtagaaagcgtgagaagt	-3/+47
	AS	acttctcacgctttctacgagtggttatcgccctcccacatttggtggcgt	
pVI	S	gcgtgagaagttactacaagcggtcctcccggccaccgtactgttccgctc	+37/+88
	AS	gagcggaacagtacggtggccgggaggaccgcttgtagtaacttctcacgc	
pVII	S	tgttccgctcccagaagccccgggcccgggaagtcgtcactcttaagaag	+78/+127
	AS	cttcttaagagtgacgacttccgcccgggcttctgggagcggaaca	
pVIIa	S	gccccgggcccgggaagtcgtcactcttaagaat	+94/+128
	AS	attcttaagagtqacgacttccgcccggggc	

*Orientation de la séquence : S= sens ; AS=anti-sens.

Tableau III : Oligonucléotides double-brins utilisés dans le criblage de candidats par compétition froide en gel retard.

<u>Oligonucléotide</u> <u>Compétiteur</u>	<u>Éléments cis</u> <u>interrogés</u>	<u>Séquence 5'→3'</u>	<u>Taille (pb)</u>
Sp1 ^{cons}	+11Sp1	attcgatcggggcgggcgagc	22
AP-1 ^{cons}	AP-1	cgcttgatgactcagccgaa	21
Ets-1/PEA3 ^{cons}	Ets	gatctcgagcaggaagtcca	21
AP-2 ^{cons}	AP-2/+58Sp1	gatcgaactgaccgcccggcccgt	26
pVIc	+78Ets	ccgtactggtccgctc	16
pVIIb	+78Ets/NFIL6-RE	Tgttccgctcccagaa	16
pVIIamut	+104Ets	gccccggggcgagagtcgctcactcttaagaat	34

Les sites consensus sont soulignés. Les bases mutées dans la sonde pVIIamut sont indiquées en italique et en gras. La séquence soulignée représente le consensus compétiteur du candidat interrogé.

5.2) Préparation des extraits nucléaires.

Afin d'isoler les extraits nucléaires des cellules P19, EHMN et P19AR, plusieurs flacons de culture T175 (Falcon) sont cultivés jusqu'à confluence (7-15 passages) puis les cellules P19 et EHMN sont récoltées. Les cellules P19AR sont récoltées trois jours après la différenciation à l'acide rétinoïque, à l'aide de la trypsine, rincées et resuspendues avec un tampon PBS-EDTA froid (4°C) puis culottées à 13000 g durant 30 secondes à température de pièce. La méthode de préparation, décrite par Schreiber *et al.* (79), s'effectue de la façon suivante : les culots cellulaires sont repris dans 400 µL de tampon A [10 mM HEPES, pH 7.9 (Sigma), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA (Sigma-Aldrich Canada Ltd), 0.1 mM EGTA (Sigma-Aldrich Canada Ltd), 0.5 mM Pefabloc©Sc (Boehringer-

Mannheim), 1.0 mM DTT (Invitrogen Life Technologies), 10 µg/mL aprotinine (Boehringer-Mannheim), 10 µg/mL pepstatine (Boehringer-Mannheim), 10 µg/mL leupeptine (Boehringer-Mannheim)] puis incubés 30 minutes sur glace. La solubilisation des protéines membranaires est effectuée par ajout de 25 µL Nonidet 40 1 % (v/v) (Fisher Scientific). Les noyaux sont ensuite culottés par centrifugation à 13000 g pendant 5 min. Le surnageant, contenant les protéines cytoplasmiques, peut être gardé ou jeté. Le culot est ensuite suspendu dans 50 µL de tampon B (20 mM HEPES, pH7.9, 400 mM NaCl, 1.0 mM EDTA, 1.0 mM EGTA, 1 mM de Pefabloc©Sc, 1.0 mM DTT, 10 µg /mL aprotinine, 10 µg/mL pepstatine, 10 µg/mL Leupeptine). Après une incubation de 4 heures à 4°C, les extraits nucléaires sont récupérés par centrifugation des lysats nucléaires à 13000 g à 4°C durant 10 minutes, puis aliquotés et conservés à -80°C. Les concentrations protéiques des extraits nucléaires sont mesurées d'après la méthode de Bradford (Bio-Rad).

5.3) EMSA (« Electrophoretic Mobility Shift Assay »): gels retards

Les sondes du promoteur SMN1 (pV; pVI; pVII et pVIIa) sont marquées à chaque extrémité à l'aide de la kinase Polynucléotide T4 (Invitrogen Life Technologies) avec le radio-isotope [$\gamma^{32}\text{P}$]dCTP (Amersham Biosciences) selon les instructions du manufacturier. La radioactivité non incorporée est éliminée à l'aide de colonnes Quick-Spin G50 (Amersham Biosciences). Les sondes ainsi nettoyées sont reprises dans un volume de 30 µL H₂O. Les EMSA sont effectuées dans un volume final de 20 µL contenant 4 µg d'extraits nucléaires, 100 fmol de sondes marquées, 3 µg de polydI-dC (Roche Diagnostics Corp.), 100 mM HEPES, pH 7.9,

5 mM EDTA, 50 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 mM DTT, Tween 20 1 % (v/v) (Fisher Scientific), 150 mM KCl (Fisher Scientific). Le mélange réactionnel radioactif est incubé 20 minutes à température ambiante en absence ou en présence de différentes quantités d'oligonucléotides compétiteurs double-brins non-marqués. Les réactions de liaison sont chargées sur un gel de polyacrylamide 0.5 x TBE, 5 % acrylamide (29 : 1) bis/acrylamide, Bio-Rad) non-dénaturant et prémigré à 5 V/cm. La résolution des complexes est effectuée par une migration à température de pièce, d'une durée de 1 h 45 min à 8 V/cm et par autoradiographie du gel séché et exposé à -80°C de 12-16 h entre 2 écrans amplificateurs de signaux.

Les essais d'immunoliasion en gel retard (« supershift ») sont effectués de la même façon excepté que 2 μL (0.4 μg) d'anticorps est ajouté après l'incubation du mélange, suivie d'une nouvelle incubation de 20 min. avant le chargement sur gel non-dénaturant. Les anticorps dirigés contre les facteurs candidats utilisés dans cette analyse, IgG-MAZ, IgG-Sp1, IgG-PEA3 et IgG-Elk-1 nous ont été fournis par Santa-Cruz Biotechnology.

6) Mutagenèses dirigées des promoteurs SMN1 et Snn.

L'effet des mutations introduites sur l'induction du gène rapporteur *luciferase* a été étudié par transfections transitoires dans les cellules P19 et P19AR. Nous avons donc généré différentes constructions mutantes des promoteurs minimaux SMN1 et Snn dans le but d'établir ou de confirmer le rôle des éléments *cis/trans* candidats. Les mutations ont été introduites par PCR à l'aide du kit

QuickChange Site-Directed Mutagenesis (Stratagene), par utilisation d'amorces ADN mutées et des constructions matrices prSMN-pGL3 m15p117 et prSmn-pGL3 m46p125, suivant les instructions du manufacturier. Brièvement, les amorces d'ADN utilisées, sens et anti-sens, sont strictement complémentaires afin de permettre une amplification complète du vecteur sauvage ou mutant dans les deux directions. Les différentes constructions mutantes simples, doubles ou triples sont amplifiées par la polymérase *pfu* Turbo® (Stratagene) suivit d'une digestion de l'ADN parental hemi-méthylé par *DpnI* (Stratagene). Les produits PCR sont ensuite transformés dans la souche bactérienne *E.coli* XL1-Blue (Stratagene) afin de ligaturer les extrémités et amplifier les vecteurs mutés. Le clones bactériens positifs sont vérifiés par séquençage (section 1.1). La dénomination, la séquence des amorces, ainsi que la construction matrice utilisée pour chaque construction mutante générée sont résumées dans le **Tableau IV**.

Tableau IV : Constructions mutantes pGL3 prSMN1-pGL3 et prSmn-pGL3.

<u>Construction mutante</u>	<u>Séquence amorce sens 5'→3'</u>	<u>Construction matrice</u>
Mutant m15p117 (humain) prSMN1-pGL3		
mut +11SpI	gccacaaatg <u>gggatt</u> gcgataaccactcgtagaaaagcg	m15p117
mut AhR	ggcgataaccactcgtagaaag <u>ttg</u> agaagtactacaagcgg	m15p117
mut +58SpI	gttactacaagcgg <u>ctcatt</u> ggccaccgtactgttccg	m15p117
mut NF-IL6	ccgtactgttcc <u>cgactt</u> gaagccccggcgcgcg	m15 p117
mut +78Ets	ggccaccgtactg <u>tctc</u> gttcccagaagccccg	m15p117
mut +104Ets	gtgacgact <u>ctc</u> gccgcc	m15p117
Mutant m46p125 (souris) prSmn-pGL3		
mut +114Ets	atgacgactctcgtcatggg	m46p125

Les bases mutées sont indiquées en gras. Les sites candidats présents sur les amorces sont soulignés.

RÉSULTATS

RÉSULTATS

1) Identification de la région promotrice minimale SMN1 et Smn. Effet de la différenciation « neurectodermale » induite par l'acide rétinoïque.

Dans le but de définir les régions minimales des promoteurs SMN1 humain et Smn de souris, nous avons réalisé diverses délétions à partir des extrémités 5' et/ou 3'. L'effet de ces délétions est mesuré par transfection transitoire des constructions prSMN1-pGL3 et prSmn-pGL3 contenant les inserts (tronqués ou non) des promoteurs correspondants dans les cellules P19 non-différenciées (P19) et P19 différenciées à l'acide rétinoïque (P19AR) (**Figure 1A**). Les délétions ont été conçues en se basant sur les régions promotrices SMN1 et Smn indiquées respectivement par Germain-Desprez *et al.* (68) et DiDonato *et al.* (67). Selon la nomenclature employée dans cette analyse, les promoteurs minimaux connus correspondent aux positions -107/+156 (m107p156) pour le promoteur humain et -1173/+141 (m1173p141) pour le promoteur de souris.

Dans un premier temps, nous avons mesuré l'activité promotrice des constructions prSMN1-pGL3 dans les cellules P19 (**Figure 1B**), ce qui nous a permis d'identifier le promoteur minimal SMN1 de 132 pb correspondant à la construction m15p117 contenant seulement le site d'initiation adulte (site +1(a), **Figure 1A**). Les délétions de 131 nucléotides en 5' et 39 nucléotides en 3' du promoteur m107p156, ne semblent avoir aucun effet sur l'activité promotrice SMN1. En effet, l'insert m15p117 ($10.8 \times 10^6 \pm 2.3$ U.R.L.) ne présente aucune

différence significative de l'activité promotrice comparée à la construction m107p156 ($13.1 \times 10^6 \pm 2.5$ U.R.L.).

Nous avons également observé une augmentation significative de l'activité promotrice SMN1 de l'insert m15p127 ($19.8 \times 10^6 \pm 3.2$ U.R.L.) comparée à celle de l'insert m15p117 ($10.8 \times 10^6 \pm 2.3$ U.R.L.). Cette augmentation modérée (~2 fois) indiquerait un effet activateur de la dizaine de nucléotides présents dans la région +117/+127 du promoteur SMN1. Des investigations plus précises sont nécessaires, car cette augmentation pourrait aussi résulter d'un artefact lié par exemple à l'effet du raccourcissement généré artificiellement par les délétions du promoteur SMN1, résultant ainsi en une légère augmentation de l'activité transcriptionnelle de la construction m15p127.

En revanche, nous avons constaté une diminution très importante (177 fois) de l'activité promotrice SMN1 de la construction m15p93 ($0.061 \times 10^6 \pm 0.016$ U.R.L.) comparé à la construction m15p117 ($10.8 \times 10^6 \pm 2.3$ U.R.L.). Ces résultats suggèrent qu'une délétion de la région +93/+117 entraîne une perte de l'activité promotrice, nous permettant de définir ainsi cette région comme fonctionnellement critique à l'activité promotrice SMN1. De la même façon, nous avons observé une abolition quasi-totale (diminution de 491 fois) de l'activité promotrice de l'insert m61p46 ($0.022 \times 10^6 \pm 0.009$ U.R.L.). L'activité promotrice de la construction m15p93 montre approximativement, une activité 3 fois plus importante que l'insert m61p46. L'ensemble de ces résultats indique d'une part que les intégrités structurales et fonctionnelles des inserts m15p93 et 61p46 du promoteur SMN1 sont

sévèrement affectées par ces délétions et d'autre part, que la région +46/+117 contient des éléments nécessaires à l'activité promotrice.

Toujours par transfections transitoires dans les cellules P19, nous avons également réduit le promoteur minimal *Smn* de souris à la région +46/-125, représentée par l'insert m46p125 (**Figure 1**). Les constructions promotrices m46p125 et m105p125 de *Smn* ont été créées afin de correspondre respectivement aux constructions m61p127 et m107p127 du promoteur *SMN1*. Aucune différence significative d'activité promotrice n'est observée entre les constructions m105p125 ($6.47 \times 10^6 \pm 0.53$ U.R.L.) et m46p125 ($5.7 \times 10^6 \pm 0.55$ U.R.L.). Toutefois, nous avons constaté une augmentation significative de l'activité promotrice *Smn* des inserts m105p125 et m46p125 comparée à l'insert m1173p141 ($3.6 \times 10^6 \pm 0.21$ U.R.L.). Il n'est pas étonnant de constater un effet de ces délétions, tenant compte du fait qu'une région importante, d'environ 1 Kb, a été délétée en 5' du promoteur de souris. Cette grande région pourrait contenir des éléments *cis* réprimant l'activité promotrice.

Afin de déterminer l'effet de la différenciation cellulaire provoquée par l'acide rétinoïque (AR) sur les promoteurs minimaux *SMN1* et *Smn* dans les cellules P19, nous avons mesuré l'activité promotrice des constructions pr*SMN1*-pGL3 et pr*Smn*-pGL3 dans les cellules P19AR. En effet, les promoteurs minimaux *Smn* m46p125 ($1.06 \times 10^6 \pm 0.06$ U.R.L.) et *SMN1* m15p117 ($1.1 \times 10^6 \pm 0.15$ U.R.L.) arborent des activités promotrices diminuées respectivement de 5 à 10 fois, dans les cellules P19AR, par rapport à celles observées dans les cellules P19 ($5.7 \times 10^6 \pm 0.55$ U.R.L. et $10.8 \times 10^6 \pm 2.3$ U.R.L.) respectivement; (**Figure 1C**). Toutes

les constructions SMN1 et Snn arborent des profils d'activités transcriptionnelles très semblables à ceux obtenus dans les cellules P19 mais sensiblement diminués de 5 et 10 fois. (données non montrées). La différenciation cellulaire exerce donc un effet répresseur sur l'activité basale des promoteurs SMN1 et Snn, ce qui est conforme aux données rapportées par Germain-Desprez *et al.* (68). De plus, le promoteur SMN1 est plus sensible à cette répression que le promoteur Snn de souris. Tenant compte que nous avons également constaté une diminution critique de l'activité transcriptionnelle SMN1 des vecteurs m61p46 et m15p93, tout les éléments *cis*, nécessaires à l'activité basale et à la régulation différentielle observées au cours de la différenciation cellulaire, sont inclus dans les régions promotrices SMN -15/+117 et Snn -46/+125.

2) Empreinte phylogénétique du promoteur SMN1 et éléments cis candidats sélectionnés :

L'identification des régions promotrices minimales douées d'activités SMN1 et Snn nous a conduit à rechercher les éléments *cis* modulant les activités de ces promoteurs dans les cellules P19 et P19AR. Dans cet objectif, nous avons réalisé l'empreinte phylogénétique par divers alignements des régions promotrices SMN1 et Snn, ainsi que par interrogation de la base de données TRANSFAC à l'aide du logiciel de recherche TESS, qui regroupe les séquences de liaison de facteurs de transcription connus. Cette approche nous a permis d'identifier les régions conservées entre le promoteur humain et souris, ainsi que de déterminer les éléments *cis* conservés entre ces promoteurs.

Premièrement, nous avons réalisé un alignement global et local de la région de 1.4 Kb en amont de l'exon 1 des gènes SMN1 et Snn. Pour l'alignement global, qui consiste à aligner, de façon optimale, la séquence promotrice SMN1 avec le promoteur Snn sans création de lacunes (« gap »), nous avons fixé comme contrainte un alignement obligatoire des bases des deux premiers triplets codant de l'exon 1 (données non montrées). Cet alignement global fait apparaître les mêmes régions conservées que l'alignement local (alignement optimal avec introduction de « gap ») des promoteurs minimaux SMN1 m15p117 et Snn m46p125 (**Figure 2A**). Ces alignements global et local indiquent respectivement 27 % et 71.2 % d'identité de séquence. Ils montrent l'existence de 4 régions conservées dans le promoteur SMN1 que nous avons dénommé les régions RC1 (+7/+15), RC2 (+33/+43), RC3 (+59/+98) et RC4 (+105/+116).

Deuxièmement, suite à la recherche des éléments *cis* reconnus par la base de données TRANSFAC sur les promoteurs SMN1 m15p117 et Snn m46p125, nous avons retenu les éléments *cis* +11Sp1-like (+11/+17), AhR (+37/+41), +58Sp1-like (+58/+65), +78Ets (+78/+84), NFIL6-RE (+84/+94), AP-2 (+94/+101) et +104Ets (+104/+112), comme candidats pouvant être impliqués dans la régulation de l'activité transcriptionnelle du promoteur SMN1 (**Figure 2B**). Ces éléments *cis* sont conservés entre les 2 espèces et relativement bien reconnus par TRANSFAC. Plusieurs facteurs de transcription peuvent lier les mêmes éléments *cis*, selon leur degré de spécificité de liaison à l'ADN. Le grand nombre de facteurs de transcription pouvant théoriquement lier le promoteur SMN1, donné par cette

approche, soulève des problèmes d'interprétation et de significativité biologique des éléments *cis* présents sur le promoteur. Néanmoins, les éléments *cis* candidats retenus, en raison de leur conservation et de leurs caractéristiques fonctionnelles rapportées par la littérature, ont tous été testés pour leur implication dans la modulation transcriptionnelle de SMN1 par mutagenèse dirigée et/ou par gel retard.

3) Identification et caractérisation des éléments *cis* candidats à la régulation du promoteur SMN1.

Dans l'objectif de déterminer les facteurs de transcription pouvant lier les éléments *cis* conservés candidats du promoteur SMN1 minimal m15p117, nous avons dans un premier temps, visualisé par gel retard les facteurs de transcription pouvant lier ce promoteur et testé, par compétition en gel retard, la liaison des facteurs de transcription candidats. Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'implication de ces éléments *cis* conservés sur l'activité transcriptionnelle de SMN1 par introduction de mutations sur ces derniers, seules ou en combinaison. Les mutations introduites sont connues pour abolir la liaison du facteur de transcription candidat sur son site.

Pour l'analyse par compétition en gel retard, nous avons divisé le promoteur SMN1 minimal en 4 sondes : les sondes pV, pVI, pVII et pVIIa (**Figure 3A et 4A**), puis effectué un gel retard de chacune d'elles avec des extraits nucléaires des cellules P19 et P19AR. La sonde pV (**Figure 3A**) a permis l'interrogation des sites +11Sp1 et AhR; la sonde pVI, l'interrogation des sites +58Sp1 et +78Ets.

L'utilisation des sondes pVII et pVIIa (**Figure 4A**) a rendu possible l'interrogation des sites +78Ets, NFIL6 RE, AP-2 et +104Ets.

3.1) Liaison du facteur de transcription Sp1 au promoteur SMN1.

Nous avons testé le site +11Sp1-like conservé, localisé au niveau de la région RC1, pour son habilité à lier les facteurs de transcription candidats par gel retard et immunoliasion. Le site +11Sp1-like (+11 3'GGGAGGG 5' +17) peut théoriquement être reconnu par les facteurs de transcription Sp1 et MAZ. Ces derniers peuvent se lier à l'ADN sur des consensus très voisins comme les séquences consensus GC riches (GC box) habituellement liées par Sp1.

Le gel retard de la sonde pV (**Figure 3B**) nous montre l'existence de 3 complexes spécifiques, disparus de façon efficace par compétition à l'aide de la sonde pV et la sonde consensus Sp1 non marquée. Nous pouvons constater que le complexe supérieur, beaucoup plus intense que les 2 autres complexes, est très efficacement déplacé par l'anticorps anti-Sp1 (« supershift ») et disparaît avec un excès de 10 fois seulement de sondes consensus Sp1 non marquées. Ceci suggère donc que le complexe supérieur contient le facteur Sp1 (coSp1). En revanche, l'anticorps ne déplace pas les autres complexes, ce qui indique qu'ils ne contiennent pas le facteur Sp1 bien que la disparition du complexe intermédiaire soit efficace avec excès de 50 fois, et de 200 fois de la sonde consensus Sp1 non marquée, pour le complexe inférieur. En revanche, ces complexes pourraient contenir le facteur Sp1 ayant son antigène inaccessible à l'anticorps. Les gels retards de la sonde pV

nous montrent aussi aucune différence de complexes (**Figure 3B**, piste 2 et 6) entre les cellules P19 et P19AR

Enfin, nous avons testé l'habilité du site +11Sp1 à lier le facteur MAZ uniquement par « supershift ». L'anticorps dirigé contre MAZ ne semble pas déplacer les complexes spécifiques observés dans les cellules P19 (**Figure 3B**, piste 11) et P19AR (données non montrées). En résumé, les observations fournies par le gel retard de la sonde pV nous permettent donc d'exclure MAZ comme facteur liant le promoteur SMN1 m15p117 et d'identifier la liaison du facteur Sp1 dans les cellules P19.

Dans un deuxième temps, nous avons testé l'habilité du site +11Sp1 à réguler l'activité promotrice SMN1 en créant le mutant m15p117 mut+11Sp1 qui porte 2 mutations ponctuelles introduites au site +11Sp1-like (5'GGGAGGG3'→GGGATTG; **Figure 5**). Ces mutations abolissent la liaison des facteurs MAZ et Sp1 sur ces éléments *cis* (80). Singulièrement, les mutations dans la construction mut+11Sp1 n'ont aucun effet sur l'activité promotrice de SMN1 dans les cellules P19 et P19AR (**Figure 6**). En effet, les activités promotrices des inserts m15p117 sauvage et m15p117 mut+11Sp1 ($12.5 \times 10^6 \pm 0.55$ U.R.L. et $11.0 \times 10^6 \pm 5.0$ U.R.L. respectivement) ne sont pas significativement différentes dans les cellules P19 et P19AR ($1.17 \times 10^6 \pm 0.15$ U.R.L. et $1.1 \times 10^6 \pm 0.10$ U.R.L. respectivement), nous indiquant ainsi que les mutations introduites au site +11Sp1, n'ont pas d'effet sur les activités promotrices SMN1 dans les cellules P19 et P19AR, malgré la fixation observée du facteur Sp1.

De la même façon, nous avons analysé l'habilité du site inversé +58Sp1-like à moduler l'activité promotrice SMN1. Les mutations que nous avons introduites (5' TCCTCCCGGC 3' → TCCTATTGGC; **Figure 5**) sont connues pour abolir la liaison des facteurs Sp1 et AP-2 (81) (**Figure 2B** et **Figure 5**). Le résultat de transfections transitoires de la construction prSMN1-pGL3 m15p117 mut+58Sp1 ($2.92 \times 10^6 \pm 0.029$ U.R.L.) dans les cellules P19 nous montre une diminution significative ($\alpha=0.05$) d'approximativement 3 fois de l'activité promotrice comparée à l'insert m15p117 non muté ($8.31 \times 10^6 \pm 0.55$ U.R.L.). Étonnamment, dans les cellules P19AR, les mutations de ce site n'ont pas d'effet significatif sur l'activité promotrice SMN1 ($0.86 \times 10^6 \pm 0.19$ U.R.L. mut+58Sp1 vs $1.17 \times 10^6 \pm 0.15$ U.R.L. sauvage). Ces résultats établissent d'une part, que le site +58Sp1 est impliqué dans l'activité basale du promoteur SMN1 dans les cellules P19 et d'autre part, de l'absence de cette fonction régulatrice dans les cellules P19AR. Nous avons tenté d'identifier le facteur lié au site +58Sp1. Ce dernier peut lier potentiellement plusieurs facteurs de transcription tels que Sp1, MAZ, H4TF2, AP2 et ADR1. Selon l'analyse *in silico*, les facteurs Sp1, ADR1 et H4TF2 possèdent la plus forte reconnaissance. Nos investigations par compétition en gel retard de la sonde pVI marquée n'ont pas permis de démontrer clairement la participation du facteur Sp1 en raison de problèmes de résolution de complexes qui sont probablement dus à des affinités faibles, accompagnées de dissociations possibles au cours de la migration. Néanmoins, le criblage de la sonde pVI marquée fait apparaître un complexe inférieur intense, qui pourrait être formé de plusieurs complexes, accompagné d'un complexe supérieur très faible (**Annexe 2**). La compétition de la sonde consensus

Sp1 non marquée indique une compétition nette du complexe majeur inférieur avec l'apparition d'un autre complexe (piste 5). Cependant, l'anticorps anti-Sp1 ne semble déplacer aucun des complexes (piste 7) et la compétition avec la sonde consensus AP-2 est négative (malgré la disparition d'un complexe binaire sûrement lié au site consensus porté par la sonde consensus AP-2), suggérant ainsi que ces facteurs pourraient ne pas être liés au site +58Sp1-like. Nous ne pouvons pas exclure une liaison possible des facteurs MAZ et Sp1 sur ce site. La difficulté d'interprétation de ces observations ainsi que la spécificité relative de notre approche *in silico* nécessitent des investigations fonctionnelles supplémentaires.

3.2) L'élément cis +104Ets module l'activité promotrice basale SMN1 et présente une conservation fonctionnelle.

Nous avons analysé l'habilité des élément *cis* conservés +78Ets (+78 5'TGTTCCGC 3' +105) et +104Ets (+104 5'GCGGAAGT 3' +111) à lier des facteurs de transcription par gel retard avec les sondes marquées pVII et pVIIa (**Figure 4**). L'analyse *in silico* nous indique que les éléments +78Ets et +104Ets, situés sur les régions conservées RC3 et RC4 respectivement, reconnaissent fortement les facteurs de la famille Ets tels que PEA3 et Ets-1 et de façon moins spécifique Elk-1, GABP(NRF2) et PU.1 (**Figure 2B**). En effet, les facteurs de la famille Ets reconnaissent tous le consensus 5'NGGAAN 3', suffisant à lui seul pour induire leur fixation à l'ADN.

Le gel retard de la sonde pVII (**Figure 4B**) nous montre 3 complexes binaires ADN-protéine. Ces complexes spécifiques, démontré par compétition avec

la sonde pVII non marquée (pistes 3, 4 et 5), sont également tous dissociés par compétition avec la sonde pVIIa non marquée (pistes 7 et 8), ce qui suggère que tous ces complexes sont formés à partir de la séquence de la sonde pVIIa, qui contient l'élément +104Ets. Il ne semble pas exister de différences de complexes entre les extraits nucléaires P19 et P19AR. Par contre, avec les extraits P19AR, nous pouvons noter une apparition de complexes binaires intermédiaires atténués, avec une disparition du complexe le plus inférieur, présent dans les cellules P19 (**Figure 4B**, piste 15 vs 17, 18 et 19).

Les compétitions en gel retard de la sonde pVII nous ont cependant permis d'identifier le complexe le plus intense (coEts), comme étant le complexe contenant un ou plusieurs facteurs de la famille Ets. En effet, le complexe binaire ADN-proteine coEts entre efficacement en compétition avec la sonde consensus PEA3/Ets-1 connue pour fixer préférentiellement, *in vitro*, les facteurs PEA3 et Ets-1 (piste 13 et 14). Par contre, cette compétition n'indique pas forcément la fixation de PEA3 ou de Ets-1 en raison de la faible spécificité de reconnaissance de la séquence consensus Ets pour un facteur Ets donné (82). Ainsi, la sonde utilisée peut donc être reconnue par de nombreux facteurs de la famille Ets. Afin de confirmer que le site +104Ets est impliqué dans cette reconnaissance, nous avons réalisé une compétition de la sonde pVII avec la sonde pVIIa mutée (pVIIamut) au niveau de ce site. Les mutations introduites au niveau de ce dernier (5'CGGAAGTC 3'→CGAGATC) ont été rapportées abolir la liaison des facteurs Ets sur leur éléments consensus (83). La sonde pVIIamut non marquée se montre incapable d'entraîner la disparition des 3 complexes de la sonde pVII (**Figure 4B**, piste 9)

avec un excès de 100 fois, ce qui nous indique que les complexes observés sont formés par l'intermédiaire du site +104Ets. La compétition avec la sonde pVIIb non marquée entraîne une disparition du complexe le plus inférieur et du complexe supérieur avec une atténuation très modérée de l'intensité du complexe coEts (piste 11 et 12). Ce complexe inférieur pourrait être formé par la présence du site +78Ets d'orientation inversée (+78 5'TGTTCCGC 3' +105) sur la sonde pVII, expliquant ainsi la positivité de la compétition des 3 complexes par la sonde pVIIa non marquée. En effet, la sonde pVIIb, ayant les sites conservés +78Ets et NFIL6 RE, pourrait lier le(s) facteur(s) Ets fixé(s) au site +104Ets avec une affinité moindre, mais suffisante pour une compétition efficace des complexes inférieurs. Afin de tester cette hypothèse, à savoir si le complexe inférieur est lié à une interaction entre le site +78Ets et un facteur Ets, la compétition avec la sonde pVIc non marquée devrait entraîner la disparition du complexe inférieur. Nos résultats indiquent que cette compétition est négative (piste 10), suggérant ainsi la non participation du site +78Ets aux compétitions observées avec la sonde pVIIb. En revanche, la présence de l'élément de réponse NFIL6 (NFIL6 RE, +84 5'GCTCCCAGAAG 3' +94) adjacent au site +78Ets sur la sonde pVII est un bon candidat pour la formation du complexe inférieur. Néanmoins, la méthode de gel retard utilisée, ne nous permet qu'une analyse qualitative, compliquée par les conditions de résolution non-dénaturantes des complexes rendant ainsi les interprétations plus difficiles. Bien entendu, des analyses plus approfondies sont nécessaires afin de déterminer la véracité de ce modèle.

Le gel retard de la sonde pVIIa marquée (**Figure 4C**) nous indique la formation de 3 complexes spécifiques (piste 2 et 3), toujours présents par compétition avec la sonde pVIIa non marquée, nous suggérant ainsi que tous ces complexes sont formés par l'intermédiaire du site +104Ets. Ces données confirment ainsi les résultats obtenus avec la sonde pVII. On retrouve la présence du complexe coEts (piste 10) identifié au niveau du complexe supérieur, accompagné de complexes intermédiaires et inférieurs disparaissant avec des excès plus importants de sondes consensus PEA3/Ets-1 (données non montrées). Nous avons tenté d'identifier le facteur Ets lié au site +104Ets par « supershift » sur la sonde pVII à l'aide d'anticorps dirigés contre les facteurs PEA3 et Elk-1. (données non montrées, **Annexe 3**). Aucun « supershift » n'a pu être observé, excluant possiblement l'implication de ces facteurs Ets candidats à lier le promoteur SMN1 au site +104Ets.

Dans le but de confirmer les résultats du gel retard, nous avons introduit des mutations dans la construction sauvage m15p117, au niveau du consensus Ets des sites Ets +78Ets et +104Ets, identiques à celles introduites au niveau du consensus de la sonde pVIIamut (**Figure 5**). Les activités des constructions prSMN1-pGL3 m15p117 mut+78Ets, mut+104Ets et mut+78Ets/mut+104Ets confirment un rôle critique du site +104Ets et excluent une participation éventuelle du site +78Ets dans l'activité promotrice du promoteur SMN1 (**Figure 6**). En effet, dans les cellules P19 et P19AR, l'insert m15p117 mut+78Ets ($10.39 \times 10^6 \pm 0.5$ U.R.L. et $1.10 \times 10^6 \pm 0.37$ U.R.L., respectivement) ne montre aucune différence significative avec la construction m15p117 non mutée ($8.31 \times 10^6 \pm 0.5$ U.R.L. et $1.17 \times 10^6 \pm 0.15$

U.R.L., respectivement). Par contre, l'activité promotrice de l'insert m15p117 mut+104Ets dans les cellules P19 et P19AR ($3.33 \times 10^6 \pm 0.18$ U.R.L. et $0.5 \times 10^6 \pm 0.15$ U.R.L., respectivement) indique une diminution significative de 2 fois ($\alpha=0.05$). Le double mutant m15p117 mut+78Ets/+104Ets exhibe une activité promotrice très semblable à l'insert m15p117 mut+104Ets dans les cellules P19 et P19AR ($2.9 \times 10^6 \pm 0.14$ U.R.L. et $3.3 \times 10^6 \pm 0.18$ U.R.L. respectivement), suggérant que cette activité est affectée uniquement par la mutation présente au site +104Ets muté. Le site +104Ets semble donc être critique pour l'activité promotrice basale SMN1 et l'activité transcriptionnelle, presque négligeable de l'insert m15p93 ayant la région RC4 délétée, confirme l'implication importante de cette région, contenant le site +104Ets, dans l'activité promotrice SMN1.

Pour déterminer si le site +104Ets du promoteur SMN1 est fonctionnellement conservé, nous avons introduit la même mutation au niveau du site Ets conservé (+114Ets) du promoteur Smn de souris (**Figure 7A**). Comme attendu, la construction m46p125 mut+114Ets ($2.36 \times 10^6 \pm 0.01$ U.R.L et $0.39 \times 10^6 \pm 0.03$ U.R.L) montre une diminution de l'activité de plus de 2 fois, comparée à la construction m46p125 non mutée ($5.35 \times 10^6 \pm 0.006$ U.R.L et $1.1 \times 10^6 \pm 0.01$ U.R.L) dans les cellules P19 et P19AR respectivement (**Figure 7B et 7C**), confirmant ainsi une conservation fonctionnelle entre l'humain et la souris de ce site de liaison.

Cependant, l'abolition de la liaison du facteur Ets aux sites +104Ets et +114Ets des promoteurs SMN1 et Smn respectivement, ne supprime pas complètement l'activité promotrice de ces derniers ce qui traduit la participation

d'autres éléments *cis* à leur régulation transcriptionnelle basale dans les cellules P19 et P19AR.

3.3) Action mutuelle des sites NFIL6 RE et +104Ets dans l'activité basale du promoteur SMN1 et exclusion du site candidat AhR.

Toujours dans l'objectif d'identifier les autres éléments *cis* régulant l'activité du promoteur SMN1, nous avons testé le rôle des sites conservés AhR et NFIL6 RE seulement par transfections transitoires à l'aide des constructions mutantes m15p117.

Dans un premier temps, nous avons testé le site conservé AhR (« Aromatic Hydrocarbon Receptor »), récepteur nucléaire aux aromatiques polycycliques tels que la dioxine (+37 5'GCGTG 3' +41). Nous avons retenu cet élément *cis* comme candidat en raison de l'effet de l'acide rétinoïque sur son expression et de son activité de liaison aux rétinoïdes permettant ainsi son activation (84;85). Ce site, présent au niveau de la région conservée RC2, a été fonctionnellement testé par introduction de mutations (5'GCGTG 3' → *GTTTG*) connues pour supprimer la fixation de AhR (**Figure 5**), (86). Dans les cellules P19, la construction m15p117 mutAhR n'a aucun effet sur l'activité promotrice SMN1 ($8.9 \times 10^6 \pm 0.42$ U.R.L.) comparée à la construction sauvage m15p117 ($8.31 \times 10^6 \pm 0.5$ U.R.L.). Ce même résultat a été observé dans les cellules P19AR. Cette activité inchangée exclut donc le site AhR dans le contrôle transcriptionnel du promoteur SMN1 dans les cellules P19 et P19AR.

Les résultats de l'analyse en gel retard de la sonde pVII nous ont conduit à interroger le site NFIL6 RE, présent sur la région conservé RC3 (**Figure 4**). Là encore, notre recherche *in silico* a indiqué plusieurs facteurs pouvant lier cet élément tels que C/EBP β , AP-2 et le facteur GAGA. Nous avons introduit des mutations pouvant abolir potentiellement la liaison de ces facteurs sur l'élément de réponse à l'interleukine 6 (**Figure 5**), (87;88). Les mutations introduites (5'GCTCCCAGAAG 3'→GCGACTTGAAG) sur ce site montrent dans les cellules P19 une perte d'activité transcriptionnelle de 13 fois, (m15p117 mutNFIL6 : $0.63 \times 10^6 \pm 0.036$ U.R.L.), comparée à la construction m15p117 ($8.31 \times 10^6 \pm 0.55$ U.R.L.) non mutée (**Figure 6A**). Une diminution de 7 fois seulement (mutNFIL6 : $0.178 \times 10^6 \pm 0.039$ U.R.L vs sauvage : $1.17 \times 10^6 \pm 0.15$ U.R.L) est observée dans les cellules P19AR. Ces pertes importantes d'activité suggèrent que la liaison au site NFIL6 RE d'un facteur de transcription, non encore identifié, est nécessaire à l'activité basale du promoteur SMN1 dans les cellules P19 et P19AR.

Ces observations, en conjonction avec l'implication fonctionnelle du site +104Ets, nous amènent à nous demander si ces 2 éléments entraînent de façon conjointe la transactivation basale du promoteur SMN1. Dans ce but, nous avons réalisé la construction prSMN1 m15p117 mutNFIL6/mut+104Ets. Ce double mutant montre une abolition quasi-totale de l'activité transcriptionnelle dans les cellules P19 et P19AR ($0.122 \times 10^6 \pm 0.014$ U.R.L. et $0.050 \times 10^6 \pm 0.015$ U.R.L. respectivement) comparée à celle de l'insert m15p117 non muté, ce qui détermine un rôle crucial de ces sites dans l'activité promotrice SMN1 (**Figure 6**). Cette construction nous révèle donc un effet additionnel de ces 2 sites dans l'activité

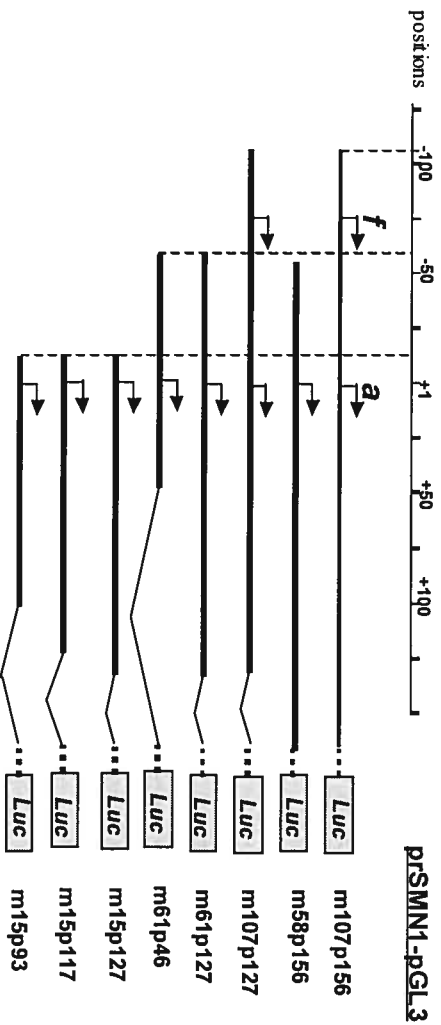
basale de l'insert m15p117 non-muté dans les cellules P19 et P19AR. Ces résultats indiquent que l'activité restante de l'insert m15p117 mut+104Ets pourrait être imputée à l'élément NFIL6 intact. De plus, l'élément conservé NFIL6 RE muté semble posséder un effet plus critique sur l'activité promotrice que le site +104Ets muté.

Cet effet additionnel, et éventuellement synergique, pourrait éventuellement favoriser l'initiation de la transcription de SMN1 sans être primordiale lorsque la liaison du facteur Ets au site +104 Ets est abolie. Les données rapportées dans cette étude permettent d'envisager un modèle mécanistique préliminaire de l'activité promotrice basale SMN1 dans les cellules P19 (**Schéma 4** p.91). Cependant, ces résultats ne démontrent pas l'existence d'une interaction entre les facteurs liés sur ces sites distincts. Il est clairement nécessaire d'identifier les facteurs liant les sites conservés +104Ets et NFIL6 RE, afin d'étudier les interactions entre ces facteurs de transcription.

FIGURES

A.

Promoteur SMN1-Luc (humain)



Promoteur Smn-Luc (souris)

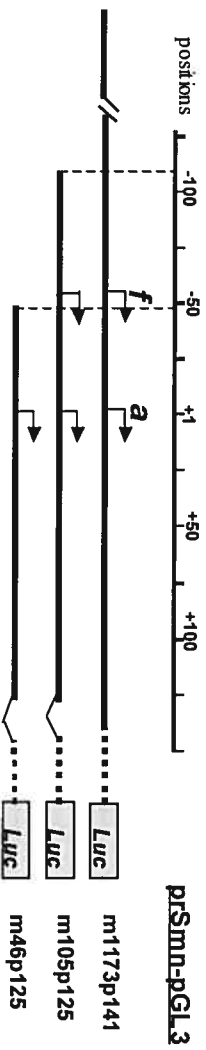
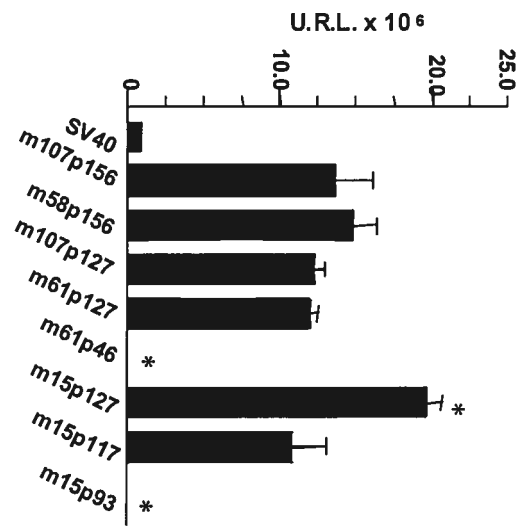


Figure 1 : Détermination de la région promotrice minimale SMN1 et Smn.

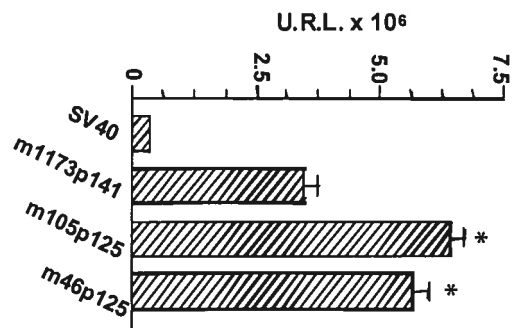
A. Constructions prSMN1-pGL3 et prSmn-pGL3. B. Activité promotrice SMN1 et Smn dans les cellules P19.C. Activité promotrice SMN1 et Smn dans les cellules P19 différenciées (P19AR). U.R.L. : Unités Relatives Luciferase. * : Constructions prSMN1-pGL3 significativement différentes de la construction prSMN1-pGL3 m107p156 ou prSmn-pGL3 m1173p141 . f,a : sites d'initiation fœtal et adulte respectivement.

B. P19

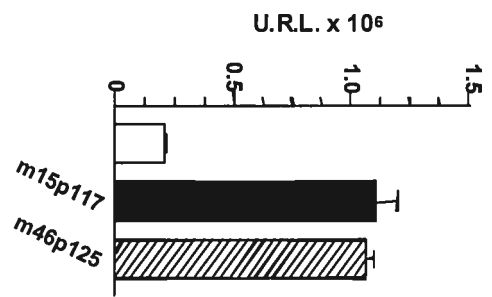
Promoteur SMN1-Luc



Promoteur Smn-Luc



C. P19AR



Promoteurs minimaux
 SV40-Luc
 Pr-SMN1-Luc
 Pr-Smn-Luc

A.

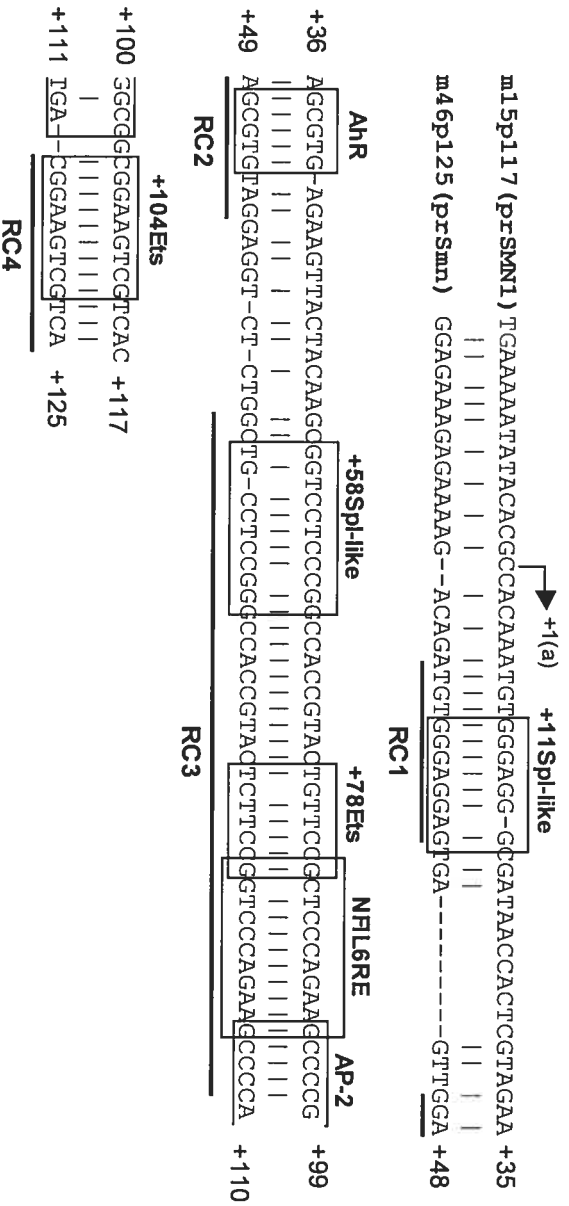


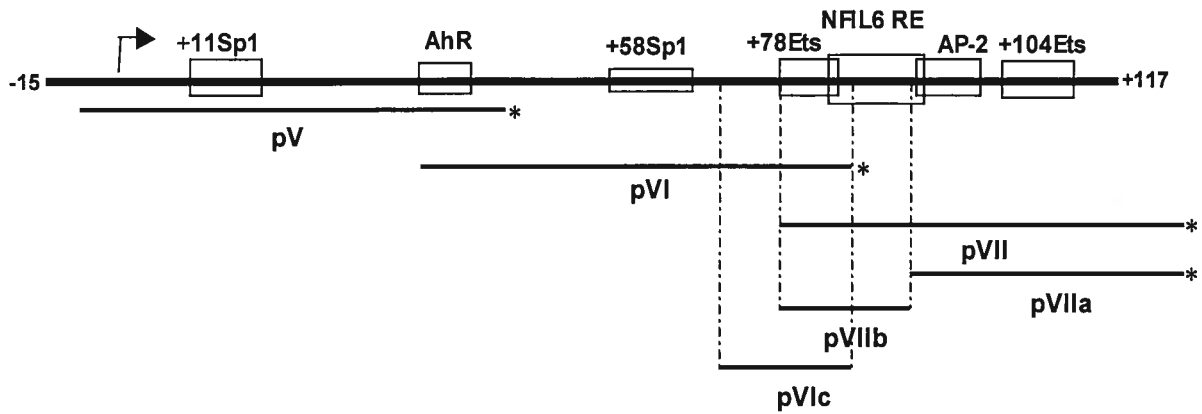
Figure 2 : Empreinte phylogénétique du promoteur SMN1.

A. Alignement des promoteurs minimaux SMN1(m15p117) et Smn (m46p125). Il s'agit d'un alignement local par introduction de pénalité lorsque des lacunes sont générées pour permettre un alignement optimal. +1(a): indique le site d'initiation de la transcription adulte. RC: indique les régions conservées. B. Eléments *cis* candidats retenus par interrogation de la base de données TRANSFAC à l'aide de TESS. ^a : Rapport de vraisemblance de la reconnaissance, la valeur 1.00 représente la reconnaissance maximale du consensus par TESS. ^b : Orientation du consensus reconnu sur le brin transcrit (N) et non transcrit (I).

B.

Dénomination des sites candidats	Eléments <i>cis</i> candidats	LLq (TESS) ^a		Orientation ^b	Position promoteur	
		SMN1	Smn		SMN1	Smn
+11Sp1	Sp1-“like “	1.00	1.00	N	+11/+17	+32/+39
	MAZ	1.00	1.00	N		
AhR	AhR	1.00	1.00	N	+37/+41	+50/+54
+58Spl	AP-2	0.79	0.64	I	+58/+65	+71/+77
	Sp1-“like”	0.93	0.93	I		
	H4TF2	1.00	1.00	N		
	ADR1	0.68	1.0	N		
+78Ets	GABP (Ets)	1.00	1.00	I	+78/+84	+90/+95
	Elk-1 (Ets)	0.75	0.75	I		
	PU.1	0.74	0.70	I		
NFIL6-RE	NFIL-6 BPs	1.00	1.00	I	+84/+94	+96/+105
	GAGA	1.00	-	I		
	AP-2	0.58	0.60	N		
AP-2	AP2	0.70	0.54	N	+95/+102	+105/+114
+104Ets	PEA3 (Ets)	1.00	0.90	N	+104/+110	+114/+120
	Ets-1 (Ets)	1.00	0.90	N		
	GABP	0.65	0.75	N		
	PU.1	0.74	0.74	N		

A. m15p117



B. Sonde pV

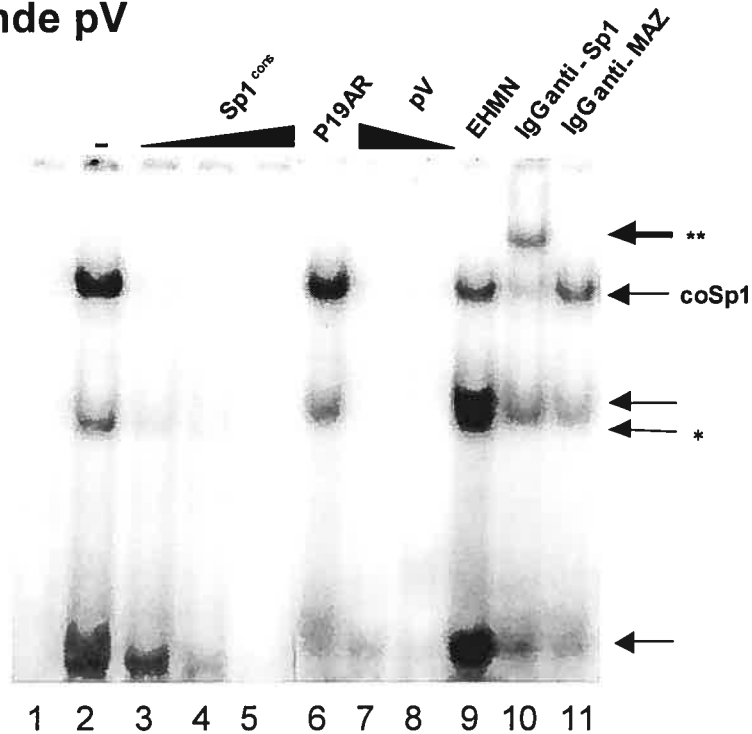
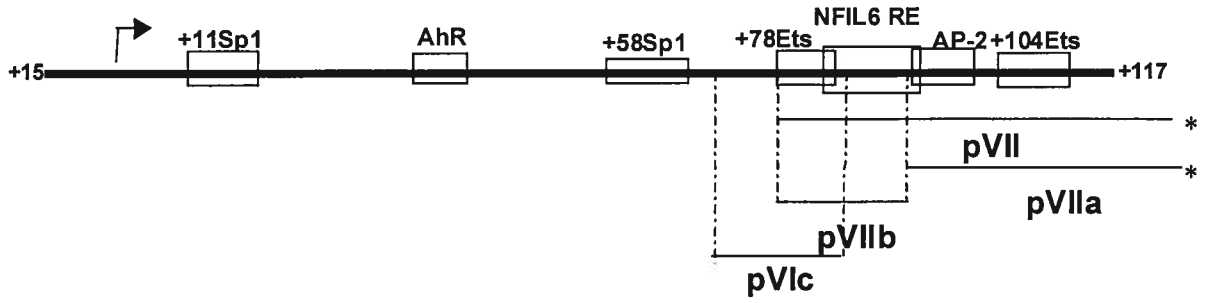


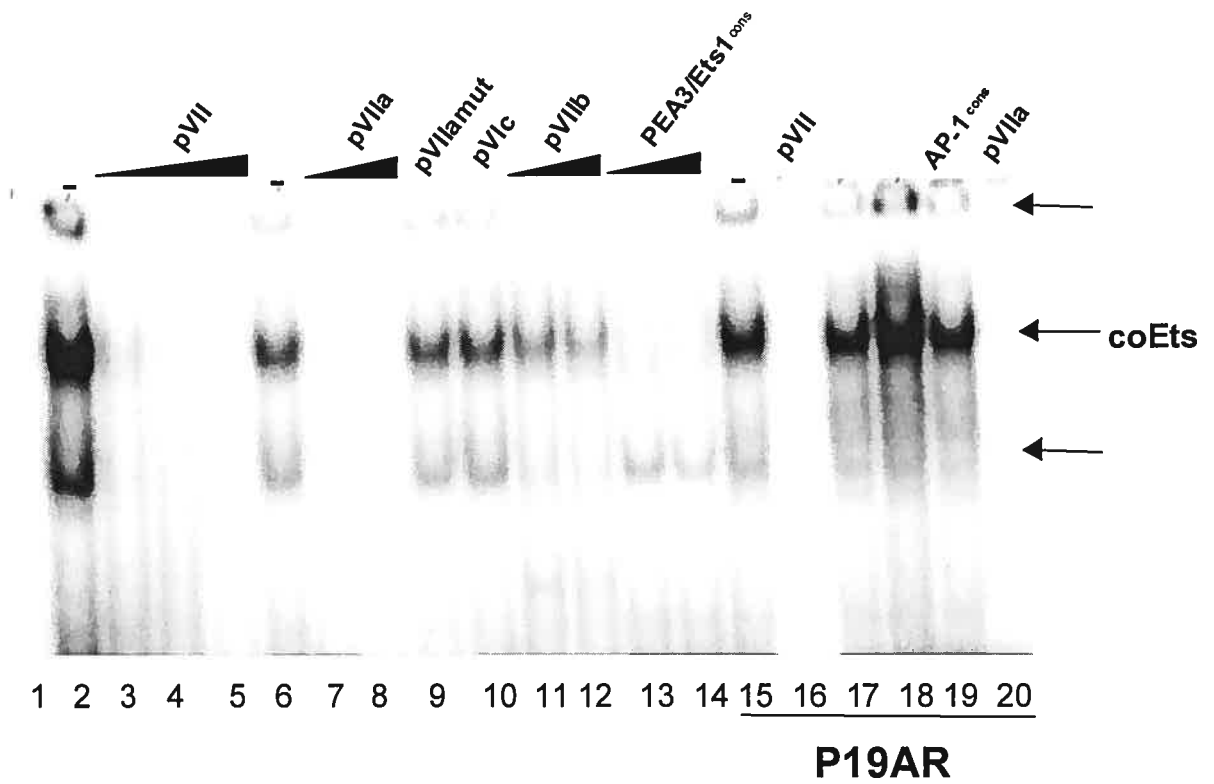
Figure 3: Criblage par compétition froide en gel retard de la sonde double-brin pV, (EMSA).

A. Sondes marquées (*) et non-marquées du promoteur SMN1 m15p117 utilisées pour le criblage en gel retard des éléments *cis* candidats. B. Gel retard de la sonde pV. Seule la région du gel contenant les complexes ADN-protéine est représentée. L'absence de compétiteurs dans le mélange est symbolisée par le signe (-). 4 μ g d'extraits nucléaires des cellules P19 (pistes 2-5, 7-8, 10-11), P19AR (pistes 6) et EHMN (piste 9) sont ajoutés au mélange. La piste 1 représente la sonde non incubée avec l'extrait nucléaire. Les compétitions avec la sonde consensus Sp1 non marquée sont réalisées avec un excès de 10 fois, 50 fois et 200 fois (pistes 2, 3 et 5 respectivement). Les compétitions avec la sonde pV non marquée sont effectuées à l'aide d'un excès de 100 et 50 fois (pistes 7 et 8, respectivement). 2 μ L d'anticorps anti-Sp1(IgG) et anti-MAZ(IgG) sont ajoutés au mélange (pistes 10 et 11, respectivement). \rightarrow : Complexe binaire pV-protéine spécifiques. $**\rightarrow$: Complexe ternaire pV-protéine-IgG (« supershift »). $*\rightarrow$: Complexe binaire formé uniquement à partir des extraits nucléaires EHMN. CoSp1 représente le complexe spécifique Sp1.

A.



B. Sonde pVII



C. Sonde pVIIa

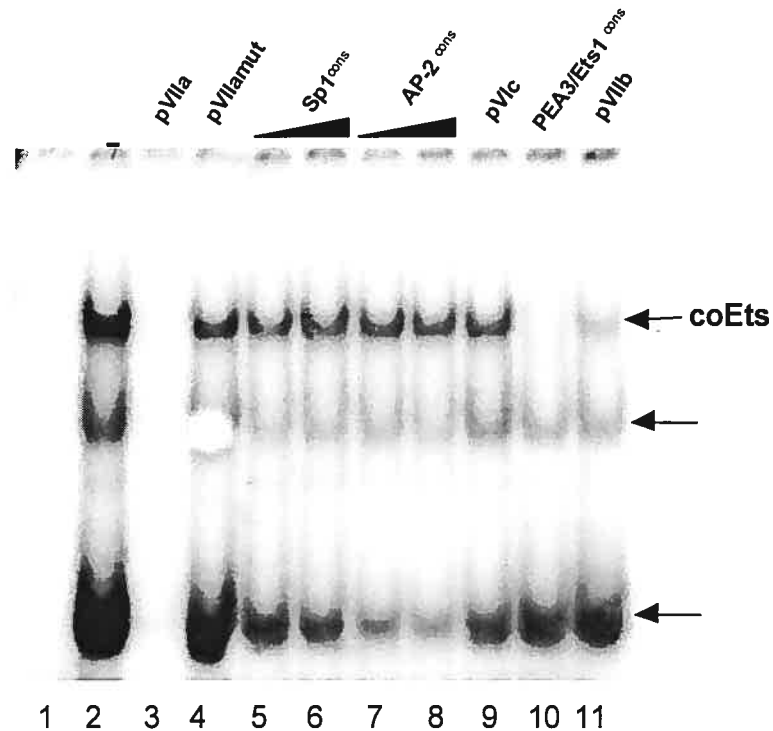


Figure 4 : Criblage par compétition froide en gel retard des sites candidats Ets à l'aide des sondes pVII et pVIIa (EMSA).

Seule la région du gel contenant les complexes ADN-protéine est représentée en B. et C. L'absence de compétiteurs est indiquée par le signe (-). A. Position des sondes marquées (*) pVII et pVIIa utilisées pour le gel retard. B. Gel retard de la sonde pVII. 4 μ g d'extraits nucléaires des cellules P19 (pistes 2 à 14) ; 4 μ g d'extraits nucléaires P19AR (pistes 15-20) sont ajoutés au mélange exceptés pour la piste 18 où 8 μ g d'extraits nucléaires P19AR ont été ajoutés. Les compétitions avec la sonde pVII non marquée ,sont réalisées avec un excès de 10, 50 et 200 fois (pistes 3, 4, et 5, respectivement). Les compétitions avec les sondes pVIIa, pVIIb et consensus PEA3/Ets-1 non marquées sont effectuées à l'aide d'un excès de 100 et 200 fois (pistes 7-8, 11-12 et 13-14, respectivement). Les compétitions pVIIamut, pVIc, pVII, consensus AP-1 et pVIIa sont effectuées avec un excès de sonde de 200 fois (pistes 9, 10, 16, 19 et 20, respectivement). \rightarrow : Complexe binaire ADN-protéine spécifiques. C. gel retard de la sonde pVIIa. 4 μ g d'extraits nucléaires des cellules P19 (pistes 2-11), sont ajoutés au mélange. Les compétitions avec les sondes consensus Sp1 et AP-2 sont réalisées avec des excès de 50 et 100 fois (pistes 5-6 et 7-8 respectivement). Les compétitions avec les sondes pVII, pVIIamut, VIc , VIIb et consensus PEA3/Ets-1 ont été réalisées avec un excès de 100 fois. \rightarrow : Complexe binaire ADN-protéine spécifiques. coEts : indique le complexe Ets.

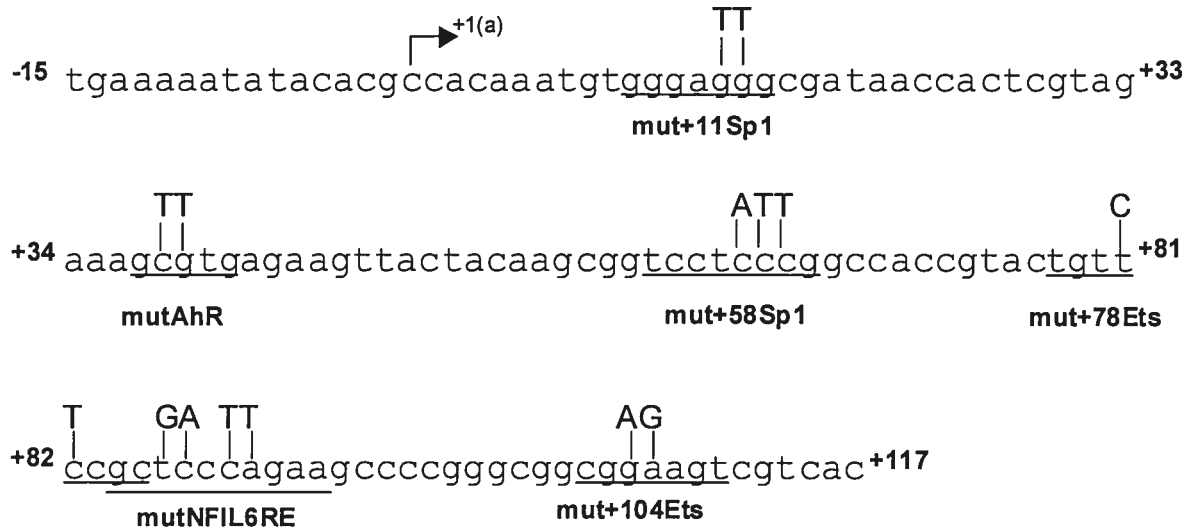
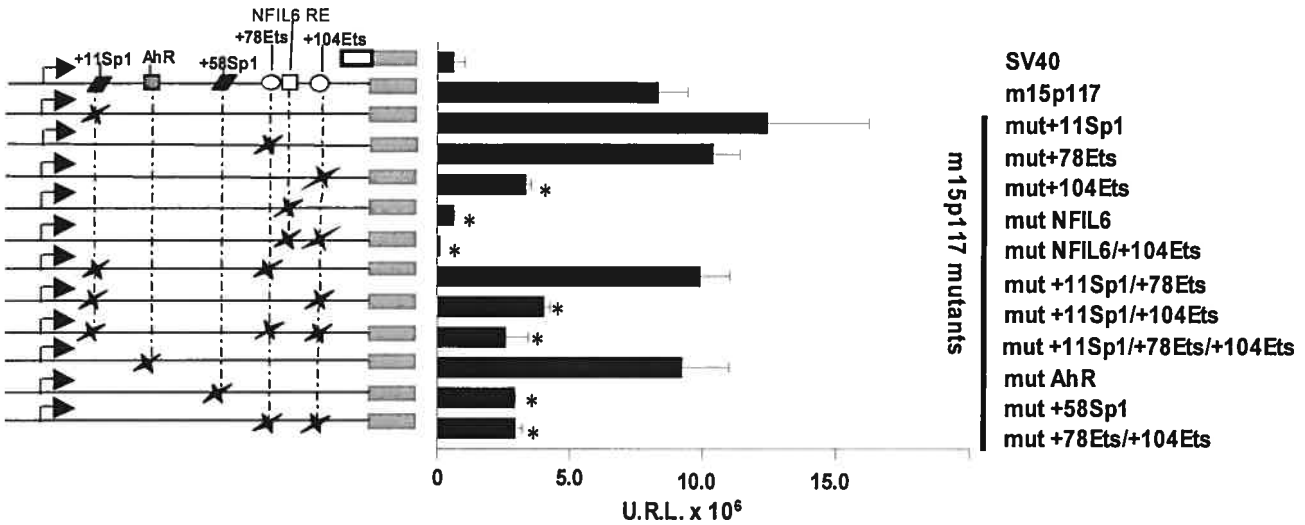


Figure 5: Mutagenèse dirigée des sites candidats retenus sur le promoteur SMN1 m15p117.

Les sites consensus candidats mutés sont soulignés. Les mutations introduites sont indiquées en majuscules juste au-dessus de la base non mutée. +1(a), indique la position du site d'initiation de la transcription utilisé majoritairement chez l'adulte.

A. P19



B. P19AR

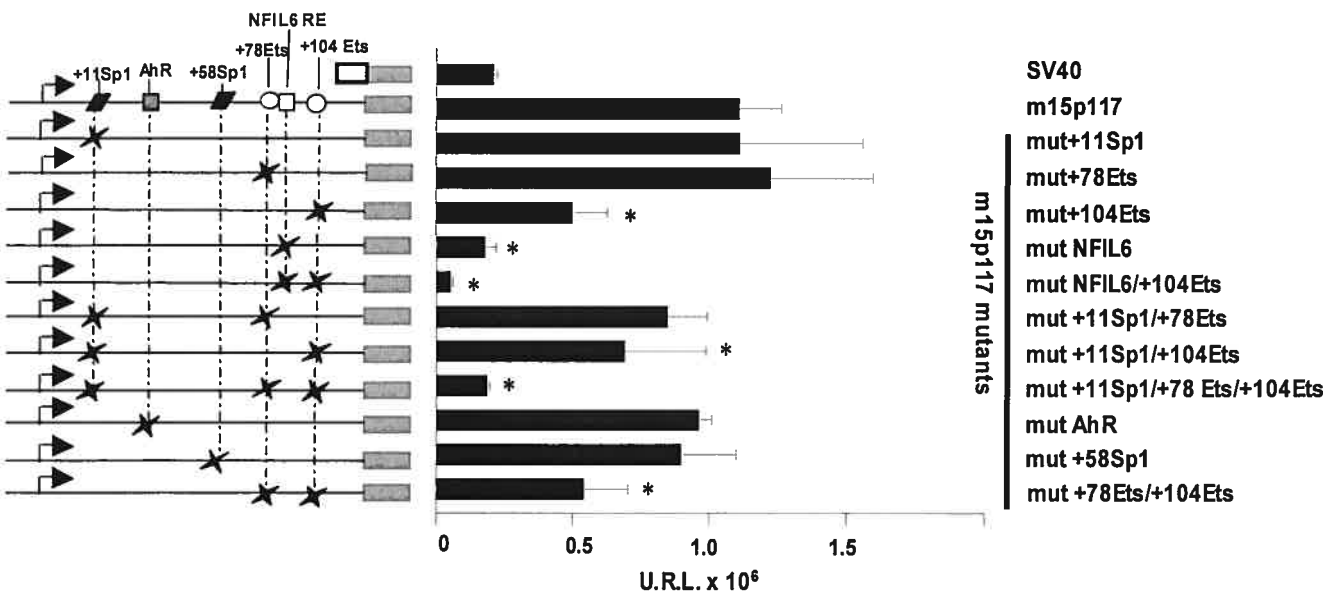
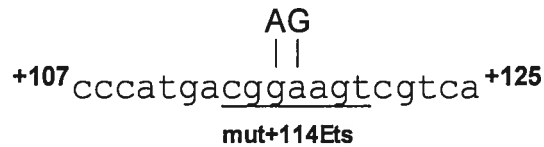


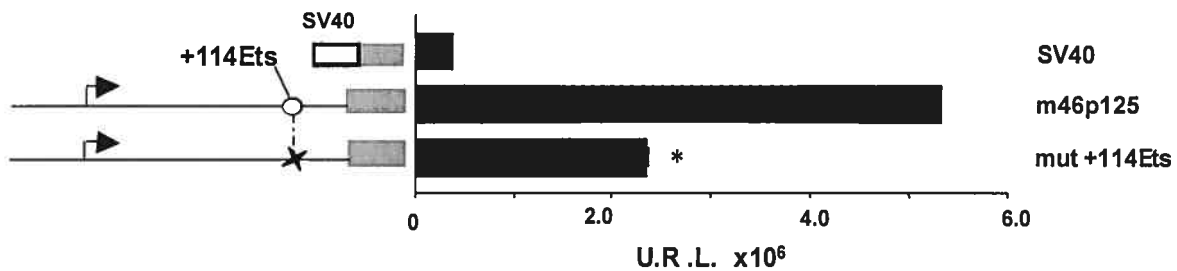
Figure 6: Criblage des sites candidats mutés par transfections transitoires des constructions prSMN1-pGL3 m15p117 mutantes dans les cellules P19 et P19AR.

A. Activités promotrices des constructions prSMN1-pGL3 m15p117 mutantes dans les cellules P19. B. Activités promotrices des constructions prSMN1-pGL3 m15p117 mutantes dans les cellules P19AR. Les mutations, décrites à la Figure 5, sont testées individuellement et/ou en combinaison. La représentation schématique de chaque construction mutante est indiquée à gauche du graphique. *: indique les constructions significativement différentes de la construction sauvage m15p117. x: indique les sites mutés sur la construction m15p117.

A.



B. P19



C. P19AR

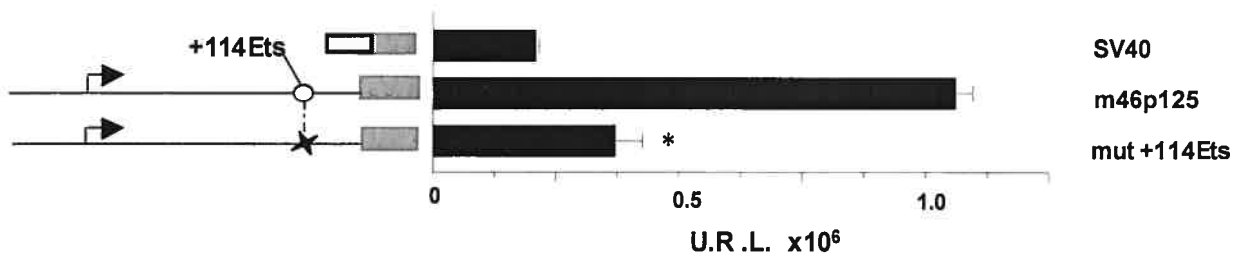


Figure 7: Conservation fonctionnelle du site +114Ets du promoteur de souris Smn m46p125 dans les cellules P19 et P19AR.

A. Mutations introduites au site +114Ets du promoteur Smn. B. Activités promotrices de la construction prSmn-pGL3 m46p125 mut +114Ets dans les cellules P19. C. Activités promotrices de la construction prSmn-pGL3 m46p125 mut +114Ets dans les cellules P19AR. *: Constructions significativement différentes de la construction sauvage m46p125. x: désigne la mutation introduite en A. Les représentations schématiques des constructions m46p125 sont indiquées à gauche des graphiques.

DISCUSSION

DISCUSSION

En dépit des énormes progrès réalisés sur l'amyotrophie spinale au cours de ces dernières années, de nombreux aspects sur la régulation de l'expression des gènes SMN1 et SMN2 demeurent toujours inconnus. Il semble que les promoteurs SMN humains et *Smn* souris soient dépourvus de boîte TATA ainsi que d'éléments initiateurs (Inr) comme la grande majorité des promoteurs de gènes « housekeeping » d'expression ubiquitaire. Baron-Delage *et al.* (70) ont montré qu'un traitement aux interférons (β et γ) entraîne une augmentation des messagers SMN (SMN1 et SMN2) dans des astrocytes et oligodendrocytes transformés, ainsi que dans des fibroblastes de patients. Ces auteurs ont établi que cette réponse aux interférons était médiée par l'élément de réponse ISRE (5'AAGGAAAGGAAAT 3') situé à la position -61 du promoteur SMN1 selon notre nomenclature. Cette induction transcriptionnelle est assurée par la liaison du facteur IRF-1 et/ou Stat1 sur cet élément inductible. Ces données indiquent donc que les promoteurs SMN1 et SMN2 sont des promoteurs inductibles en réponse à certains signaux cellulaires. Les interférons modulent de nombreux gènes impliqués dans certains processus cellulaires tels que l'apoptose, la croissance cellulaire, l'infection virale et la transformation cellulaire. Raghavendra *et al.* (89) rapportent d'ailleurs que IRF-1 et SMN sont induits par des lésions cérébrales chez le rat. Ce type de lésions conduit à des troubles neurologiques profonds suite à une dégénérescence neuronale accrue. Ces mêmes auteurs mettent en évidence une augmentation des messagers SMN

après une ischémie cérébrale (90) et proposent que cette réponse SMN1 à l'ischémie pourrait être adaptative afin de minimiser les effets de l'apoptose, compte tenu du rôle anti-apoptique de SMN. En revanche, Decraene *et al.* (91) ont montré une diminution de 5 fois du niveau des messagers SMN suite à un traitement au céramide C2. Ce type de traitement conduit à l'activation des mécanismes apoptotiques (apoptose induite par les céramides). Ces dernières observations suggèrent que le gène SMN1 est induit au niveau transcriptionnel par diverses voies de signalisation impliquées dans l'apoptose et la survie cellulaire.

L'expression du gène SMN est augmentée suite à un traitement au neurotransmetteur NMDA (69). Cette augmentation semble être médiée par le récepteur au NMDA, R1, induit par l'acide rétinoïque dans les cellules EHMN (lignée immortalisée de motoneurones embryonnaires). La simple expression des récepteurs NMDA R1 n'est cependant pas suffisante pour induire l'expression de SMN observée. Ces dernières données indiquent donc que l'expression du gène SMN est assujettie à la signalisation du NMDA, via l'activation des récepteurs NMDA R1. Malheureusement, cette étude ne montre pas si le simple traitement des cellules EHMN à l'acide rétinoïque, sans NMDA, entraîne une augmentation ou une diminution de l'activité promotrice SMN1. Néanmoins, Brand *et al.* (92) indiquent qu'un traitement court à des rétinoïdes agonistes entraîne une élévation des transcrits SMN bien que cette étude ne donne pas les niveaux d'induction et ne montre pas l'effet d'un traitement avec l'acide rétinoïque *all-trans* sur les niveaux de SMN.

Globalement, la stratégie que nous avons employée nous a permis d'identifier 3 éléments *cis* sur 7 candidats impliqués dans l'activité transcriptionnelle basale de SMN1. La mutagenèse dirigée sur ces éléments ainsi que l'analyse de retard sur gel, nous permirent de démontrer dans une implication fonctionnelle des éléments *cis* conservés +58Sp1, +104Ets et NFIL6 RE. Nous avons notamment déterminé une conservation fonctionnelle et un rôle critique des sites +104Ets et NFIL6 RE dans l'activité promotrice SMN1 et Smn, observée dans les cellules P19 et P19AR. Cependant, cette étude ne montre seulement qu'une conservation fonctionnelle du site +104Ets mais très récemment, la construction Smn m46p125 mutNFIL6 RE a permis de démontrer une conservation de cet élément (données non montrées, article en préparation) ainsi que son rôle critique dans l'activité transcriptionnelle basale du promoteur Smn souris. Cependant, une conservation fonctionnelle du site +58Sp1 reste encore à établir. Jusqu'à présent, seuls les promoteurs humains et souris ont été caractérisés. Étant donné la grande conservation de ces éléments, une conservation phylogénétique plus large des mécanismes d'expression transcriptionnels est possible.

1) L'élément de réponse NFIL6.

L'élément de réponse NFIL6 RE a été identifié pour la première fois sur les régions 5' en amont des gènes des protéines β et γ fibrinogène et dans les régions promotrices des gènes de l'inflammation de phase aiguë (93). La séquence du site NFIL6 RE (5'TTCTGGGAA 3') de ces dernières diffère peu de celle retrouvée en

position inversée sur le brin d'orientation 3'→5'(5'TTCTGGGAG 3'), dans les promoteurs SMN1 et Smn. Cette séquence est aussi très conservée sur les promoteurs des gènes plasmatiques de l'inflammation dont le gène de l' α 2-macroglobuline (α 2M)(87). Ce gène, codant des protéines plasmatiques, voit son expression augmentée par l'interleukine 6 (IL-6) via l'élément de réponse NFIL6 RE critique à cette induction. Notre site NFIL6 RE conservé est essentiel à l'activité constitutive ou basale du promoteur SMN1 et le(s) facteur(s) liant ce site semble(nt) agir en synergie avec le(s) facteur(s) Ets dans le contrôle de l'activité basale. En effet, nous avons constaté un effet additionnel des mutations introduites aux sites NFIL6 RE et +104Ets sur la même construction. Il en résulte une réduction très drastique voir quasi-totale de l'activité du promoteur SMN1. L'existence d'un tel site critique, potentiellement inductible sur le promoteur SMN, indique une modulation possible de son activité par des cytokines de la famille de l'IL-6. Nous n'avons pas encore identifié le(s) facteur(s) liant ce site mais certains candidats peuvent être proposés en raison de certaines évidences rapportées par la littérature. Les facteurs C/EBP β (« CAAT-Enhancer Binding Protein β ») et APRF/Stat3 (« Acute Phase Response Factor ») sont de bons candidats pour moduler l'expression SMN1 par l'intermédiaire de l'élément NFIL6 RE. Plus exactement, il existe 2 types de consensus NFIL6 RE, le type I (5'T(T/G)NNGNAAT(T/G) 3') connu pour lier les facteurs de la famille C/EBP et le type II (5'TT(C/A)CNG(G/T)AA 3'), connu pour lier des protéines non caractérisées, identifiées comme les protéines NFIL6 RE-BPs (« IL-6 response element binding protein »)(94;95). Bien que notre site conservé NFIL6 RE (5'TTCTGGGAG 3')

possède une faible homologie avec le consensus NFIL6 RE de type I et le consensus C/EBP β (5'TTCGCCAAT 3') (88), nous ne pouvons pas exclure une liaison du facteur C/EBP β (NFIL-6) en raison du manque de spécificité de reconnaissance de son site et de son interaction possible avec les consensus de NFIL6 RE de type II. Ces dernières années, il semble que le rôle de l'IL-6, cytokine prototypique très associée à la réponse inflammatoire et immunitaire, ne se limite pas à ces processus. L'IL-6 est aussi impliquée dans divers processus physiopathologiques du système nerveux dont le traumatisme, la méningite bactérienne, diverses scléroses et maladies dégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Il a été montré que l'IL6 participe à la croissance des neurites dans la lignée phéochromocytomale stable PC12-E2 (96). En revanche, il fut montré qu'une sur-expression de l'IL-6 dans des souris modèles entraînent des troubles neurologiques divers et profonds (97). La signalisation de la famille IL-6 s'effectue via la voie de signalisation JAK/Stat. Ito *et al.* (87) ont rapporté que les NFIL6 RE type II liaient un facteur similaire à Stat3, activable par les kinases JAK (« Janus-activated kinase »). Ils ont en particulier rapporté la liaison d'un facteur de la famille Stat3 au site NFIL-6 RE qu'ils ont identifié comme étant l'élément APRF/Stat3 (5'TTCTGGGAA 3') du promoteur SPI-3 et de l' α 2-macroglobuline (87).

Cet élément de réponse, très homologue à notre site NFIL6 RE inversé, nous suggère fortement une implication des NF-IL6 RE-BPs et du facteur de transcription APRF/Stat3 dans la régulation de l'expression constitutive de SMN1 dans les cellules P19 et P19AR. Par extension, nos résultats pourraient indiquer que le gène SMN est un gène cible de la signalisation de la famille IL6 tels que le LIF

(« Leukemia Inhibitory Factor »), CNTF (« Ciliary NeuroTrophic Factor ») et CT-1 (« Cardiotrophin-1 »). D'ailleurs, Lesbordes *et al.* (98) démontrent que la cardiotrophine-1 (CT-1), membre de la famille IL-6, aurait des effets neuroprotecteurs sur des souris « *Smn Δ 7* », modèles de l'amyotrophie spinale. Ces souris modèles, homozygotes *Smn Δ 7* uniquement dans les motoneurones, montrent une amélioration du phénotype clinique de la maladie. Cette dernière semble résultée d'un retard d'apparition phénotypique de l'AS avec une augmentation de la survie des motoneurones, associée à une organisation axonale et synaptique mieux structurée par rapport aux souris non traitées. Malheureusement, cette analyse ne montre pas une relation directe du CT-1 sur la modulation de l'expression de la protéine SMN. Il fut également rapporté un rôle neuroprotecteur de l'IL-6 pour les motoneurones de la corne antérieure de la moelle épinière contre les lésions virales irréversibles et létales (99), ce qui renforce un rôle modulateur possible des cytokines de la famille IL-6 sur l'expression de SMN et une participation de SMN dans les effets neuroprotectifs constatés de la famille IL6. L'ensemble de ces données permet d'envisager des investigations plus poussées, en particulier *in vivo*, sur le rôle et le caractère inductible de l'élément de réponse NFIL6 RE dans l'expression du gène SMN1. Ces études pourraient permettre de considérer cet élément *cis* comme une cible thérapeutique potentielle dans le cadre de traitements visant à augmenter l'expression de la protéine SMN pleine-longueur.

2) Les éléments cis Ets.

Notre étude démontre également une implication et une conservation fonctionnelle des sites +104Ets SMN1 et +114Ets Smn dans l'activité promotrice basale dans les cellules P19 et P19 différenciées. Ce site de liaison conservé des facteurs Ets entraîne une diminution de moitié de l'activité transcriptionnelle basale lorsque sa liaison est abolie par l'introduction de mutations. Les résultats de retards sur gel et de transfections transitoires nous indiquent clairement un rôle important des facteurs de transcription Ets dans l'activité promotrice SMN1 bien que nous n'ayons pas identifié spécifiquement le(s) facteur(s) de la famille Ets impliqué(s). Les facteurs Ets appartiennent à la famille de facteurs de transcription hélice-coude-hélice (wHTH), qui regroupe plus de 30 gènes, caractérisés par leur domaine de liaison à l'ADN HTH. Les facteurs Ets lient le consensus 5'NNGGA(A/T)NN 3'. Les séquences flanquantes de la région « core » GGAA semblent avoir une spécificité relative pour un facteur Ets donné. Le contexte *in vivo* de l'interaction ADN-protéine et protéine-protéine est important et déterminant pour la spécificité de cette reconnaissance car la forte conservation structurale de leur domaine Ets ne permet pas d'expliquer cette spécificité. Les facteurs de transcription Ets ont été caractérisés dans de nombreuses espèces tels que le nématode, les éponges et les mammifères (100). Cette famille très conservée est impliquée dans de nombreux processus biologiques complexes. La signalisation Ets est associée entre autre à l'hématopoïèse et l'angiogénèse au cours du développement embryonnaire. Ce sont

également des régulateurs critiques de processus cellulaires fondamentaux. Les protéines Ets interagissent avec des protéines intracellulaires, de surface et aussi extracellulaires impliquées dans la morphogenèse et le remodelage tissulaire. Cependant, les facteurs Ets présentent des profils d'expression hétérogènes, chevauchants et aussi spécifiques de chacun d'entre eux, dépendant du stade de développement et du tissu embryonnaire (101). Chez l'adulte, les gènes Ets sont exprimés dans un grand nombre de tissus comme le cerveau, la moelle épinière, la glande mammaire, les tissus vasculaires, les tissus hématopoïétiques, les ovaires, les testicules, les reins et les poumons. Les facteurs Ets forment un réseau complexe de protéines régulatrices, comme Elk-1, Ets-1/2, GABP, PU.1, Fli-1, TEL et PEA3, principalement assignées au développement tissulaire, à la différenciation cellulaire, l'apoptose et à la progression tumorale (82). Compte tenu du fait que plusieurs facteurs Ets peuvent lier le même site et que leur effet activateur ou répresseur est dépendant d'interactions protéine-protéine ainsi que d'un effet de dosage, leur signalisation régulatrice apparaît donc complexe et vraisemblablement chevauchante avec de nombreux processus cellulaires. De plus, les membres de cette famille pourraient avoir des rôles redondants par liaison de ces facteurs sur des sites identiques.

Les facteurs Ets agissent à l'aide d'un contrôle combinatoire qui permet à un nombre limité de ces facteurs de transcription de réguler un grand nombre de gènes cibles induits par différentes voies de signalisation (100;101). Dans ce type de régulation, les complexes Ets possèdent une charpente commune, seuls les partenaires diffèrent. Dans le contexte de notre étude, l'aspect le plus intéressant de

la régulation cellulaire spécifique assurée par les facteurs Ets vient de PEA3 lors du développement des unités motrices. En effet, les protéines de la famille Ets (Ets-1, Ets-2 et PEA3) sont exprimées dans l'embryon et dans un grand nombre d'organes ou structures embryonnaires en cours de différenciation et de maturation, notamment dans la moelle épinière où PEA3 y est fortement exprimé. Cette expression est hautement régulée au niveau spatial et temporel. Jusqu'à récemment, PEA3 était impliqué principalement dans les processus métastatiques et l'invasion cellulaire. Livet *et al.* (102) ont établi que le gène PEA3 contrôle le positionnement et l'arborisation terminale de certaines sous populations de motoneurones au niveau cervical de la moelle épinière. L'expression de PEA3 est temporellement et localement contrôlée par le GDNF « Glial-derived neurotrophic factor » environnant (103). Ces résultats démontrent sans équivoque le rôle critique de la famille Ets dans le développement des connexions motrices. De plus, il fut montré que ER81, appartenant à la famille PEA3, contrôle la connexion entre des groupes de motoneurones afférents sensitifs et des groupes effecteurs moteurs (103-105).

L'analyse par mutagenèse dirigée des promoteurs SMN1 démontre clairement une participation critique des sites +104Ets et NFIL6 RE à l'activité promotrice basale SMN1. L'action mutuelle des sites +104Ets et NFIL6 RE sur l'activité transcriptionnelle basale indique l'existence possible d'une régulation transcriptionnelle via un code combinatoire exercé par les facteurs de la famille Ets lié au site +104Ets, entraînant ainsi une régulation transcriptionnelle spécifique à divers stimulations ou stress, selon le facteur Ets impliqué. L'effet additionnel du

site +104Ets avec le site NFIL6 RE dans le contrôle de l'activité promotrice basale nécessite des analyses mécanistiques plus approfondies. De plus, cet effet additionnel des mutations, introduites sur ces sites, supporte l'existence d'une régulation combinatoire potentielle médiée par des interactions protéine-protéine directes ou indirectes entre le(s) facteur(s) Ets et le(s) facteur(s) liant NFIL6-RE. Cette interaction pourrait moduler l'activité transcriptionnelle SMN1 via des modifications post-traductionnelles de ces derniers et/ou par participation de cofacteurs transcriptionnels.

3) Les éléments *cis* Sp1.

Le promoteur SMN1 semble être reconnu par le facteur Sp1. En effet, notre analyse en gel nous montre une liaison du facteur Sp1 au site +11Sp1 dans les cellules P19 et P19AR. Cependant l'analyse fonctionnelle de ce site par mutagenèse dirigée ne permet pas de lui attribuer un rôle dans l'activité transcriptionnel du gène SMN1 alors que cette même analyse a permis de constater une participation du site +58Sp1 uniquement dans les cellules P19. À présent, nous ne pouvons exclure complètement une participation de la région RC1 dans cette régulation promotrice en raison de la fixation de Sp1 sur celle-ci (site +11Sp1). Cette participation exclusive du site +58Sp1 suggère que le mécanisme transcriptionnel de SMN1 pourrait être moléculairement différent selon le stade de différenciation cellulaire. En effet, des différences de modifications post-traductionnelles et/ou l'intervention d'autre(s) élément(s) *cis*, non identifié(s) par notre approche, pourraient moduler

l'activité promotrice basale de SMN1 de façon dépendante de la différenciation. A présent, il n'y a aucune évidence directe que le facteur de transcription ubiquitaire Sp1 puisse lier ce site conservé (**Annexe 2**). En effet, le site +58Sp1 peut potentiellement, en plus de Sp1, lier les facteurs H4TF2, les facteurs GAGA, ADR1 et AP2 de façon plus dégénérée. L'étude de l'habilité de ce site à lier ces facteurs pourraient nous apporter certaines réponses sur le mécanisme impliqué dans cette participation exclusive du site +58Sp1.

4) Effets de la différenciation cellulaire.

Nous avons observé que la différenciation des cellules P19, induite par l'acide rétinoïque, entraîne une diminution de l'activité promotrice SMN1 et Smn d'approximativement 10 fois. Nos résultats suggèrent donc une conservation des mécanismes transcriptionnels impliqués dans cette répression. Les sites +104Ets et NFIL6 RE s'avèrent toujours critique et agissent de concert sur l'activité transcriptionnelle basale de SMN1 observée dans les cellules P19AR. Nos résultats sont en accord avec les faibles niveaux de SMN retrouvés dans les motoneurones adultes et sa forte expression durant l'embryogenèse. De plus, cette activité réprimée dans les cellules différenciées, renforce l'existence d'une modulation transcriptionnelle exercée par les facteurs Ets et les facteurs NFIL6 RE-BPs via des modulations de leurs interactions directes et indirectes. Cependant, notre analyse de retards sur gel ne nous a pas permis de mettre en évidence une différence de complexes ADN-protéine entre les cellules P19 et P19AR. Ce type d'analyse *in*

in vitro, ne permet pas l'étude de régulations transcriptionnelles subtiles pouvant impliquer des variabilités d'interactions protéines-protéines des complexes binaires ADN-protéine. Il reste encore difficile à ce stade de déterminer les mécanismes impliqués dans cette répression dépendante de la différenciation, bien que l'analyse par mutagenèse dirigée du promoteur SMN1 nous a permis d'identifier le site +58Sp1 comme étant un site strictement impliqué dans l'activité promotrice dans les cellules P19.

5) Conclusion(s) et perspective(s).

Notre approche fonctionnelle phylogénétique permet d'établir pour la première fois un rôle fonctionnel et critique des régions promotrices conservées entre les promoteurs SMN1 humain et Smn souris et aussi d'envisager un modèle mécanistique préliminaire de la régulation des promoteurs SMN1 et Smn dans les cellules P19 (**Schéma 4**).

Plus précisément, notre approche basée sur une analyse *in silico*, nous a permis de démontrer le rôle primordial des régions conservées RC3 et RC4 dans l'intégrité promotrice SMN1 et Smn. Ces régions contiennent les éléments *cis*, NFIL6 RE (RC3) et +104Ets (RC4), régulant mutuellement l'activité promotrice basale dans les cellules P19 et P19AR.

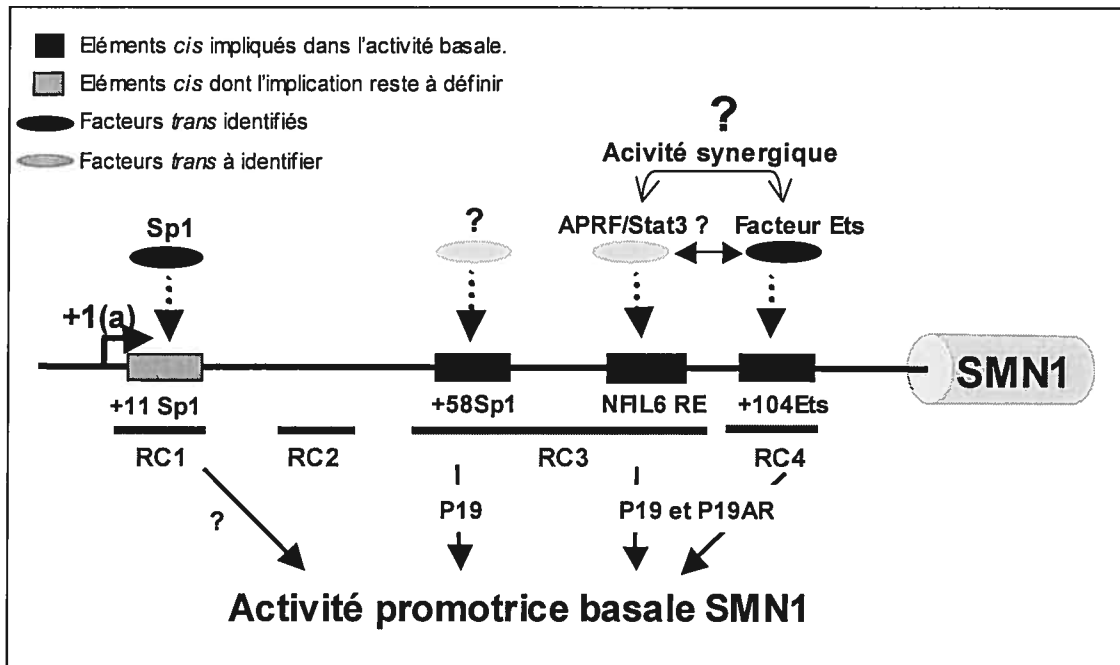


Schéma 4 :

Description schématique du modèle mécanistique de la régulation transcriptionnelle basale du promoteur SMN1. (RC) identifie les régions conservées entre les promoteur SMN1 et Smn de souris. (+1a) indique le site d'initiation transcriptionnel retrouvé chez l'adulte. La région promotrice SMN1 d'approximativement 200 pb, juste en amont de l'exon 1, est symbolisée par le trait noir. Les flèches en pointillés symbolisent la fixation du facteur *trans*.

Néanmoins, notre approche possède ses limites. En effet, notre stratégie présente le désavantage majeur de ne pas valider nos observations dans un contexte *in vivo*. En effet, les analyses par transfections transitoires et de retards sur gel ne permettent pas de déterminer l'implication du contexte « chromato-génomique » sur la modulation de l'activité promotrice par variations d'accessibilités à l'ADN via, par exemple, des cofacteurs modulant l'acétylation d'histones. D'autres part, les techniques utilisées dans cette approche fournissent quelques évidences mais ne permettent cependant pas de démontrer clairement l'existence d'une régulation

« Ets » combinatoire. La caractérisation d'un tel mode de régulation nécessite des études *in vivo* ainsi que l'identification des facteurs liés aux sites +104Ets, NFIL6 RE et +58Sp1.

Le facteur Ets PEA3, en raison de son implication dans le développement des unités motrices fut un bon candidat pour lier le site +104Ets de SMN1. Bien que nous n'ayons pu démontrer la liaison de ce facteur *trans* sur le promoteur SMN1 (« Supershift » négatif; **Annexe 3**), nous ne pouvons pas totalement exclure une participation de ce facteur à l'activité promotrice. En l'absence d'identification du/des facteur(s) Ets impliqué(s), il est nécessaire d'étudier la participation d'autres facteurs Ets dans cette régulation. Les facteurs Ets-1 (106-108) et Ets-2 (108), reconnus par TRANSFAC, sont de bons candidats à tester pour leur liaison au site +104Ets. En effet, ces facteurs Ets sont associés à l'invasion cellulaire et la différenciation cellulaire. Kola et al. (106) ont établi que Ets-1 est induit dans les cellules P19 par un traitement à l'acide rétinoïque alors que dans les cellules embryonnaires F9, le facteur Ets-1 est constitutivement exprimé. Ces données indiquent que les profils d'expression Ets-1 pourraient varier d'un type cellulaire à l'autre et selon le stade de différenciation. En revanche, le facteur Ets-2 est exprimé constitutivement dans les cellules P19 et P19AR. Les facteurs Ets-1 et Ets-2, comme candidats au site +104Ets, et Stat3 pour le site NFIL6 RE, peuvent être testés facilement par « supershift » en gel retard. Dans l'objectif de caractériser les facteurs liant ces sites, plusieurs approches *in vivo* doivent être envisagées afin d'élucider l'existence d'une régulation combinatoire et de valider la participation

des facteurs Ets. Une autre approche conventionnelle protéomique peu ciblée consisterait à prélever les complexes résolus en gel retard puis de caractériser les facteurs liés aux sondes par analyse en spectrométrie de masse. Il est évident que des analyses plus approfondies en ce sens et dans un contexte *in vivo* sont impératives comme par exemple les méthodes de ChIP «Chromatin-ImmunoPrecipitation» et d'empreintes génomiques par LM-PCR «*in vivo* footprinting». L'action transcriptionnelle des facteurs de la famille Ets est connue pour être médiée par divers voies de signalisations cellulaires. De ce fait, une étude centrée sur la(es) signalisation(s) cellulaire(s) impliquée(s) dans la régulation du promoteur SMN, s'avère aussi nécessaire afin d'identifier les voies de signalisation pouvant moduler l'activité promotrice de SMN1 et d'établir un modèle mécanistique précis. Par exemple, l'utilisation d'inhibiteurs métaboliques ou chimiques, spécifiques à certaines voies de signalisation comme les MAPKs («Mitogen-Activated Protein Kinases»), devraient permettre de connaître les signalisations modulatrices de l'expression de ce gène.

L'ensemble de cette étude nous permet d'entrevoir la régulation transcriptionnelle du promoteur SMN1 comme une régulation complexe car seulement 3 éléments *cis* ont été clairement impliqués dans la régulation basale transcriptionnelle. Nous avons tenté d'établir ici un mécanisme moléculaire préliminaire et modèle de l'expression basale du promoteur SMN1 dans les cellules P19. Notre modèle est basé sur l'implication des régions conservées RC1, RC3 et RC4, contenant respectivement les sites +11Sp1, +58Sp1, NFIL6 RE et +104Ets,

sur l'activité promotrice basale. Bien que l'identité des facteurs partenaires reste encore inconnue, ce modèle est particulièrement centré sur une activité basale conjointement modulée par les facteurs de la famille Ets et le facteur liant le site NFIL6 RE (APRF/Stat3). A ce stade, il est important d'envisager l'implication d'autres éléments *cis* et facteurs transcriptionnels qui pourraient être nécessaires à cette activité. En plus des études *in vivo*, notre modèle doit être validé dans d'autres types cellulaires et espèces. Il reste beaucoup de points à éclaircir pour comprendre et caractériser le(s) mécanisme(s) responsable(s) de l'expression du gène SMN1. Pour ce gène, à effet de dosage, une meilleure compréhension des mécanismes transcriptionnels pouvant augmenter le niveau des messagers de la protéine SMN est indubitablement nécessaire à la recherche de traitements curatifs et d'approches thérapeutiques de l'amyotrophie spinale.

CONCLUSION

Notre approche d'analyse du promoteur SMN1 basée sur la conservation phylogénétique des éléments *cis* régulateurs nous a permis :

- De définir les régions promotrices minimales, douées d'activités transcriptionnelles, du gène SMN1 (-15/+117) humain et de son orthologue murin Snn (-46/+125).
- D'établir une conservation fonctionnelle des régions conservées RC3 et RC4, primordiales à l'activité promotrice de SMN1 et Snn dans les cellules P19 et P19AR.
- D'identifier les éléments *cis* conservés +104Ets et NFIL6 RE comme critiques à l'activité transcriptionnelle du gène SMN1.
- D'identifier l'élément +58Sp1 comme étant impliqué dans l'activité promotrice basale de SMN1 uniquement dans les cellules P19.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Zerres K, Davies KE. 59th ENMC International Workshop: Spinal Muscular Atrophies: recent progress and revised diagnostic criteria 17-19 April 1998, Soestduinen, The Netherlands. *Neuromuscul.Disord.* 1999; **9**:272-278.
2. Zerres, K., Rudnik-Schoneborn, S., de Visser, M., and Ysbrand, P. Report of a WANDA Workshop held on the occasion of the 9th congress of Mediterranean Society of Myology in Capri, Italy. *Acta Myologica* 20, 61-68. 2004.
3. Soler-Botija C, Ferrer I, Gich I, Baiget M, Tizzano EF. Neuronal death is enhanced and begins during foetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord. *Brain* 2002; **125**:1624-1634.
4. Crawford TO, Pardo CA. The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol.Dis.* 1996; **3**:97-110.
5. Braun S, Croizat B, Lagrange MC, Warter JM, Poindron P. Constitutive muscular abnormalities in culture in spinal muscular atrophy. *Lancet* 1995; **345**:694-695.
6. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L *et al.* Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995; **80**:155-165.
7. Rodrigues NR, Owen N, Talbot K, Ignatius J, Dubowitz V, Davies KE. Deletions in the survival motor neuron gene on 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Hum.Mol.Genet.* 1995; **4**:631-634.
8. Burglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C *et al.* Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics* 1996; **32**:479-482.
9. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999; **96**:6307-6311.
10. Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH *et al.* A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum.Mol.Genet.* 1999; **8**:1177-1183.

11. Lorson CL, Androphy EJ. An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum.Mol.Genet.* 2000; **9**:259-265.
12. Kashima T, Manley JL. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat.Genet.* 2003; **34**:460-463.
13. DiDonato CJ, Chen XN, Noya D, Korenberg JR, Nadeau JH, Simard LR. Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene: homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene. *Genome Res.* 1997; **7**:339-352.
14. Rochette CF, Gilbert N, Simard LR. SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to Homo sapiens. *Hum.Genet.* 2001; **108**:255-266.
15. Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum.Mutat.* 2000; **15**:228-237.
16. Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, Bertrand S, Clermont O, Munnich A *et al.* Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat.Genet.* 1997; **16**:265-269.
17. Rochette CF, Surh LC, Ray PN, McAndrew PE, Prior TW, Burghes AH *et al.* Molecular diagnosis of non-deletion SMA patients using quantitative PCR of SMN exon 7. *Neurogenetics.* 1997; **1**:141-147.
18. Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *Am.J.Hum.Genet.* 2002; **70**:358-368.
19. Zerres K, Wirth B, Rudnik-Schoneborn S. Spinal muscular atrophy--clinical and genetic correlations. *Neuromuscul.Disord.* 1997; **7**:202-207.
20. McAndrew PE, Parsons DW, Simard LR, Rochette C, Ray PN, Mendell JR *et al.* Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMNT and SMNC gene copy number. *Am.J.Hum.Genet.* 1997; **60**:1411-1422.
21. Campbell L, Potter A, Ignatius J, Dubowitz V, Davies K. Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: implications for disease process and clinical phenotype. *Am.J.Hum.Genet.* 1997; **61**:40-50.
22. Schrank B, Gotz R, Gunnarsen JM, Ure JM, Toyka KV, Smith AG *et al.* Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human

spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997; **94**:9920-9925.

23. Jablonka S, Schrank B, Kralewski M, Rossoll W, Sendtner M. Reduced survival motor neuron (Smn) gene dose in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III. *Hum.Mol.Genet.* 2000; **9**:341-346.
24. Monani UR, Sendtner M, Coover DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT *et al.* The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in Smn(-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum.Mol.Genet.* 2000; **9**:333-339.
25. Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R *et al.* The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 1995; **80**:167-178.
26. Novelli G, Semprini S, Capon F, Dallapiccola B. A possible role of NAIP gene deletions in sex-related spinal muscular atrophy phenotype variation. *Neurogenetics.* 1997; **1**:29-30.
27. Scharf JM, Endrizzi MG, Wetter A, Huang S, Thompson TG, Zerres K *et al.* Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics. *Nat.Genet.* 1998; **20**:83-86.
28. La Bella, V, Cisterni C, Salaun D, Pettmann B. Survival motor neuron (SMN) protein in rat is expressed as different molecular forms and is developmentally regulated. *Eur.J.Neurosci.* 1998; **10**:2913-2923.
- 28b. Battaglia G, Princivalle A, Forti F, Lizier C, Zeviani M. Expression of the SMN gene, the spinal muscular atrophy determining gene, in the mammalian central nervous system. *Hum.Mol.Genet.* 1997; **6**:1961-71.
29. Mirabella M, Servidei S, Broccolini A, Gandolfi N, Ricci E, Neri G *et al.* The drastic reduction of SMN protein in SMA I spinal cord motor neurons is not due to inefficient transcription. *Neurogenetics.* 1999; **2**:97-100.
30. Paushkin S, Gubitzi AK, Massenet S, Dreyfuss G. The SMN complex, an assembly of ribonucleoproteins. *Curr.Opin.Cell Biol.* 2002; **14**:305-312.
- 30b. Liu Q, Dreyfuss G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J.* 1996; **15**:3555-65.
31. Lorson CL, Androphy EJ. The domain encoded by exon 2 of the survival motor neuron protein mediates nucleic acid binding. *Hum.Mol.Genet.* 1998; **7**:1269-1275.

32. Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, Baleja JD, Hahnen E, Wirth B *et al.* SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat.Genet.* 1998; **19**:63-66.
33. Liu Q, Fischer U, Wang F, Dreyfuss G. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell* 1997; **90**:1013-1021.
34. Charroux B, Pellizzoni L, Perkinson RA, Shevchenko A, Mann M, Dreyfuss G. Gemin3: A novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems. *J.Cell Biol.* 1999; **147**:1181-1194.
35. Charroux B, Pellizzoni L, Perkinson RA, Yong J, Shevchenko A, Mann M *et al.* Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli. *J.Cell Biol.* 2000; **148**:1177-1186.
36. Wang J, Dreyfuss G. Characterization of functional domains of the SMN protein in vivo. *J.Biol.Chem.* 2001; **276**:45387-45393.
37. Talbot K, Miguel-Aliaga I, Mohaghegh P, Ponting CP, Davies KE. Characterization of a gene encoding survival motor neuron (SMN)-related protein, a constituent of the spliceosome complex. *Hum.Mol.Genet.* 1998; **7**:2149-2156.
38. Pellizzoni L, Kataoka N, Charroux B, Dreyfuss G. A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell* 1998; **95**:615-624.
39. Pellizzoni L, Charroux B, Dreyfuss G. SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999; **96**:11167-11172.
40. Jablonka S, Holtmann B, Meister G, Bandilla M, Rossoll W, Fischer U *et al.* Gene targeting of Gemin2 in mice reveals a correlation between defects in the biogenesis of U snRNPs and motoneuron cell death. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002; **99**:10126-10131.
41. Iwahashi H, Eguchi Y, Yasuhara N, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Tsujimoto Y. Synergistic anti-apoptotic activity between Bcl-2 and SMN implicated in spinal muscular atrophy. *Nature* 1997; **390**:413-417.
42. Kerr DA, Nery JP, Traystman RJ, Chau BN, Hardwick JM. Survival motor neuron protein modulates neuron-specific apoptosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000; **97**:13312-13317.

43. Vyas S, Bechade C, Riveau B, Downward J, Triller A. Involvement of survival motor neuron (SMN) protein in cell death. *Hum.Mol.Genet.* 2002; **11**:2751-2764.
44. Young PJ, Day PM, Zhou J, Androphy EJ, Morris GE, Lorson CL. A direct interaction between the survival motor neuron protein and p53 and its relationship to spinal muscular atrophy. *J.Biol.Chem.* 2002; **277**:2852-2859.
45. Pellizzoni L, Charroux B, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. A functional interaction between the survival motor neuron complex and RNA polymerase II. *J.Cell Biol.* 2001; **152**:75-85.
46. Strasswimmer J, Lorson CL, Breiding DE, Chen JJ, Le T, Burghes AH *et al.* Identification of survival motor neuron as a transcriptional activator-binding protein. *Hum.Mol.Genet.* 1999; **8**:1219-1226.
47. Miguel-Aliaga I, Culetto E, Walker DS, Baylis HA, Sattelle DB, Davies KE. The *Caenorhabditis elegans* orthologue of the human gene responsible for spinal muscular atrophy is a maternal product critical for germline maturation and embryonic viability. *Hum.Mol.Genet.* 1999; **8**:2133-2143.
48. Hannus S, Buhler D, Romano M, Seraphin B, Fischer U. The *Schizosaccharomyces pombe* protein Yab8p and a novel factor, Yip1p, share structural and functional similarity with the spinal muscular atrophy-associated proteins SMN and SIP1. *Hum.Mol.Genet.* 2000; **9**:663-674.
49. Owen N, Doe CL, Mellor J, Davies KE. Characterization of the *Schizosaccharomyces pombe* orthologue of the human survival motor neuron (SMN) protein. *Hum.Mol.Genet.* 2000; **9**:675-684.
50. Bertrand S, Burlet P, Clermont O, Huber C, Fondrat C, Thierry-Mieg D *et al.* The RNA-binding properties of SMN: deletion analysis of the zebrafish orthologue defines domains conserved in evolution. *Hum.Mol.Genet.* 1999; **8**:775-782.
51. Cifuentes-Diaz C, Nicole S, Velasco ME, Borra-Cebrian C, Panozzo C, Frugier T *et al.* Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. *Hum.Mol.Genet.* 2002; **11**:1439-1447.
52. Frugier T, Tiziano FD, Cifuentes-Diaz C, Miniou P, Roblot N, Dierich A *et al.* Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum.Mol.Genet.* 2000; **9**:849-858.
53. Fan L, Simard LR. Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Hum.Mol.Genet.* 2002; **11**:1605-1614.

54. Giesemann T, Rathke-Hartlieb S, Rothkegel M, Bartsch JW, Buchmeier S, Jockusch BM *et al.* A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J.Biol.Chem.* 1999; **274**:37908-37914.
55. Andreassi C, Jarecki J, Zhou J, Coovert DD, Monani UR, Chen X *et al.* Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients. *Hum.Mol.Genet.* 2001; **10**:2841-2849.
56. Chang JG, Hsieh-Li HM, Jong YJ, Wang NM, Tsai CH, Li H. Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001; **98**:9808-9813.
57. Brichta L, Hofmann Y, Hahnen E, Siebzehnruhl FA, Raschke H, Blumcke I *et al.* Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum.Mol.Genet.* 2003; **12**:2481-2489.
58. DiDonato CJ, Parks RJ, Kothary R. Development of a gene therapy strategy for the restoration of survival motor neuron protein expression: implications for spinal muscular atrophy therapy. *Hum.Gene Ther.* 2003; **14**:179-188.
59. DiDonato CJ, Lorson CL, De Repentigny Y, Simard L, Chartrand C, Androphy EJ *et al.* Regulation of murine survival motor neuron (Smn) protein levels by modifying Smn exon 7 splicing. *Hum.Mol.Genet.* 2001; **10**:2727-2736.
60. Haase G, Kennel P, Pettmann B, Vigne E, Akli S, Revah F *et al.* Gene therapy of murine motor neuron disease using adenoviral vectors for neurotrophic factors. *Nat.Med.* 1997; **3**:429-436.
61. Hofmann Y, Lorson CL, Stamm S, Androphy EJ, Wirth B. Htra2-beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000; **97**:9618-9623.
62. Alisky JM, Davidson BL. Gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron diseases. *Hum.Gene Ther.* 2000; **11**:2315-2329.
63. Nicole S, Desforges B, Millet G, Lesbordes J, Cifuentes-Diaz C, Vertes D *et al.* Intact satellite cells lead to remarkable protection against Smn gene defect in differentiated skeletal muscle. *J.Cell Biol.* 2003; **161**:571-582.
- 63b Kerr D. A potential rôle for neural stem cells in spinal muscular atrophy; 2003; www.fsma.org

64. Kerr DA, Llado J, Shamblott MJ, Maragakis NJ, Irani DN, Crawford TO *et al.* Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury. *J.Neurosci.* 2003; **23**:5131-5140.
65. Monani UR, McPherson JD, Burghes AH. Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (SMNC and SMNT). *Biochim.Biophys.Acta* 1999; **1445**:330-336.
66. Echaniz-Laguna A, Miniou P, Bartholdi D, Melki J. The promoters of the survival motor neuron gene (SMN) and its copy (SMNc) share common regulatory elements. *Am.J.Hum.Genet.* 1999; **64**:1365-1370.
67. DiDonato CJ, Brun T, Simard LR. Complete nucleotide sequence, genomic organization, and promoter analysis of the murine survival motor neuron gene (Smn). *Mamm.Genome* 1999; **10**:638-641.
68. Germain-Desprez D, Brun T, Rochette C, Semionov A, Rouget R, Simard LR. The SMN genes are subject to transcriptional regulation during cellular differentiation. *Gene* 2001; **279**:109-117.
69. Andreassi C, Patrizi AL, Monani UR, Burghes AH, Brahe C, Eboli ML. Expression of the survival of motor neuron (SMN) gene in primary neurons and increase in SMN levels by activation of the N-methyl-D-aspartate glutamate receptor. *Neurogenetics.* 2002; **4**:29-36.
70. Baron-Delage S, Abadie A, Echaniz-Laguna A, Melki J, Beretta L. Interferons and IRF-1 induce expression of the survival motor neuron (SMN) genes. *Mol.Med.* 2000; **6**:957-968.
71. McBurney MW, Rogers BJ. Isolation of male embryonal carcinoma cells and their chromosome replication patterns. *Dev.Biol.* 1982; **89**:503-508.
72. Rossant J, McBurney MW. The developmental potential of a euploid male teratocarcinoma cell line after blastocyst injection. *J.Embryol.Exp.Morphol.* 1982; **70**:99-112.:99-112.
73. Jones-Villeneuve EM, McBurney MW, Rogers KA, Kalnins VI. Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *J.Cell Biol.* 1982; **94**:253-262.
74. McBurney MW, Reuhl KR, Ally AI, Nasipuri S, Bell JC, Craig J. Differentiation and maturation of embryonal carcinoma-derived neurons in cell culture. *J.Neurosci.* 1988; **8**:1063-1073.
75. Huang, X. and Muller, W. LALIGN finds the best local alignments between two sequences. *Advanced Applied Mathematics* 12, 373-381. Ref Type: Generic

76. Wingender E, Chen X, Fricke E, Geffers R, Hehl R, Liebich I *et al.* The TRANSFAC system on gene expression regulation. *Nucleic Acids Res.* 2001; **29**:281-283.
77. Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res.* 1995; **23**:4878-4884.
78. Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV *et al.* Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res.* 1998; **26**:362-367.
79. Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 1989; **17**:6420.
80. Parks CL, Shenk T. The serotonin 1a receptor gene contains a TATA-less promoter that responds to MAZ and Sp1. *J.Biol.Chem.* 1996; **271**:4417-4430.
81. Komatsu M, Li HO, Tsutsui H, Itakura K, Matsumura M, Yokoyama KK. MAZ, a Myc-associated zinc finger protein, is essential for the ME1a1-mediated expression of the c-myc gene during neuroectodermal differentiation of P19 cells. *Oncogene* 1997; **15** :1123-1131.
82. Maroulakou IG, Bowe DB. Expression and function of Ets transcription factors in mammalian development: a regulatory network. *Oncogene* 2000; **19**:6432-6442.
83. Takahashi T, Sugishita Y, Kinugawa K, Shimizu T, Yao A, Harada K *et al.* Ets-1 is involved in transcriptional regulation of the chick inducible nitric oxide synthase gene in embryonic ventricular myocytes. *Mol.Cell Biochem.* 2001; **226**:57-65.
84. Wanner R, Brommer S, Czarnetzki BM, Rosenbach T. The differentiation-related upregulation of aryl hydrocarbon receptor transcript levels is suppressed by retinoic acid. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1995; **209**:706-711.
85. Gambone CJ, Hutcheson JM, Gabriel JL, Beard RL, Chandraratna RA, Soprano KJ *et al.* Unique property of some synthetic retinoids: activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway. *Mol.Pharmacol.* 2002; **61**:334-342.
86. McLane KE, Whitlock JP, Jr. DNA sequence requirements for Ah receptor/Arnt recognition determined by in vitro transcription. *Receptor* 1994; **4**:209-222.

87. Ito T, Tanahashi H, Misumi Y, Sakaki Y. Nuclear factors interacting with an interleukin-6 responsive element of rat alpha 2-macroglobulin gene. *Nucleic Acids Res.* 1989; **17**:9425-9435.
88. Wegenka UM, Buschmann J, Luttkicken C, Heinrich PC, Horn F. Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol.Cell Biol.* 1993; **13**:276-288.
89. Raghavendra R, V, Dhodda VK, Song G, Bowen KK, Dempsey RJ. Traumatic brain injury-induced acute gene expression changes in rat cerebral cortex identified by GeneChip analysis. *J.Neurosci.Res.* 2003; **71**:208-219.
90. Raghavendra R, V, Bowen KK, Dhodda VK, Song G, Franklin JL, Gavva NR *et al.* Gene expression analysis of spontaneously hypertensive rat cerebral cortex following transient focal cerebral ischemia. *J.Neurochem.* 2002; **83**:1072-1086.
91. Decraene C, Brugg B, Ruberg M, Eveno E, Matingou C, Tahi F *et al.* Identification of genes involved in ceramide-dependent neuronal apoptosis using cDNA arrays. *Genome Biol.* 2002; **3**:RESEARCH0042.
92. Brand C, Segard P, Plouvier P, Formstecher P, Danze PM, Lefebvre P. Selective alteration of gene expression in response to natural and synthetic retinoids. *BMC.Pharmacol.* 2002; **2**:13.
93. Fowlkes DM, Mullis NT, Comeau CM, Crabtree GR. Potential basis for regulation of the coordinately expressed fibrinogen genes: homology in the 5' flanking regions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1984; **81**:2313-2316.
94. Kordula T, Travis J. The role of Stat and C/EBP transcription factors in the synergistic activation of rat serine protease inhibitor-3 gene by interleukin-6 and dexamethasone. *Biochem.J.* 1996; **313**:1019-1027.
95. Campbell GS, Meyer DJ, Raz R, Levy DE, Schwartz J, Carter-Su C. Activation of acute phase response factor (APRF)/Stat3 transcription factor by growth hormone. *J.Biol.Chem.* 1995; **270**:3974-3979.
96. Wu YY, Bradshaw RA. Induction of neurite outgrowth by interleukin-6 is accompanied by activation of Stat3 signaling pathway in a variant PC12 cell (E2) line. *J.Biol.Chem.* 1996; **271**:13023-13032.
97. Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N *et al.* Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997; **94**:3801-3804.

98. Lesbordes JC, Cifuentes-Diaz C, Miroglio A, Joshi V, Bordet T, Kahn A *et al.* Therapeutic benefits of cardiotrophin-1 gene transfer in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum.Mol.Genet.* 2003; **12**:1233-1239.
99. Pavelko KD, Howe CL, Drescher KM, Gamez JD, Johnson AJ, Wei T *et al.* Interleukin-6 protects anterior horn neurons from lethal virus-induced injury. *J.Neurosci.* 2003; **23**:481-492.
100. Laudet V, Hanni C, Stehelin D, Duterque-Coquillaud M. Molecular phylogeny of the ETS gene family. *Oncogene* 1999; **18**:1351-1359.
101. Remy P, Baltzinger M. The Ets-transcription factor family in embryonic development: lessons from the amphibian and bird. *Oncogene* 2000; **19**:6417-6431.
102. Livet J, Sigrist M, Stroebel S, De P, V, Price SR, Henderson CE *et al.* ETS gene Pea3 controls the central position and terminal arborization of specific motor neuron pools. *Neuron* 2002; **35**:877-892.
103. Haase G, Dessaud E, Garces A, de Bovis B, Birling M, Filippi P *et al.* GDNF acts through PEA3 to regulate cell body positioning and muscle innervation of specific motor neuron pools. *Neuron* 2002; **35**:893-905.
104. Ladle DR, Frank E. The role of the ETS gene PEA3 in the development of motor and sensory neurons. *Physiol Behav.* 2002; **77**:571-576.
105. Ghosh A, Kolodkin AL. Specification of neuronal connectivity: ETS marks the spot. *Cell* 1998; **95**:303-306.
106. Kola I, Brookes S, Green AR, Garber R, Tymms M, Papas TS *et al.* The Ets1 transcription factor is widely expressed during murine embryo development and is associated with mesodermal cells involved in morphogenetic processes such as organ formation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993; **90**:7588-7592.
107. Fisher RJ, Koizumi S, Kondoh A, Mariano JM, Mavrothalassitis G, Bhat NK *et al.* Human ETS1 oncoprotein. Purification, isoforms, -SH modification, and DNA sequence-specific binding. *J.Biol.Chem.* 1992; **267**:17957-17965.
108. Watabe T, Yoshida K, Shindoh M, Kaya M, Fujikawa K, Sato H *et al.* The Ets-1 and Ets-2 transcription factors activate the promoters for invasion-associated urokinase and collagenase genes in response to epidermal growth factor. *Int.J.Cancer* 1998; **77**:128-137.

ANNEXES

ANNEXE 1

Amorces PCR des constructions prSMN1-pGL3 et prSmn-pGL3. Constructions promotrices sauvages et mutantes.

Constructions prSMN1-pGL3

<u>Constructions</u>	<u>Objectifs</u>	<u>Amorces</u>	<u>Séquence 5'→3'</u>	<u>positions^d</u>
m107p156	Taille ^a	S 5UTRPstF	gcgctgcagtgagcgacagggcctgagg	-107/-89
	262 nt ^b	AS 5UTRXhoR	gcgctcgagcgggtgctgcagcgtg	+136/+156
m58p156	Délétion 5'	S FD1(BglII)	ggaaggaataataacac	-58/ -51
	49 nt	AS RVp2 (pGL3)	ggaagacgcaaaaacataaag	-
m107p127	Délétion 3'	S RVp3 (pGL3)	gggactgtgcctattttgctag	-
	29 nt	AS RD2 (HindIII)	gccaagcttctcttaagagtgacgactcc	+106/+127
m61p127	Délétion bd ^c	S FD1.2	aaaggaaaggaataataacacagt	-61/-37
	75 nt	AS RD2.2	cttcttaagagtgacgactcc	+106/+127
m61p46	Délétion bd	S FD1.2	aaaggaaaggaataataacacagt	-61/-37
	156 nt	AS 5UTR290R1	cttctcacgctttctacgag	+27/+46
m15p127	Délétion bd	S 5UTR290F2	tgaaaaatatacacgccaca	-15/+5
	121 nt	AS RD2.2	cttcttaagagtgacgactcc	+106/+127
m15p117	Délétion bd	S 5UTR290F2.2	tgaaaaatatacacgccacaaatgt	-15/+10
	131 nt	AS RD2.3	gtgacgactccgccgcc	+103/+117
m15p93	Délétion bd	S 5UTR290F2	tgaaaaatatacacgccaca	-15/+5
	155 nt	AS RD3	ttctgggagcggaacagt	+76/+93

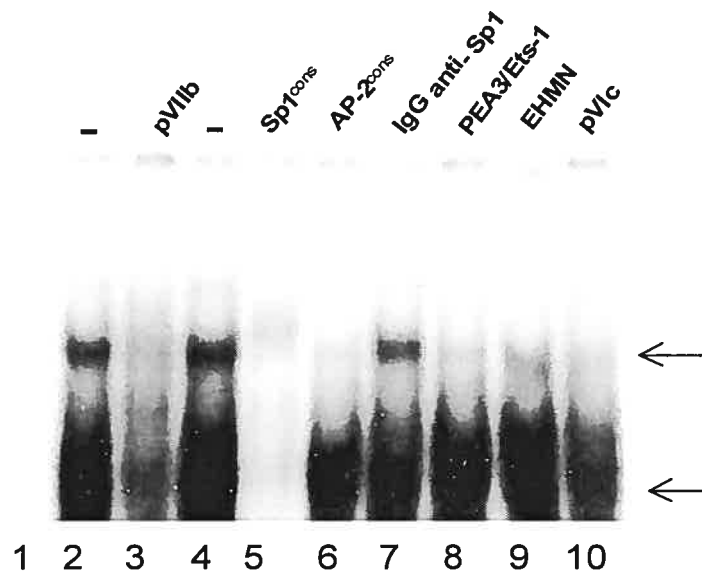
Constructions prSmn-pGL3

<u>Constructions</u>	<u>Objectifs</u>	<u>Amorces</u>	<u>Séquence 5'→3'</u>	<u>positions^d</u>
m105p125	Délétion bd ^c	S mSMNpF1	gcgaggctgacttgaaaaat	-105/-86
	1084 nt	AS mSMNpR1	atgacgactccgcatgg	+108/+125
m46p125	Délétion bd	S mSMNpF2	gaaaacagagggaaggtaaaaa	-46/-23
	1143 nt	AS mSMNpR1	atgacgactccgcatgg	+108/+125

^aTaille de la délétion est déterminée en nucléotides totaux délétés d'après la construction promotrice minimale de départ m107p156 (humain) ou m1173p141 (souris). ^bTaille en nucléotides. ^cDélétion bidirectionnelle côté 5' et côté 3' des promoteur SMN1 et Smn selon la construction promotrice minimale m107p156 (humain) ou m1173p141 (souris). ^dPosition sur le promoteur SMN11 ou Smn.

ANNEXE 2

Gel retard de la sonde pVI : Criblage par compétition froide en gel retard du site candidat +58Sp1 (EMSA).

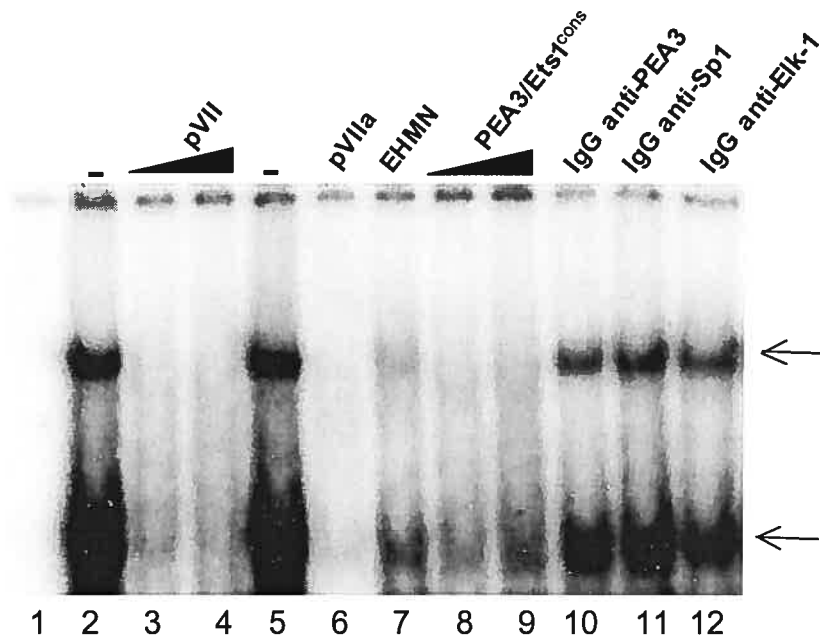


Légende:

Seule la région du gel contenant les complexes ADN-protéine est représentée. L'absence de compétiteurs est indiquée par le signe (-). La piste 1 représente la sonde « libre », visualisée par l'absence d'extraits nucléaires. 4 µg d'extraits nucléaires des cellules P19 (pistes 2 à 10) sont ajoutés au mélange. Les compétitions sont réalisées avec un excès de 200 fois de la sonde non marquée indiquée (pistes 3, 5, 6, 8 et 10, respectivement). □ : indique les complexes spécifiques binaires ADN-protéine.

ANNEXE 3

Gel retard de la sonde pVII : Criblage par compétition froide en gel retard et par « supershift » du site +104Ets.



Légende:

Seule la région du gel contenant les complexes ADN-protéine est représentée. L'absence de compétiteurs est indiquée par le signe (-). 4 µg d'extraits nucléaires des cellules P19 sont ajoutés au mélange sauf pour la piste 7 où 4 µg d'extraits nucléaires des cellules EHMN ont été ajoutés. Les compétitions « froides » avec les sondes non marquées pVII et consensus PEA3/Ets1 sont réalisées avec un excès de 50 et 100 fois, respectivement (pistes 3-4 et 8-9). La compétition « froide » avec la sonde non marquée pVIIa est réalisée avec un excès de 100 fois. □ : indique les complexes spécifiques binaires ADN-protéine.

