



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution à la caractérisation du profil d'expression du gène Necdin-Like2 de *Danio rerio*

Pilka, Yeliz

Award date:
2005

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



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

Faculté des Sciences

**CONTRIBUTION A LA CARACTERISATION DU PROFIL D'EXPRESSION DU GENE
NECDIN-LIKE2 DE *DANIO RERIO***

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licenciée en Sciences biologiques**

Yeliz PILKA
Juin 2005

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

Contribution à la caractérisation du profil d'expression du gène *necdin-like2* du *Danio rerio*

PILKA Yeliz

Résumé

Les gènes *Mage* forment de grandes familles multigéniques dans le génome des mammifères. Les gènes *Mage* « de type I » ne sont exprimés que dans la lignée germinale, et aussi, pour certains d'entre eux, dans le placenta. Ces gènes de type I peuvent être activés dans les cellules cancéreuses où ils peuvent induire l'expression d'antigènes spécifiques. Les *Mage* de type II sont au contraire exprimés dans de nombreux tissus somatiques au cours du développement embryonnaire et chez l'adulte. La fonction des protéines *Mage* reste mal connue, mais au moins certaines d'entre elles (*Mage-d1* et *Necdin*) sont impliquées dans des cascades signalétiques réglant la survie et la mort cellulaire. Le séquençage du génome du poisson zèbre *Danio rerio* a révélé l'existence d'un unique gène *Mage*, *ndnl2*, qui dérive probablement directement du *Mage* « originel » des vertébrés. Au cours de ce travail, nous avons étudié le profil d'expression de *ndnl2* et montré que, chez l'adulte, l'expression est limitée aux cellules germinales postméiotiques de l'ovaire, les ovocytes. Cette observation suggère que *ndnl2* pourrait être impliqué dans la différenciation de la gonade hermaphrodite des poissons juvéniles lorsque celle-ci se différencie en ovaire ou en testicule.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2005

Promoteur: O. De Backer

Je remercie très sincèrement Monsieur De Backer de m'avoir accepté dans son unité de recherche, encadré au cours de ces derniers mois, permis de mener à bien mon mémoire, d'être autonome dans mon travail de recherche, un grand merci pour son aide et pour la correction de mon manuscrit.

Je remercie Dominique, Christiane et le Dr Bertrand de m'avoir aidé et répondu à mes interminables questions durant mon mémoire, merci pour votre disponibilité.

Je remercie le département d'histologie et d'embryologie de m'avoir autorisé à mener la partie histologique de mes expériences dans leur laboratoire et pour leur chaleureux accueil. Je remercie du fond du cœur Raphaël pour son aide, sa gentillesse et tout ce qu'il a pu m'apprendre durant ces derniers mois.

Je remercie également Monsieur Vandenhoute, Madame Raes, Madame Hamer et Monsieur Dauchau d'avoir accepté d'être membre de mon jury et d'avoir lu mon manuscrit.

Je remercie mes parents de m'avoir permis d'entreprendre des études et pour les leur encouragements dont ils ont fait preuve. Je remercie le reste de ma famille pour leurs encouragements et soutien.

Je remercie mon grand-père Osman pour son soutien et la confiance dont il a fait preuve durant mes études.

Je remercie Orane pour son amitié, son aide, son soutien moral, ses encouragements, sa joie de vivre, sa bonne humeur et nos gaindailles... Un grand merci aussi à Jiannos pour sa gentillesse.

Je remercie Selio pour tous ses encouragements durant la période des examens et du mémoire, son soutien moral, son amitié ainsi que Semih pour tout le bonheur qu'il m'apporte.

Je remercie Bérengère, Marie, Coraline et Guillaume pour nos petites pauses, pour nos moments de délires, leurs encouragements, leurs aides durant ces derniers mois.

Je tiens aussi à remercier l'empire bauchau (Cédric, Jon, Stéphane,...), Fred, Vanessa, Jérôme, Julien, Delphine, Philippe, Jenny, hakkanibal, le hall de médecine (Atosha (merci pour tes corrections), François, Oli, Rico, Manu, Amaury, Charlotte, Ludo, « le magnifique » ...).

Merci à tous...

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	acide ribonucléique
BAC	bacterial artificial chromosome
BSA	albumine bovine serum
dATP	déoxyadénosine triphosphate
dCTP	déoxycytosine triphosphate
dGTP	déoxyguanosine triphosphate
dUTP	déoxyuracile triphosphate
dTTP	déoxythymidine triphosphate
DEPC	diethyl pyrocarbonate
DPM	Décharge par minute
dNTP	déoxynucléotides triphosphates
DPM	décharge par minute
E 13.5	13.5 jour postcoïtum
EDTA	ethylenedinitrilotetraacetic acid
ENU	N-ethyl-nitrosourea
GFP	green fluorescent protein
HCl	acide chloridrique
HIS	hybridation <i>in situ</i>
HLA	human leukocyte antigen
HES	hémalun, érythrosine et safran
Kb	kilo bases
KCL	chlorure de potassium
LB	Luria Bertani
LBA	LB + ampicilline
MCD	MAGE conserved domain
Mage	melanoma antigen
H ₂ O	eau
MAGE	gène MAGE humain
MAGE	protéine MAGE humaine
Mage	gène Mage murin
Mage	protéine Mage murine
MM	masse molaire
MOPS	morpholinopropanosulfonique
NaCl	chlorure de sodium
NaOH	hydroxyde de sodium
NH ₄ Ac	acétate d'ammonium
NaAc	acétate de sodium
Na ₂ EDTA	ethylenedinitrilotetraacetic acid disodium salt dihydrate
<i>ndnl2</i>	gène <i>necdin-like2</i>
O/N	overnight
P75 ^{NTR}	recépteur aux neurotrophines p75
PBS	phosphate buffer saline
PFA	paraformaldéhyde

PCR	polymerase chain reaction
Phénol-CIAA	phenol-chloroform isoanyl alcohol
R	reverse
RNase	ribonucléase
rpm	rotation par minute
SDS	sodium lauryl sulfate ou sodium dodecyl sulfate
SSC	standard saline citrate
TA	température ambiante
TAE	Tris acétate EDTA
TE	Tris EDTA
TEA	triéthanolamine
TNF	tumor necrosis factor
U	unité
UV	ultraviolet
V	volt

Table des matières

I.1. LA FAMILLE DES GÈNES <i>MAGE</i>	- 1 -
I.2. CLASSIFICATION DES GÈNES <i>MAGE</i>	- 6 -
I.3. FONCTIONS DES GÈNES <i>MAGE</i>	- 8 -
<i>I.3.2.1. Necdin</i>	- 9 -
<i>I.3.2.2. MAGE-D1</i>	- 9 -
<i>I.3.2.3. MAGE-D2</i>	- 10 -
I.4. <i>DANIO RERIO</i>	- 10 -
I.5. LE GENE <i>MAGE NECDIN-LIKE2</i> DE <i>DANIO RERIO</i>	- 13 -
I.6. LES GONADES CHEZ <i>DANIO RERIO</i>	- 15 -
<i>I.6.3.1. Oocytes périnucléaires</i>	- 19 -
<i>I.6.3.2. Apoptose des oocytes diplotènes dans les gonades non différenciées</i>	- 19 -
<i>I.6.3.3. Apoptose dans les gonades mâles</i>	- 19 -
I.7. OBJECTIFS DU MEMOIRE	- 19 -
II.1. TRANSFORMATION D'<i>ESCHERICHIA COLI</i> (CHOC THERMIQUE)	- 21 -
II.2. CULTURE D'<i>ESCHERICHIA COLI</i>	- 21 -
II.3. PREPARATION D'ADN PLASMIDIQUE	- 21 -
II.4. SEQUENÇAGE D'ADN	- 21 -
II.5. DIGESTION D'ADN PLASMIDIQUE PAR DES ENZYMES DE RESTRICTION	- 22 -
II.6. ÉLECTROPHORESE D'ADN EN GEL D'AGAROSE	- 22 -
II.7. PRÉPARATION D'ARN DU POISSON ZÈBRE	- 22 -
II.8. PRÉPARATION DE LA SONDE UTILISÉE POUR L'ANALYSE EN « NORTHERN BLOT »	- 23 -
II.9. PRÉPARATION DU « NORTHERN BLOT »	- 24 -
II.10. ANALYSE D'ARN PAR "NORTHERN BLOT"	- 25 -
II.11. HYBRIDATION <i>IN SITU</i>	- 26 -
<i>II.11.6.1. Enrobage</i>	- 27 -
<i>II.11.6.2. Microtomisation</i>	- 27 -
<i>II.11.6.3. Etalement des coupes de tissu sur des lames porte-objets</i>	- 28 -
<i>II.11.6.4. Coloration des coupes</i>	- 28 -
II.11.6.4.1. Déparaffinage et hydratation	- 28 -
II.11.6.4.2. Coloration à l'hémalum, à l'érythrosine et au safran	- 28 -
➤ Coloration des noyaux.....	- 28 -
➤ Coloration du cytoplasme.....	- 28 -
➤ Coloration du tissu conjonctif.....	- 28 -
II.11.6.4.3. Montage des lames porte-objets	- 28 -
<i>II.11.12.1. Sur film photographique</i>	- 29 -
<i>II.11.12.2. Par trempage dans une émulsion photographique</i>	- 29 -
II.11.12.2.1. Développement des lames recouvertes d'émulsion photographique	- 29 -
II.11.12.2.2. Coloration des coupes après développement photographique.....	- 30 -
II.11.12.2.3. Montage.....	- 30 -
II.12. SOLUTIONS	- 30 -
III.1. PURIFICATION DE PBLUESCRIPT KS+NDLN2	- 32 -
III.2. ÉTUDE DU PROFIL D'EXPRESSION DE <i>NDNL2</i>	- 33 -
III.3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	- 55 -

Introduction

I.1. La famille des gènes *MAGE*

C'est en 1991 que l'histoire des gènes *MAGE* a débuté lorsque l'équipe de Thierry Boon du Ludwig Institute for Cancer Research identifia l'existence du gène humain, *MAGE-A1*, pour Melanoma AntiGEN, qui spécifie un peptide antigénique exprimé par une lignée cellulaire de mélanome humain. Ce peptide, présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité HLA-A1, est reconnu par des lymphocytes T cytotoxiques autologues. *MAGE-A1* s'étend sur 4.5 kb et est constitué de trois exons de 65, 73 et 1552 pb. Seul le dernier exon est codant et il spécifie une protéine de 309 acides aminés.

Des expériences d'hybridation de « Southern blot » d'ADN génomique utilisant *MAGE-A1* comme sonde révélèrent plusieurs bandes, ce qui suggérait l'existence d'une famille de gènes apparentés (van der Bruggen *et al.*, 1991). Ces gènes furent baptisés *MAGE-A1* à *-A12*. Ils sont organisés en un chapelet localisé au niveau de la région distale du grand bras du chromosome X. Le pourcentage de nucléotides identiques entre le dernier exon de *MAGE-A1* et ceux des onze autres *MAGE-A* varie entre 64% et 85%. La figure 1 représente la structure des douze gènes *MAGE-A* qui sont tous caractérisés par le fait que seul le dernier exon est codant.

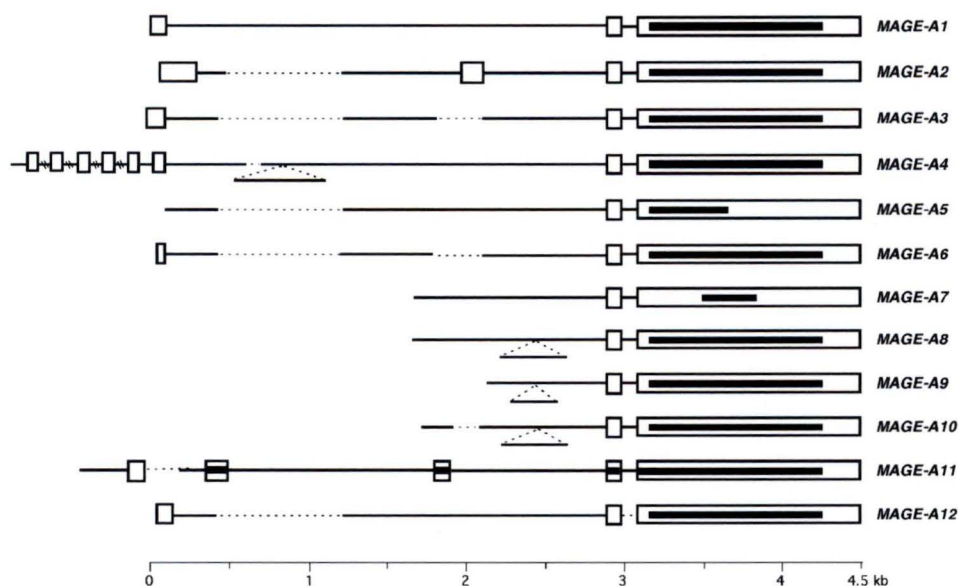


Figure 1. Structure des 12 gènes *MAGE*. Les boîtes indiquent des exons, les pointillés indiquent des délétions, les lignes sous les gènes indiquent des insertions et les parties hachurées indiquent la phase ouverte de lecture. D'après De Plaen *et al.*, 1994.

Ces gènes sont exprimés dans des tumeurs de types histologiques divers mais pas dans les tissus normaux adultes à l'exception du testicule et, pour certains d'entre eux, du placenta (De Plaen *et al.*, 1994).

Depuis le début des années 1990, de nombreux autres membres de la famille des gènes *MAGE* ont été identifiés. Ces gènes ont été classés en sous-familles sur base de leur localisation chromosomique et leurs similarités de séquence (Figure 2).

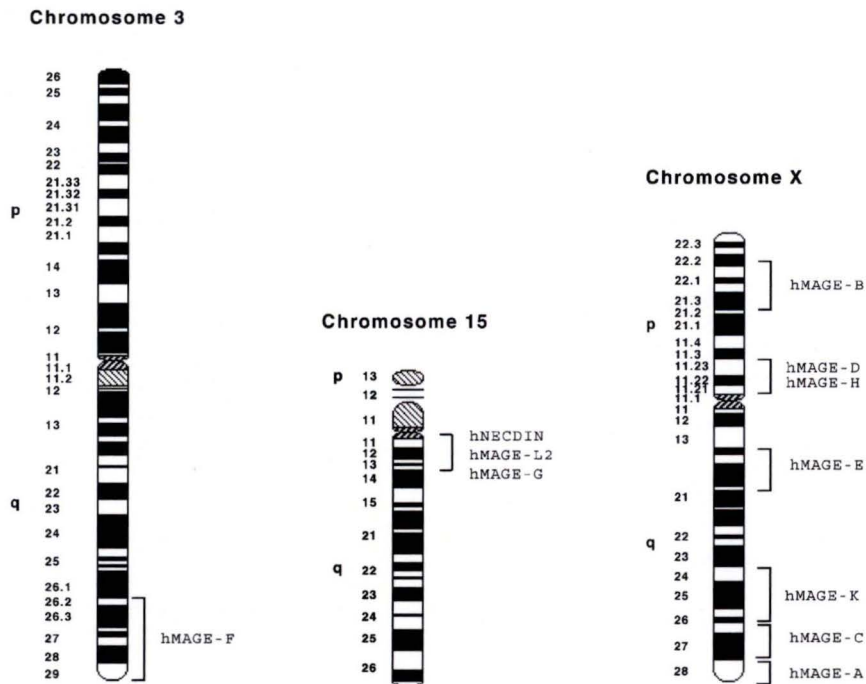


Figure 2. Localisation chromosomique des sous-familles des *MAGE* chez l'homme. D'après Chomez *et al.*, 2001.

En 2001, le séquençage complet du génome humain et de celui de la souris a permis d'identifier l'ensemble des gènes *MAGE* de ces deux espèces qui en comptent respectivement 55 et 31 (Tableau 1).

Tableau 1
Les gènes *MAGE* de l'homme et de la souris.
D'après Chomez *et al.*, 2001.

La comparaison des séquences de toutes les protéines MAGE montre l'existence d'un domaine conservé d'environ deux cents acides aminés, nommé « MAGE Conserved Domain » (MCD). Ce domaine est la seule région d'homologie partagée par tous les membres de la famille MAGE et est localisé du côté carboxy-terminal sauf dans les protéines MAGE-D où il occupe une position centrale. Les protéines MAGE-E1 et -E2 contiennent deux MCD. Le MCD ne présente pas d'homologie significative avec d'autres protéines que les MAGE (Figure 3 et 4). Les membres d'une même sous-famille se ressemblent aussi entre eux en dehors du MCD (Chomez *et al.*, 2001).

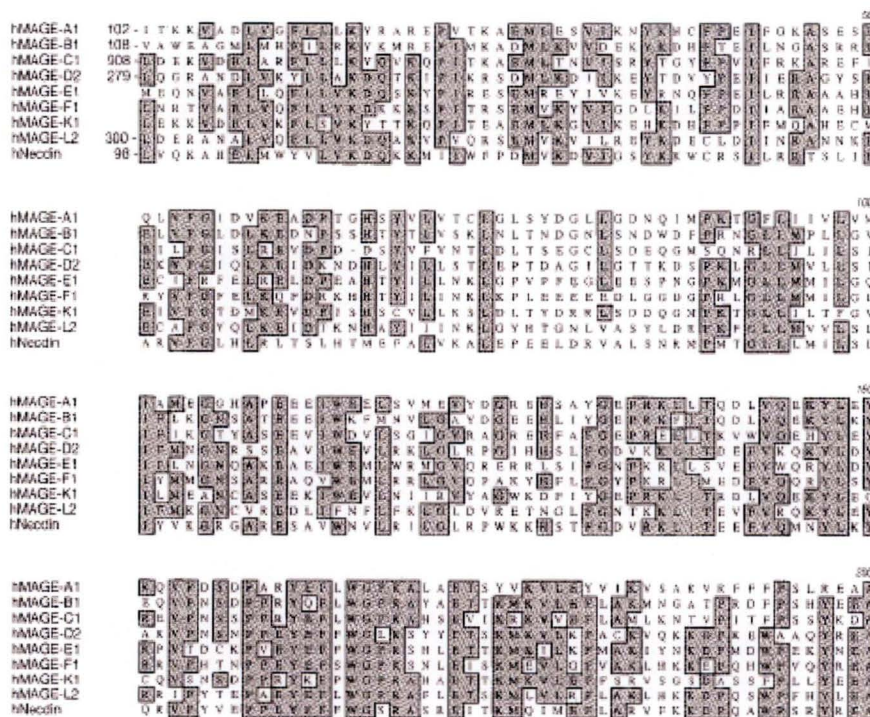


Figure 3. Comparaison de séquence entre les MCD de différentes protéines MAGE. D'après Chomez *et al.*, 2001.

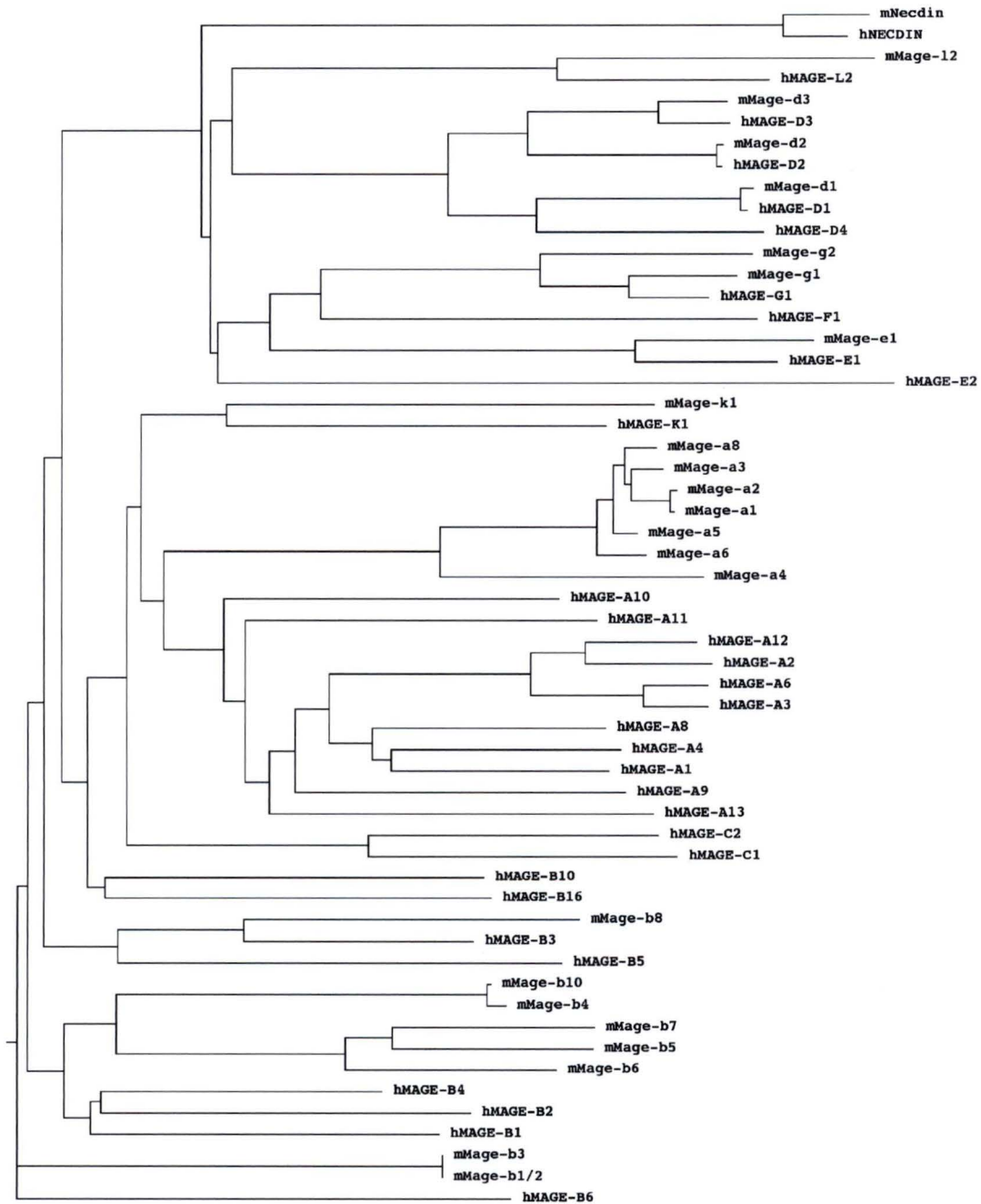


Figure 4. Représentation des alignements multiples entre les MCD des protéines MAGE humaines et murines. D'après Chomez *et al.*, 2001.

I.2. Classification des gènes *MAGE*

Chez les mammifères, les gènes *MAGE* peuvent être répartis en deux catégories selon leur profil d'expression : les *MAGE* de type I et ceux de type II (Barker and Salehi, 2002).

I.2.1. Les *MAGE* de type I

Cette première catégorie comporte les gènes *MAGE-A*, *-B* et *-C*, respectivement au nombre de 15, 17 et 7 chez l'homme et sont caractérisés par un exon terminal spécifiant toute la protéine (Chomez *et al.*, 2001). Ils sont tous localisés sur le chromosome X et sont silencieux dans les tissus adultes normaux à l'exception des cellules germinales mâles et, pour certains, du placenta. Par contre, ils sont exprimés dans une proportion variable de différentes tumeurs cancéreuses (Chomez *et al.*, 2001; Lucas *et al.*, 2000; Lurquin *et al.*, 1997). Certains de ces gènes *MAGE* de type I spécifient des protéines dont la dégradation par le protéasome génère des peptides antigéniques de huit à dix acides aminés présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I par les cellules tumorales (Van Der Bruggen *et al.*, 2002).

Les testicules sont les seuls organes normaux adultes où la plupart des *MAGE* de type I sont exprimés. Des hybridations *in situ* montrent que les *MAGE-a* et *-b* sont exprimés dans les cellules germinales mâles. Les *MAGE-a* sont exprimés dans les spermatogonies (les cellules préméiotiques situées du côté basal des tubules séminifères) ; les *MAGE-b* (*-b1*, *-b2* et *-b3*) sont exprimés dans les spermatides (les cellules haploïdes qui vont se différencier en spermatozoïdes). L'expression des *MAGE-a* et *-b* est donc régulée au cours de la spermatogenèse. Les cellules somatiques du testicule (cellules de Leydig et les cellules de Sertoli) n'expriment pas les *MAGE* (Clotman *et al.*, 2000). Par contre, *MAGE-d4* est exprimé dans les cellules germinales femelles.

L'activation des gènes *MAGE* dans les cellules tumorales n'est pas due à des facteurs de transcription spécifiques des tumeurs ou du testicule. En effet, les facteurs de transcription Ets et Sp1 qui transactivent les *MAGE* de type I sont ubiquistes et actifs aussi bien dans les cellules normales que tumorales. Le contrôle transcriptionnel de ces gènes est gouverné par l'état de méthylation de la région promotrice. La déméthylation de l'ADN que l'on observe souvent dans les tumeurs serait responsable de l'activation des *MAGE* de type I et serait suffisante pour activer ces gènes dans des lignées cellulaires tumorales.

Différentes observations appuient cette hypothèse. Des traitements avec la 5-aza-2'-déoxycytidine (un agent déméthylant) activent l'expression de gène *MAGE-A1* dans des cellules normales n'exprimant normalement pas ce gène, y compris des cellules normales (De Smet *et al.*, 1996; Lurquin *et al.*, 1997). Ce phénomène a aussi été observé pour d'autres gènes spécifiques des tumeurs comme *GAGE*, *BAGE*, *PIA*, qui présentent le même profil d'expression que les *MAGE* (De Backer *et al.*, 1999; De Smet *et al.*, 1996).

Comme les cellules de la lignée germinales mâle n'expriment pas les molécules HLA, ces cellules ne présentent pas d'antigène *MAGE*. Par conséquent, ces antigènes sont

spécifiques des tumeurs et ont un intérêt particulier pour l'immunothérapie antitumorale (Boon *et al.*, 1994; Chomez *et al.*, 2001).

I.2.2. Les *MAGE* de type II

Les *MAGE* de type II sont exprimés dans de nombreux tissus somatiques normaux au cours du développement et chez l'adulte. Parmi, ces gènes, les *MAGE-D* possèdent une structure chromosomique qui les distingue de tous les autres gènes *MAGE* : ils possèdent treize exons et le MCD est encodé par les exons 5 à 11 (Figure 5).

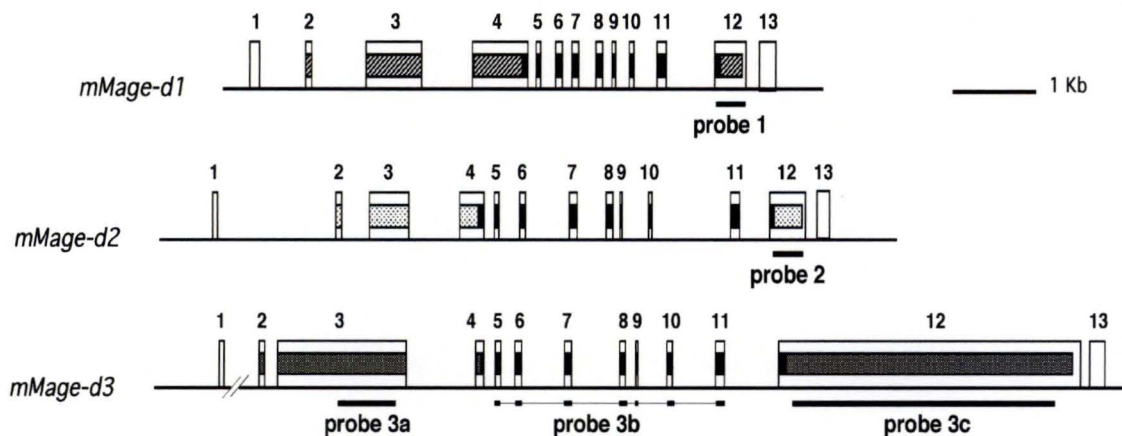


Figure 5. Structure genes *Mage-d1*, *-d2* et *-d3* de la souris. L'ORF est représenté par des boîtes et le MCD en noir. D'après Chomez *et al.*, 2001.

Ils sont caractérisés par une phase ouverte de lecture allant de l'exon 2 à l'exon 12. La sous-famille *MAGE-D* comprend quatre gènes chez l'homme et trois chez la souris. Ils sont, comme les types I, situés sur le chromosome X (Figure 2) (Chomez *et al.*, 2001; Lucas *et al.*, 1999).

Des analyses semiquantitatives ont montré que les trois gènes *Mage-d* des souris sont exprimés à différents niveaux dans divers tissus (Figure 6). Chez la souris, *Mage-d1* est fortement exprimé dans de nombreux tissus et en particulier dans le cerveau et les ovaires chez l'adulte. *Mage-d2* est exprimé principalement dans les ovaires et durant le développement embryonnaire. *Mage-d3* est exprimé spécifiquement dans le cerveau et aussi exprimé dans l'embryon (Chomez *et al.*, 2001).

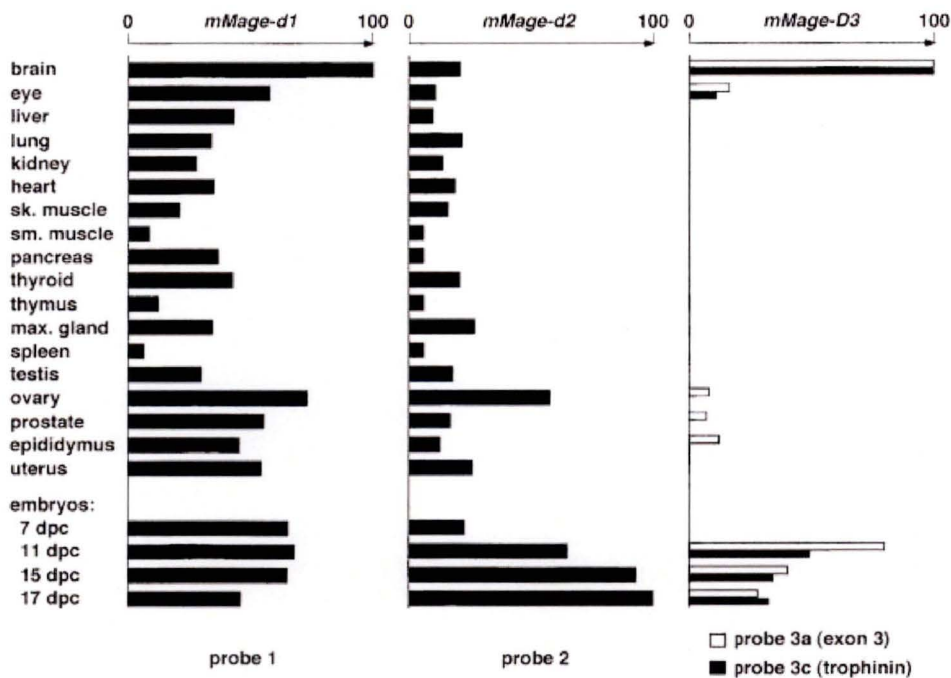


Figure 6. Analyse semiquantitative de l'expression des trois gènes *Mage-d*. D'après Chomez *et al.*, 2001.

Le profil d'expression de *Mage-d1*, *-d2* et *-d3* a été étudié par hybridation *in situ* à différents stades de développement embryonnaire et au cours du développement cérébral post-natal chez la souris afin de localiser l'expression au niveau cellulaire. L'expression de *Mage-d3* est restreinte au système nerveux central où il est abondamment détecté dans les neurones post-mitotiques. *Mage-d2* est principalement exprimé dans les tissus d'origine mésodermique alors que l'expression de *Mage-d3* résume l'expression de *Mage-d1* et *-d2* (Bertrand *et al.*, 2004).

I.3. Fonctions des gènes *MAGE*

I.3.1. Les *MAGE* de type I

Les testicules sont les seuls organes adultes normaux où la plupart des *MAGE* de type I (*-A*, *-B* et *-C*) sont exprimés. Ces observations suggèrent que ces gènes jouent un rôle dans la spermatogenèse (Clotman *et al.*, 2000).

Les *MAGE* de type I sont aussi exprimés dans différentes tumeurs cancéreuses suggérant qu'ils puissent avoir un rôle d'oncogène. Les fonctions possibles des *MAGE* de type I dans le testicule et dans les tumeurs pourraient être médiées au niveau transcriptionnel. En effet, on a pu montrer que *MAGE-A1* inhibe l'activité d'activateur transcriptionnel de *Notch1* (partie intracellulaire) en interagissant avec la protéine *SKIP* qui sert d'adaptateur entre *Notch1* et les protéines liant l'ADN (Laduron *et al.*, 2004).

L'identification des gènes *Mage* de souris homologues à ceux de l'homme permet d'étudier les fonctions des protéines *Mage* par une approche génétique consistant à obtenir

des animaux dans lesquels ces gènes ont été inactivés. Notre laboratoire a construit des souris « knock-out » pour différents *Mage*. Cette technique permet d'étudier les rôles physiologiques d'une protéine en observant les conséquences d'une déficience pour cette protéine dans un organisme entier. La mutation est introduite dans le génome de la souris par une recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires capables de se différencier en gamètes capables de transmettre la mutation aux générations suivantes.

Des souris « knock-out » pour *Mage-b1* et *Mage-b2* (deux gènes spécifiant la même protéine) ont été obtenues dans notre laboratoire. Ces mutants sont viables, ne présentent pas d'anomalie au niveau des testicules et se reproduisent normalement. La délétion du gène *Mage-b3* qui spécifie une protéine très semblable aux protéines *Mage-b1* et *Mage-b2*, et qui est exprimé aussi dans les spermatozoïdes, est en cours au laboratoire afin de réaliser des triples mutants.

I.3.2. Les *MAGE* de type II

I.3.2.1. *Necdin*

Necdin est exprimé dans les neurones post-mitotiques du système nerveux central et périphérique chez le rat et la souris adultes (Tcherpakov *et al.*, 2002). *Necdin* interviendrait pour maintenir les neurones dans un état post-mitotique (Stone *et al.*, 2001). Récemment, il a été montré que *necdin* aurait un rôle dans la croissance neuritique (Lee *et al.*, 2005).

Necdin pourrait être impliqué dans le syndrome de Prader-Willi, un trouble neurogénétique complexe causé par des défauts au niveau de l'hypothalamus et résultant de grandes délétions couvrant la région q-11 et q-13 du chromosome 15 paternel où sont situés *NECDIN* et *MAGE-L2*. Les manifestations cliniques sont diverses (petite taille, atrophie des organes génitaux externes, retard mental, problèmes comportementaux,...) et les données montrent qu'il s'agit d'une syndrome multigénique. Les souris mutées pour *Necdin* présentent une réduction en neurones produisant l'ocytocine et la LHRH (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone) dans l'hypothalamus, un retard de croissance et d'une détresse respiratoire néonatale, des caractéristiques observées dans le syndrome de Prader-Willi (Muscatelli *et al.*, 2000).

I.3.2.2. *MAGE-D1*

Des expériences de double hybride montrent une interaction entre *MAGE-D1*¹ et le récepteur aux neurotrophines p75, un membre de la super famille des récepteurs TNF. Le récepteur p75 active des cascades signalétiques mal connues qui favorisent soit la survie soit la mort des cellules en fonction du contexte cellulaire. *MAGE-D1* interagirait aussi avec des protéines à homéodomains de la famille *Dlx/Msx* et régulerait la fonction transcriptionnelle de *Dlx5* (Masuda *et al.*, 2001). Les protéines *Dlx* et *Msx* jouent un rôle important au cours du développement du squelette. Les *Msx* sont des répresseurs transcriptionnels alors que les *Dlx* sont des activateurs transcriptionnels. La partie de *MAGE-D1* qui interagit avec ces homéoprotéines n'est pas le MCD mais un domaine appelé « interspersed repeat domain ». Ce domaine « interspersed repeat domain » interagit aussi avec les protéines inhibitrices de l'apoptose IAP et XIAP (Jordan *et al.*, 2001).

¹ Aussi appelé NRAGE et DLXIN.

Différentes observations réalisées *in vitro* indiquent que *Mage-d1* est un régulateur favorisant l'apoptose (Barker and Salehi, 2002). Récemment, notre laboratoire a obtenu des souris « knock-out » pour *Mage-d1* et a observé que ces souris naissent, se développent et se reproduisent normalement. Ces observations montrent que *Mage* n'est pas essentielle au développement de la souris. Par contre, les souris déficientes pour *Mage-d1* sont marquées par une réduction de l'apoptose au niveau des motoneurons médullaires et des neurones sensoriels des ganglions dorsaux au cours du développement (E 13.5). Ces observations montrent que *Mage-d1* a des effets pro-apoptotiques *in vivo*. Un phénotype semblable est observé chez les souris déficiente en $p75^{\text{NTR}}$, ce qui appuie l'hypothèse qui veut que *Mage-d1* soit impliqué dans le signal pro-apoptotique émanant de $p75$ (Mathieu Bertrand, communication personnelle).

I.3.2.3. *MAGE-D2*

Actuellement, aucune donnée *in vitro* sur la protéine *MAGE-D2* n'a été publiée. Des souris « knock-out » pour *Mage-d2* ont été obtenues dans notre laboratoire. Les animaux déficients en *Mage-d2* sont très anémiques et meurent dans les 24 heures qui suivent la naissance.

La comparaison des structures intron/exon des gènes *MAGE-D* et des autres gènes *MAGE* indique que les gènes *MAGE* « non D » sont des rétrogènes issus d'événements de rétroposition. Ceci indique qu'un ou plusieurs gènes *MAGE* ancestraux de type « D » auraient été générés, par rétroposition et duplication, tous les autres membres de la famille *MAGE* (Chomez *et al.*, 2001). Ces rétropositions et ces duplications se seraient produites chez les mammifères. En effet, les génomes de plusieurs vertébrés non mammaliens (le poisson zèbre, le poisson ballon, le poulet) ne contiennent chacun qu'un seul gène *MAGE* qui ont tous une structure multiexonique semblable à celle des *MAGE-D* des mammifères. L'unique gène *Mage* du poisson zèbre fait de cet animal un modèle attrayant pour étudier la fonction des *MAGE* chez les vertébrés. En effet, on peut aisément imaginer qu'une redondance fonctionnelle puisse exister entre les différents gènes *Mage* chez la souris. Cette redondance pourrait compenser la perte de fonction induite par l'inactivation d'un gène *Mage*. C'est pour cette raison que nous nous sommes intéressés au gène *Mage* du *Danio rerio necdin-like2 (ndnl2)*.

I.4. *Danio rerio*

I.4.1. Caractéristiques générales

Le *Danio rerio*, plus communément appelé poisson zèbre (Figure 7) est un poisson téléostéen appartenant, comme la truite et le saumon, à la classe des Ostéichthyens actinoptérygiens et plus précisément au super-ordre des Ostariophysaires (Nüsslein Volhard, 2002).

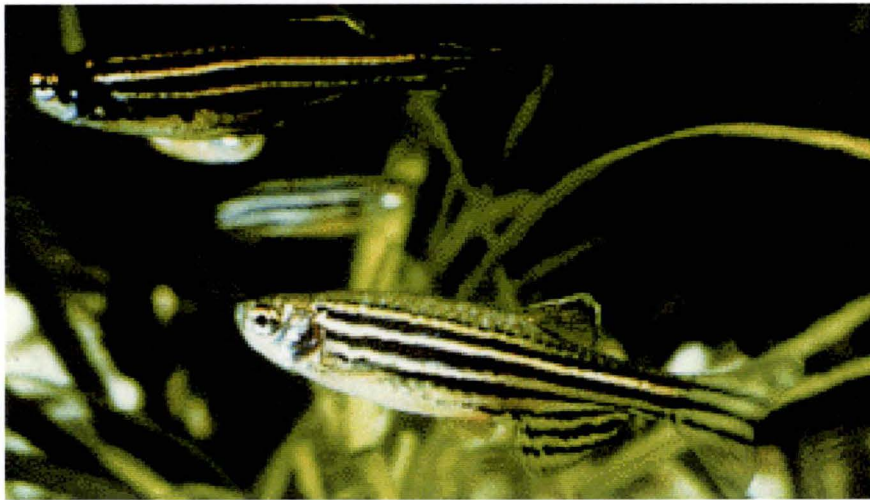


Figure 7. Image du *Danio rerio*. (<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/Z/Zebrafish.html>).

Ce poisson osseux a une reproduction externe et est ovipare, le développement de l'œuf et l'éclosion se déroulant dans l'environnement externe (Blackburn, 1999). La vie du poisson zèbre est divisée en trois stades : larvaire, juvénile et adulte (Tableau 2). La période larvaire débute 72 heures après la fertilisation c'est-à-dire 24 heures après l'éclosion de l'œuf (Nüsslein Volhard, 2002)

Tableau 2
Stade de développement du *Danio rerio*. D'après Nüsslein-Volhard, 2002.

Période	Jour (taille)	Description
Jeune larve	3 (3.5 mm)	Capacité de nager et de s'orienter
Larve	14 (6 mm)	Vessie natatoire et croissance
Juvénile	30 (1cm)	Nageoire adulte
Jeune adulte	90 (2cm)	Reproduction
Espérance de vie	1000 (4-5 cm)	Mort

I.4.2. *Danio rerio*, un organisme modèle

Le poisson zèbre est devenu en peu de temps un organisme modèle pour les biologistes dans divers domaines y compris la biologie du développement (Cooper, 2003). Les études sur le *Danio rerio* ont débuté dans les années 70 lorsque George Streisinger de l'université d'Oregon prit ce poisson comme modèle animal pour l'étude du développement des vertébrés. Il fit ce choix pour différentes raisons. Ce poisson facile à se procurer, a une reproduction aisée et un développement rapide, de plus la transparence de l'embryon permet l'observation

de l'organogenèse. De la fertilisation *in vitro* à l'établissement de lignée homozygote, Streisinger exploitât les différentes possibilités de manipulations génétiques sur cet organisme. Plus tard, des méthodes de mutagenèse à haute efficacité avec la **N-ethyl-nitrosourea** furent développées. Des cribles à grande échelle ont permis de caractériser près de 2000 mutants (Nüsslein Volhard, 2002) parmi lesquels certains présentent des traits phénotypiques semblables à ceux qu'on peut observer dans certaines maladies humaines (Tableau 3) (Fraenkel, 2003). Dans ce type d'expériences, les mâles sont exposés à un agent mutagène dans le but d'obtenir des embryons portant toute une gamme de mutations.

Tableau 3
Exemple de mutants du poisson zèbre ayant des relevances avec des maladies humaines.
D'après Cooper, 2003.

Mutant	Phenotype	Analogous human disease	Mutated zebra fish gene
Zinfandel	Defective early globin expression with recovery in the adult	Thalassemia	Regulator of globin expression
Sauternes	Hypochromic anemia with declining blood counts	X-linked sideroblastic anemia	δ -Aminolevulinatase synthase
Yquem	Photosensitive, autofluorescent erythrocytes. Absent blood when constantly exposed to light	Hepatoerythropoietic porphyria	Uroporphyrinogen decarboxylase
Riesling	Arrest of erythrocyte differentiation with declining numbers of erythrocytes after 72 h	Hereditary spherocytosis	β -Spectrin
Gridlock	Absent circulation to the tail. Inability of the lateral dorsal aortas to fuse	Coarctation of the aorta	Gridlock/basic helix-loop-helix protein
Double bubble	Glomerular cysts. Alterations in the glomerular basement membrane and altered localization of Na^+/K^+ ATPase	Autosomal dominant polycystic kidney disease	Unknown
Fleer	Glomerular cysts. Alterations in the glomerular basement membrane and altered localization of Na^+/K^+ ATPase. Eye degeneration	Autosomal dominant polycystic kidney disease. Senior-Loken syndrome (combined retinal and renal dysplasia)	Unknown
Elipsa	Glomerular cysts. Eye degeneration	Autosomal dominant polycystic kidney disease. Senior-Loken syndrome (combined retinal and renal dysplasia)	Unknown
One-eyed pinhead	Cyclopia. Notochord present, but lacks prechordal plate and ventral neuroectoderm	Holoprosencephaly	One-eyed pinhead/EGF-related ligand

Le poisson zèbre est aussi un bon modèle animal pour l'étude *in vivo* de l'apoptose. En effet, de nombreuses voies apoptotiques sont bien conservées d'un point de vue évolutif entre le poisson zèbre et les vertébrés supérieurs étant donné qu'il existe des homologues au niveau des gènes de régulateurs de l'apoptose (Inohara and Nunez, 2000; Yamashita, 2003).

Cet organisme est très utile pour l'étude de la fonction des gènes. Il suffit d'injecter aux embryons des oligonucléotides anti-sens chimiquement modifiés, morpholinos, pour inhiber la traduction des ARNm (Cooper, 2003). En outre, la création de poissons zèbres transgéniques exprimant la GFP permet l'étude des lignées cellulaires et la devenir durant le développement embryonnaire (Fraenkel, 2003).

Les études et les publications sur le poisson zèbre ne cessent d'augmenter. Plus de 300 laboratoires utilisent aujourd'hui ce poisson dans leurs études (Nüsslein Volhard, 2002) portant sur le développement du système nerveux, du cœur,...

I.4.3. Séquençage du génome du *Danio rerio*

En février 2001, le centre Sanger de Cambridge entreprit de séquencer le génome de *Danio rerio*. Celui-ci comporte $1,7.10^9$ paires de bases (Cooper, 2003; Nüsslein Volhard, 2002) et 25 chromosomes (1N) mais le nombre exacte de gènes est actuellement inconnu (Nüsslein Volhard, 2002). Les chromosomes sexuels n'ont pas encore été identifiés (Uchida *et al.*, 2002).

Pour réaliser ce séquençage, deux approches ont été utilisées : le séquençage de clones BAC et PAC cartographiés et le « shotgun » (http://www.sanger.ac.uk/Projects/D_rerio/).

Le séquençage du génome de nombreux organismes dont celui de *Danio rerio* montre la contribution des phénomènes de duplications des gènes à haute échelle et du génome complet dans l'expansion des familles de gènes et dans l'évolution du génome. La présence de sept clusters de gènes Hox chez le poisson zèbre est la preuve d'une duplication génomique puisqu'il n'en existe que quatre chez l'homme et la souris. Cette duplication aurait eu lieu après la divergence des poissons osseux et cartilagineux mais avant la radiation des poissons téléostéens. De plus, les analyses phylogénétiques et les études de cartographie génétique chez le poisson zèbre appuient l'hypothèse d'une duplication génomique qui se serait produite il y a 300 millions d'années, au début de l'évolution des poissons osseux. L'existence de deux à cinq set de gènes dupliqués sur dix des vingt-cinq chromosomes du *Danio rerio* renforce ce postulat (Taylor *et al.*, 2003).

I.5. Le gène *Mage necdin-like2* de *Danio rerio*

Comme on l'a vu plus haut, le MCD est le domaine partagé par toutes les protéines MAGE de mammifères. Un crible par BLAST du génome du poisson zèbre à l'aide d'une « sonde » correspondant au MCD de Mage-d1 indique la présence d'un gène *Mage* unique chez ce poisson. Nous disposions au laboratoire d'un fragment d'ADNc de ce gène, appelé *necdin-like2* (*ndnl2*), identifié par hybridation d'une bibliothèque d'ADNc. Ce fragment a été utilisé comme sonde dans les expériences d'hybridation réalisées au cours de ce travail. Au laboratoire, nous avons déterminé la séquence complète de l'ADNc de *ndnl2* par amplification rapide des extrémités de l'ADNc. La protéine spécifiée par l'ORF de *ndnl2* est longue de 260 acides aminés. On peut les décomposer entre une partie amino-terminale de cinquante acides aminés qui ne ressemble à aucune autre protéine, un MCD de deux cents acides aminés et une queue carboxy-terminale de dix acides aminés (Figure 8).

```

ClustalW (v1.4) multiple sequence alignment

2 Sequences Aligned           Alignment Score = 856
Gaps Inserted = 7             Conserved Identities = 117

Pairwise Alignment Mode: Slow
Pairwise Alignment Parameters:
  Open Gap Penalty = 10.0      Extend Gap Penalty = 0.1
  Similarity Matrix: blosum

Multiple Alignment Parameters:
  Open Gap Penalty = 10.0      Extend Gap Penalty = 0.1
  Delay Divergent = 40%       Gap Distance = 8
  Similarity Matrix: blosum

Processing time: 0.2 seconds

Mage-d2 (souris  1 MSDTSESGADPARSQKASEKDSGSVMQDLLTQVTONLEVSETPKAEKAPE  50
Ndnl2           1
Mage-d2 (souris 51 VSEAAKAPKASGNPKATEVSKAPEASEAAAATQASPTTQLSETQVLATENK 100
Ndnl2           1 MSQRKKATSASQN----- 13
                *. ** ** *
Mage-d2 (souris 101 SPAADTKTQKSDLQAMTPTTPTKKVSCGTDPKVNTKAPETEAPASQAGT 150
Ndnl2           14 -----KTQRR-----SLLL 23
                *** **
Mage-d2 (souris 151 DEPEPEGTAVQVQENQDTRPKVKAKNTQKGKHPDGEEDGNSDQSQASEAT 200
Ndnl2           24 EE-----D--EDANFSQITSSQAQ 40
                . * * * * * . * *
Mage-d2 (souris 201 GGRRVSKALMASMARRASRGPIAFWARRASRTRLAAWARRALLSLRSRA 250
Ndnl2           41 -----RA 42
                **
Mage-d2 (souris 251 RRGKARRRAAKLQSSQEPEAPPPRDVALLQGRANDLVKYLAKDQTKIPI 300
Ndnl2           43 REN-----FTSDQ-----IDHKVAEVVQFILIKDQKKIPI 72
                * . * * * * * * * * * * * * * * * *
Mage-d2 (souris 301 RRSDMLKDIIKEYTDVYPEIIERAGYSLEKVFQIQLKEIDKNDHLYILLS 350
Ndnl2           73 RRADIGKHVIKDYKHIYAEVMNRVCRTEFEQVFGKLVKVEIDLKQHIYILIN 122
                **.* * **.* * * * * * * * * * * * * * * * *
Mage-d2 (souris 351 TLEPTDAGILGTTKSPKLGLLMVLLSII FMNGNRSSEAVIWEVLRKLG 400
Ndnl2           123 KLEPIRGQTVSMHPGNPKMGLLFVILSVIFMKGGTIKENLVWNTLKKLRL 172
                *** . * * * * * * * * * * * * * * * *
Mage-d2 (souris 401 RPGIHHSFLFGDVKKLITDEFVKQKYLDYARVPNSNPPEYEFFWGLRSYYE 450
Ndnl2           173 DPGEKHDEFDGVKKVVTEEFVRQKYLEYKIPHTEPVEYEFRWGLRAEKE 222
                ** . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Mage-d2 (souris 451 TSKMKVLKFAACKVQKDPKEWAAQYREAMEADLKAAAEAAAEAKARAEIR 500
Ndnl2           223 VSKLKLLEFVVGELFDQDPQNWTOQFREASTSGTSSQST 260
                * * * * * * * * * * * * * * * *
Mage-d2 (souris 501 AQMGIGLGSENAAGPCNWDEADIGPWAKARIQAGAETKAKAQGSGGANAS 550
Ndnl2           261
Mage-d2 (souris 551 AGASGGFSNSSLTASLTFGLFAGLSGAGASTNSSSGACGFSYK 594
Ndnl2           261

```

Figure 8. Alignement de séquence du gène Mage-d2 de la souris et le gène ndnl2 du poisson zèbre. Les étoiles représentent des acides aminés identiques et les points représentent des acides aminés semblables

Chez le *Danio rerio*, l'expression de *ndnl2* a été analysée au cours du développement du système nerveux. Trois à cinq jours après l'éclosion, ce gène est déjà exprimé au niveau de la rétine. Quatorze jours après l'éclosion, l'expression est toujours présente dans la rétine mais aussi au niveau de la zone marginale du cerveau en développement et ce jusque chez l'adulte de sept semaines. A partir du quatorzième jour après la fertilisation et jusque chez l'adulte de sept semaines, une expression est détectée dans le télencéphale. La zone périventriculaire du cordon spinal montre aussi de l'expression au quatorzième jour après la fertilisation (Bischof *et al.*, 2003).

I.6. Les gonades chez *Danio rerio*

I.6.1. Les ovaires

L'ovaire du poisson zèbre est bilobé et est de type cystovarien. Au moment de l'ovulation, les œufs tombent dans la lumière de l'ovaire qui est en continuité avec un « oviducte » de petite taille menant à une ouverture urogénitale. La paroi ovarienne contient du muscle lisse et est entourée d'un fin épithélium. L'ovaire est organisé en lamelles qui contiennent les follicules à différents stades de développement, les follicules atrétiques et les follicules postovulatoires.

Les oogonies et les oocytes méiotiques (cellules germinales jeunes) sont localisés dans le stroma ovarien. Ces cellules sont caractérisées par un cytoplasme peu important et contiennent peu d'organites autres que les mitochondries. Durant la croissance, les oocytes résident dans des follicules ovariens. Chaque follicule contient un oocyte entouré d'une couche de cellules somatiques (non-germinales). Le développement oocytaire est divisé en cinq stades chez le poisson zèbre sur base de critères morphologiques et des phénomènes physiologiques et biochimiques :

- 1) Stade de croissance primaire caractérisé par une croissance de l'oocyte, un arrêt dans la phase diplotène de la première division méiotique. L'oocyte réside alors à l'intérieur d'un follicule (une couche de cellules folliculaires), les organites prolifèrent (Figure 9).
- 2) Stade alvéolaire cortical marqué par l'apparition d'alvéoles corticales dont la taille augmente. L'enveloppe vitelline devient importante (Figure 10).
- 3) Stade de la vitélogénèse (Figure 10).
- 4) Stade de maturation de l'oocyte marqué par une augmentation de taille. L'oocyte devient translucide et subit la fin de la méiose.
- 5) Stade de la maturation de l'œuf caractérisé par l'ovulation dans la lumière ovarienne et l'acquisition de la capacité à être fécondé.

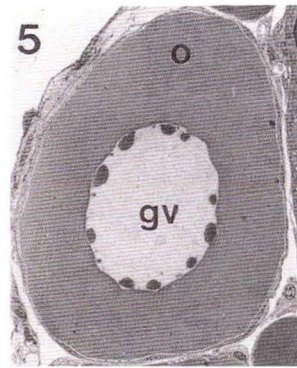


Figure 9. Follicule primaire. O ; oocyte, gv ; vésicule germinale. D'après Selman *et al.*, 1993.



Figure 10. Follicule à différents stades. I ; Etape de croissance primaire (oocyte périnucléaire), II ; Etape alvéolaire cortical, III ; Etape de vitéllogénèse. D'après Selman *et al.*, 1993.

Le tableau 4 indique les caractéristiques importantes des différents oocytes (Selma *et al.*, 1993).

Tableau 4
Caractéristiques des oocytes à différents stades de développement.
D'après Selman *et al.*, 1993.

No.	Stage		Diameter	General appearance	Follicle cells	Vitelline envelope	Cortical alveoli	Yolk bodies	Endocytosis	Nucleus (GV)	Nucleoli	Stage of meiosis	Maturational competence ¹
	Name												
IA	Primary growth (pre-follicle phase)		7–20 (μm)	Oocyte in nest	Pre-follicle cells surround nest	None	None	None	None	Central location; spherical to oval with smooth contour; dense-cored granules appear	Few to several	Leptotene through zygotene (or pachytene) of prophase I	—
IB	Primary growth (follicle phase)		20–140 (μm)	Oocyte in transparent follicle; GV visible	Flat; short microvilli extend toward oocyte; joined by desmosomes; distinct basal lamina	Begins to form as a unilaminar layer; < 0.15 μm thick	None	None	None	Same as above but dense-cored granules more numerous	Few to several; move toward periphery; variable size; shape becoming irregular	Arrests in diplotene of prophase I	—
II	Cortical alveolus		0.14–0.34 (mm)	Follicle translucent; GV less visible; cytoplasm appears "foamy"	Flat to cuboidal; long microvilli extend through vitelline envelope to oocyte	Two then three layers; reaches thickness of 6.0 μm; pore canals with oocyte and follicle cell microvilli; dense material next to outer surface	Few to many; variable size; some with central cores; random distribution	None	Becomes apparent	Central location; highly infolded nuclear envelope	Maximum number; highly irregular in shape; uneven distribution of large and small	Arrested in prophase I	No
III	Vitellogenesis		0.34–0.69 (mm)	Follicle opaque; GV not visible	Cuboidal; increased amount of rough endoplasmic reticulum; lysosomes apparent	Tripartite; begins to get thinner; retains pore canals with microvilli	Numerous throughout ooplasm; move toward periphery	Yolk bodies accrue throughout ooplasm; contain crystalline inclusions	Maximal	Begins to move towards periphery; develops smoother contour	Fewer than stage II; spherical to oval; smallest remain central in GV	Arrested in prophase I	Yes in follicles > 0.52 mm in diameter
IV	Maturation		0.69–0.73 (mm)	Follicle opaque until after GVBD	Cuboidal; lysosomes and lipid droplets more numerous; microvilli retract	Tripartite; continues to get thinner; withdrawal of follicle cell microvilli from pore canals	Peripherally aligned next to oolemma	Yolk bodies lose crystalline interiors after GVBD and have smoother outlines	Reduced but apparent	Near (animal?) pole prior to GVBD	Further reduction in number; remain mostly at periphery	Prophase I through first meiotic division; arrests in metaphase II	Yes
V	Egg		0.73–0.75 (mm)	Translucent	Not present	Tripartite; pore canals retain some oocyte microvilli; < 3.0 μm thick	Same as stage IV	Non-crystalline yolk bodies of variable size	Minimal	None	None	Arrested in metaphase II	—

¹GVBD.

I.6.2. Le testicule

Le système testicule sert à produire les gamètes et des hormones sexuelles. Le *Danio rerio* possède un seul testicule constitué de lobules dont la paroi est composée de cystes. Ces derniers se développent de façon synchrone et contiennent en leur centre des cellules germinales isocloniques entourées de cellules de Sertoli.

La spermatogenèse se déroule en cinq étapes : (1) prolifération des spermatogonies, (2) divisions méiotiques, (3) spermiogenèse, (4) spermiation et (5) maturation du sperme.

Dans un premier temps, au niveau des cystes, les spermatogonies, cellules souches germinales, se divisent. Après cinq ou six divisions mitotiques, elles donnent les spermatocytes primaires. Les spermatocytes primaires subissent la première division méiotique produisant les spermatocytes secondaires. Ceux-ci subiront la seconde division méiotique résultant en la formation des spermatides, cellules germinales haploïdes. La spermiogenèse peut alors se dérouler. Durant cette étape, les spermatides vont subir différents changements morphologiques aboutissant aux spermatozoïdes. A l'inverse de ce qui se produit chez les mammifères, les spermatozoïdes du poisson sont dépourvus d'acrosome. L'étape suivante, la spermiation, correspond à la libération des spermatozoïdes dans la lumière des lobules. Enfin lors de la maturation du sperme, les spermatozoïdes via des changements purement physiologiques vont acquérir leur motilité et leur capacité de fertilisation (Miura, 1999).

I.6.3. Différenciation sexuelle et apoptose

Durant le développement des gonades chez les poissons zèbres juvéniles, il se produit chez le mâle comme chez la femelle un développement de gonades non différenciées ressemblant aux ovaires. Ensuite, chez le mâle, les « oocytes » disparaissent 30 jours après l'éclosion et les spermatocytes se développent en même temps que la différenciation testiculaire. Par contre, chez la femelle, les oocytes continuent leur maturation. Cette présence de gonades non différenciées ressemblant aux ovaires durant la période juvénile est nommée « hermaphrodisme juvénile ». L'apoptose joue un rôle important dans la maturation des ovaires et des testicules chez le poisson mais on ignore si l'apoptose des cellules germinales est impliquée dans la différenciation sexuelle (Uchida *et al.*, 2002).

La différenciation sexuelle possède une composante génétique mais le(s) gène(s) impliqués n'ont pas encore été identifiés. Comme chez les mammifères, le sexe est déterminé par le spermatozoïde. Il est possible d'obtenir des portées où tous les poissons sont des femelles en accouplant des femelles sauvages avec des femelles gynogénétique « reversées » en mâle.

Divers facteurs environnementaux influencent la différenciation sexuelle comme le stress thermique, l'acidité, la salinité, l'alimentation (Uchida *et al.*, 2004; Uchida *et al.*, 2002; Yamashita, 2003). Ces facteurs peuvent induire l'apoptose oocytaire dans les organes reproducteurs durant la différenciation sexuelle et induire la spermatogenèse et la formation testiculaire (Uchida *et al.*, 2002; Yamashita, 2003).

I.6.3.1. Oocytes périnucléaires

Dix sept jours après l'éclosion, aucun oocyte périnucléaire (oocyte de la première étape du développement oocytaire (Figure 9)) n'est observé. Dix-neuf jours après l'éclosion, les oocytes périnucléaires apparaissent mais aucune différence significative n'est observée entre les mâles et les femelles donc il n'y a donc pas de distinction morphologique entre les deux sexes à ce stade du développement. Le nombre d'oocytes périnucléaires rapporté au nombre total de cellules germinales est significativement différent chez la femelle et chez le mâle vingt et un jours après l'éclosion. Il y a plus d'oocytes périnucléaires chez les femelles ($42.6 \pm 6.2\%$) par rapport aux mâles ($17.3 \pm 2.7\%$) vingt et un jours après l'éclosion. C'est donc le stade où on commence à pouvoir distinguer les mâles et les femelles (Uchida *et al.*, 2002).

I.6.3.2. Apoptose des oocytes diplotènes dans les gonades non différenciées

Dix jours après l'éclosion, des oocytes pachytènes et zygotènes et des oocytes sont observés mais aucune apoptose des cellules germinales n'a lieu. Les oocytes diplotènes apparaissent 15 jours après l'éclosion dans les gonades non différenciées et l'apoptose débute. Entre le 17^{ième} et 19^{ième} jours après l'éclosion, le nombre d'oocytes apoptotiques augmentent légèrement, à ce stade, les oocytes périnucléaires apparaissent (Uchida *et al.*, 2002).

I.6.3.3. Apoptose dans les gonades mâles

Chez le mâle, l'apoptose des oocytes diplotènes jeunes augmente brutalement au 23^{ième} jour après l'éclosion et diminue par la suite pour cesser complètement au 27^{ième} jour après l'éclosion. Après cette phase apoptotique, aucun oocyte n'est présent. Une apoptose des oocytes est aussi observable dans les ovaires entre le 23^{ième} jour et le 25^{ième} jour après l'éclosion mais cette apoptose est peu importante suggère l'existence d'une voie de signalisation proapoptotique dans les oocytes du poisson mâle et cette voie pourrait être activée par des gènes déterminant le sexe. Chez le mâle, au 23^{ième} jour après l'éclosion, Alors que les oocytes disparaissent et les spermatogonies apparaissent. La spermatogenèse continue avec l'apparition des spermatozoïdes 27 jours après l'éclosion. Les testicules sont formés complètement 40 jours après l'éclosion. La différenciation testiculaire pourrait être déclenchée par l'apoptose des premiers oocytes diplotènes jeunes (Uchida *et al.*, 2002).

I.7. Objectifs du mémoire

Le laboratoire de Génétique de l'URPHYM s'attache à étudier la fonction des protéines MAGE chez les mammifères, en particulier en produisant et en étudiant des souris « knock-out ». Chez la souris, comme chez l'homme et les autres mammifères, ces gènes sont nombreux et pourraient être redondants d'un point de vue fonctionnel au moins en partie.

L'unique gène *Mage* du poisson zèbre, *ndnl2*, doit être le descendant directe du gène *Mage* « originel » des vertébrés. Les travaux publiés précédemment par le groupe de Wevrick

montrent que *ndnl2* est exprimé au cours du développement du système nerveux. En dehors de cette publication, aucune autre donnée n'a été publiée sur *ndnl2*. L'objectif de ce travail était de déterminer le profil d'expression de *ndnl2* chez le poisson zèbre adulte.

II.1. Transformation d'*Escherichia coli* (choc thermique)

Ajouter 1 µl de produit de ligation dans un tube de bactéries E. Coli INVαF' (Promega), mélanger lentement, incubé 30 minutes sur glace, ensuite 30 secondes à 42°C. Ajouter 450 µl de LB dans le tube et incubé 1 heure à 37°C. Placer le tube sur de la glace. Etaler 40 µl de X-gal 20mg/ml (Eurogentec) sur des boîtes de pétri LB + ampicilline ensuite 50, 100 et 200 µl de bactéries sur chaque boîte de pétri. Incuber O/N à 37°C.

II.2. Culture d'*Escherichia coli*

Dans un erlenmeyer stérile, ajouter 50 ml de LB et 50 µl d'ampicilline 100 mg/ml (Roche). Ensemencer ce milieu liquide avec une colonie isolée. Incuber O/N à 37°C sous agitation.

II.3. Préparation d'ADN plasmidique

La préparation a été effectuée avec le kit « PureYield™ Plasmid Midiprep System » (Promega).

II.3.1. Lyse des bactéries

Transvaser la culture bactérienne dans des tubes de 50 ml, centrifuger 10 minutes à 2500 rpm, décanter, placer les tubes quelques instants sur un papier buvard. Resuspendre dans 3 ml de « Cell Resuspension Solution » puis ajouter 3 ml de « Cell Lysis Solution », mélanger par inversion et incubé 3 minutes à TA. Ajouter 5 ml de « Neutralization Solution ». Mélanger par inversion. Centrifuger 30 minutes à 2500 rpm.

II.3.2. Purification d'ADN par chromatographie

Placer une colonne « PureYield™ Clearing » sur un nouveau tube de 50 ml et ajouter le lysat dans la colonne. Incuber 2 minutes et centrifuger 5 minutes à 1500 rpm. Placer sur un nouveau tube de 50 ml, une colonne « PureYield™ Binding » et y ajouter le lysat filtré précédemment puis centrifuger 3 minutes à 1500 rpm.

Ajouter 5 ml de « Endotoxin Removal Wash Solution » sur la colonne « PureYield™ Binding » et centrifuger 3 minutes à 1500 rpm. Vider le tube de 50 ml et ajouter 20 ml de « Column Wash Solution » à la colonne et centrifuger 5 minutes à 1500 rpm.

Ajouter 600 µl de « Nuclease-Free Water » dans la colonne et centrifuger 5 minutes à 1500 rpm.

La détermination de la concentration en acide nucléique a été réalisée au spectrophotomètre. Régler le spectrophotomètre (Pharmacia) pour mesurer la concentration de l'ADN à une longueur d'onde de 260 nm. Calibrer le spectrophotomètre avec 100 µl d'H₂O. Mettre 1 µl d'ADN et 99 µl d'H₂O dans la cuve et lire la concentration. Multiplier par 100.

II.4. Séquençage d'ADN

Le séquençage d'ADN a été réalisé par la méthode des terminateurs de chaînes associée à la PCR à l'aide d'un séquenceur automatique (377 DNA Sequencer ABI Prism).

Amorce de séquençage T7 ou Reverse 10 μM (Eurogentec)	1 μl
ADN matrice 270 ng	1 μl
H ₂ O stérilisée par autoclavage	10 μl
Mélange de séquençage ² (Applied Biosystems)	8 μl

Primer T7 : 5'-AAT-ACG-ACT-CAC-TAT-GA-3'

Primer Reverse (R) : 5'-TCA-CAC-AGG-AAA-CAG-CTA-TGA-C-3'

II.5. Digestion d'ADN plasmidique par des enzymes de restriction

Les digestions d'ADN plasmidique ont été réalisées à une concentration d'ADN de 1 μg/20 μl en présence de 5 unités d'enzyme de restriction par μg d'ADN pour une durée de 2 heures à 37°C dans les tampons recommandés par le fabricant (Roche ou New England Biolabs).

II.6. Électrophorèse d'ADN en gel d'agarose

II.6.1. Préparation du gel

Couler le gel d'agarose à 0.8% dans la cuve, mettre le peigne et laisser le gel se solidifier. Retirer le peigne. Déposer les échantillons dans les puits, remplir la cuve de TAE 1x de façon à immerger le gel et faire migrer par électrophorèse jusqu'à la séparation des bandes d'ADN. Prendre la photo.

II.6.2. Les échantillons

Ajouter 1 μl d'ADN, 2 μl de solution de coloration et d'alourdissement pour ADN et 9 μl de TE 1x dans chaque échantillon à charger.

II.6.3. Marqueur de poids moléculaire pour ADN

Mélanger 0.5 μl de « 1 Kb ADN ladder » 1 μg/μl (Invitrogen), 9.5 μl de TE 1x et 2 μl de solution de coloration et d'alourdissement pour ADN.

II.7. Préparation d'ARN du poisson zèbre

II.7.1. Dissection des poissons zèbres

Disséquer les différents organes du poisson et les placer directement dans de l'azote liquide.

II.7.2. Broyage des tissus

Mettre les tissus congelés dans un mortier contenant de l'azote liquide et les broyer à l'aide d'un pilon jusqu'à obtention d'une poudre. Ensuite mettre cette poudre dans un tube de 50 ml (Falcon), percer le couvercle et placer à -70°C jusqu'à évaporation complète de l'azote liquide.

II.7.3. Extraction d'ARN

L'extraction est réalisée à l'aide du « ARN Isolation Reagent » (Biofidal).

² Kit Bigdye terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with Amplitaq DNA Polymerase

Ajouter 2 ml de « ARN isolation Reagent » pour 200 mg de poudre de tissus dans un tube. Mélanger. Incuber 5 minutes à TA.

Ajouter 0.4 ml de chloroforme (Merck). Secouer vigoureusement durant 15 secondes. Incuber 5 minutes à TA. Centrifuger 15 minutes à 12000 rpm à 4°C.

Prélever la phase aqueuse supérieure et y ajouter 1 ml d'isopropanol (Vel), mélanger et incuber de 5 à 10 minutes à TA. Centrifuger 10 minutes à 4°C à 12000 rpm, décanter et ajouter 2 ml d'éthanol 75% (Fisher scientific). Centrifuger 5 minutes à 4°C à 7500 rpm. Décanter et sécher le culot à l'air. Dissoudre le culot d'ARN dans 25 µl dans une solution de 0.5% SDS. Incuber 10 à 15 minutes à 55°C. Stocker les échantillons à -20°C.

La concentration en ARN a été déterminée par mesure au spectrophotomètre (Pharmacia) à une longueur d'onde de 260 nm. Calibrer le spectrophotomètre avec 100 µl d'H₂O-0.5% SDS. Mettre 1 µl de ARN et 99 µl d'H₂O-0.5% SDS dans la cuve et pendre la concentration.

II.8. Préparation de la sonde utilisée pour l'analyse en « Northern blot »

II.8.1. Amplification de la sonde par PCR (MiniCycler TM, MJ Research)

Tampon de réaction 10x (Biotools)	5 µl
dNTPs 2 µM (Roche)	5 µl
Primer T7 10 µM (Eurogentec)	5 µl
Primer Reverse 10 µM (Eurogentec)	5 µl
Taq polymérase 1 U/µl (Biotools)	1 µl
ADN matrice 46 ng	1 µl
H ₂ O milliQ stérilisée à l'autoclave	28 µl

Ajouter une goutte d'huile sur chaque échantillon pour éviter l'évaporation.

5 minutes à 94°C
 1 minute à 94°C
 1 minute à 57°C
 1 minute à 72°C
 10 minutes à 72°C

} 30x

II.8.2. Purification du produit de PCR par électrophorèse préparative en gel d'agarose

La purification des produits de PCR a été réalisée à l'aide du kit « Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System » (Promega).

Exciser le fragment de gel contenant la bande d'ADN d'intérêt sur le gel d'agarose à l'aide d'un scalpel et mettre dans un tube de 1.5 ml.

Ajouter 10 µl de « Membrane Binding Solution » (isothiocyanate de guanidine) par 10 mg de gel d'agarose contenant l'ADN à purifier. Vortexer. Incuber 10 minutes à 65°C. Vortexer 2 minutes. Centrifuger brièvement à température ambiante.

Placer une mini colonne SV sur un tube collecteur et y ajouter la solution contenant le gel dissous. Incuber 1 minute à TA. Centrifuger 1 minute à 10000 rpm. Vider le tube collecteur. Laver la colonne en ajoutant 700 µl de « Membrane Wash Solution » à la mini colonne SV. Centrifuger 1 minute à 10000 rpm. Vider le tube collecteur et laver la colonne avec 500 µl de « Membrane Wash Solution ». Centrifuger 5 minutes à 10000 rpm. Vider le tube et centrifuger 1 minute à 10000 rpm. Placer la mini colonne SV sur un tube de 1.5 ml.

Pour éluer l'ADN, ajouter 50 µl d'H₂O au centre de la colonne. Incuber 1 minute à TA. Centrifuger 1 minute à 10000 rpm. Retirer la mini colonne SV et placer le tube contenant l'ADN à -20°C.

II.8.3. Marquage de la sonde

Le marquage radioactif de la sonde a été réalisé par polymérisation d'ADN après amorçage aléatoire avec le kit « RadPrime ADN labeling system » (Invitrogen).

dATP 500 µM	1 µl
dGTP 500 µM	1 µl
dTTP 500 µM	1 µl
« Random primers solution » 2.5x	20 µl
ADN matrice (25 ng)	3 µl
[α- ³² P]dCTP (Amersham Biosciences)	5 µl
H ₂ O MilliQ stérilisée à l'autoclave	18 µl
Fragment de la Klenow 40 U/µl	1 µl

Dénaturer l'ADN matrice 5 minutes avec 18 µl d'eau à 100°C. Mettre sur glace et ajouter le reste des réactifs en ajoutant l'enzyme en dernier lieu. Mélanger le mix et incubé 20 minutes à 37°C. Ajouter 5 µl de tampon stop.

II.8.4. Purification de la sonde par chromatographie d'exclusion

Mélanger la colonne « mini Quick Spin » (Roche), enlever le capuchon et casser l'embout, placer la colonne sur un tube de 1.5 ml et centrifuger 1 minute à 3000 rpm. Remplacer le tube de 1.5 ml par un nouveau, déposer la sonde sur la colonne et centrifuger 5 minutes à 2700 rpm. Utiliser la sonde directement ou la stocker à -20°C.

II.9. Préparation du « Northern blot »

II.9.1. Préparation des échantillons d'ARN

Sécher 10 µg d'ARN à la « Speedvac ». Ajouter 20 µl de solution de coloration et d'alourdissement à chaque échantillon. Dénaturer 2 minutes à 95°C et placer ensuite les échantillons sur glace.

II.9.2. Composition du gel

Ajouter 1 g d'agarose à 85 ml d'H₂O-DEPC. Chauffer au micro-onde jusqu'à dissolution de l'agarose. Ajouter 10 ml de tampon MOPS 10x, 5.4 ml de formaldéhyde 37% et quelques microlitres de bromure d'éthidium 10 mg/ml (Gibco). Couler le gel et laisser durcir durant 30 minutes. Charger les échantillons et le marqueur de poids moléculaire dans les puits et remplir la cuve de tampon MOPS 1x.

II.9.3. Marqueur de poids moléculaire pour ARN

Ajouter 1 µl de 0,24-9,5Kb « ARN Ladder » (1,0µg/µl) (Invitrogen) à 20 µl de solution de coloration et d'alourdissement.

II.9.4. Electrophorèse

Faire migrer le gel à 90 V. Arrêter la migration lorsque le bleu de bromophénol arrive aux trois quarts du gel.

II.10. Analyse d'ARN par "Northern blot"

II.10.1. Transfert de l'ARN sur membrane de nylon

Placer le gel dans 5 volumes d'H₂O-DEPC 4x5 minutes sous agitation. Couper une membrane en nylon Hybond N⁺ (Amersham Biosciences) de la taille du gel et la mettre dans de l'H₂O-DEPC quelques secondes. Placer la membrane dans du SSC 10x durant 15 minutes. Mettre un support dans une boîte. Placer sur le support 4 épaisseurs de papiers Whatman 3 mm (Filter Service) imbibés de SSC 10x, le gel, la membrane, ensuite 10 papiers Whatman et une pile de serviettes en papier. Placer un poids sur le tout. Remplir la boîte de SSC 10x. Entourer le tout d'un film plastique (Saran). Laisser transférer O/N à TA. Retirer la membrane délicatement. Laver la membrane dans du SCC 2x. Prendre une photo de la membrane sous ultraviolet. Sécher la membrane entre 2 papiers Whatman.

II.10.2. Fixation des ARN à la membrane

Exposer la membrane aux UV à 254 nm (150milliJoules/cm²) afin de fixer l'ARN de manière covalente à la membrane de nylon.

II.10.3. Préhybridation

Préchauffer la solution de préhybridation à 65°C. Ajouter 50 ml de solution de préhybridation à la membrane et incubé à 65°C durant 2 heures sous agitation dans une étuve à hybridation.

II.10.4. Hybridation

Ajouter 150 µl d'ADN de sperme de saumon (2mg/ml) et 800 µl d'H₂O à la sonde, dénaturer 5 minutes à 100°C. Préchauffer la solution d'hybridation à 65°C. Retirer la solution de préhybridation, ajouter 25 ml de solution d'hybridation et la solution contenant la sonde et l'ADN de sperme de saumon. Placer le tout sous agitation à 65°C O/N dans une étuve à hybridation.

II.10.5. Lavages

Laver la membrane sous agitation 2x 5 minutes dans du SSC 2x à TA, 40 minutes dans du SCC 2x,1% SDS à 65°C et 15 minutes dans du SSC 2x,1% SDS à 65°C.

II.10.6. Autoradiographie

Sécher la membrane entre deux papiers Whatman. Couvrir la membrane de film plastique et la mettre dans une cassette d'autoradiographie (Kodak) avec un film photographique (Kodak Biomax MR). Exposer O/N à -80°C. Développer en chambre noire en plaçant le film dans la machine de développement (Fujifilm, FPM 100A) : bains successifs de développeur, de fixateur et d'eau.

II.11. Hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* est une technique permettant de marquer la présence d'une séquence nucléotidique (ADN ou ARN). Elle permet de localiser une séquence d'ADN au niveau chromosomique ou la présence d'un ARNm dans les tissus. Elle est importante dans différents domaines comme la détection de virus, la détection de gènes, l'analyse de la fonction des gènes,...

L'hybridation *in situ* peut être divisée en dix grandes étapes :

- a) Préparation de la sonde
- b) Fixation de l'échantillon et préparation des coupes
- c) Traitement des tissus afin d'augmenter l'accessibilité à la cible nucléotidique.
- d) Hybridation
- e) Lavages
- f) Détection du signal sur un film photographique
- g) Trempage des lames porte-objets hybridées dans l'émulsion autoradiographique
- h) Développement des lames
- i) Coloration des tissus
- j) Observation de la localisation de la cible nucléotidique.

La sonde utilisée peut être une sonde d'ADN de grande taille, un oligonucléotide ou une sonde d'ARN. Différents types de marquage de la sonde existent, radioactifs ou non radioactifs (Figure 11).

II.11.1. Préparation des sondes de l'ADN

Linéariser le plasmide contenant l'ADNc avec SpeI pour la sonde anti-sens et AgeI pour la sonde sens ensuite réaliser la transcription *in vitro* avec la T7 ARN polymérase pour la sonde anti-sens et T3 ARN polymérase pour la sonde sens.

Ajouter 190 µl de phénol-CIAA (Sigma) dans chaque tube, vortexer et centrifuger 13 minutes à 13200 rpm. Récupérer la phase aqueuse, y ajouter un volume de chloroforme (Merck) et vortexer. Centrifuger 13 minutes à 13200 rpm et prendre la phase aqueuse.

Ajouter 2 volumes d'éthanol 100% (Riedel-deHaën) et 0.1 volume de NaAc 3 M, incuber 30 minutes à -70°C et centrifuger 10 minutes à 13200 rpm. Décantier, laver avec 200 µl d'éthanol 70% (Fisher scientifique) et centrifuger 10 minutes à 13200 rpm. Décantier, laisser le culot sécher et dissoudre l'ADN dans 20 µl d'H₂O-DEPC.

II.11.2. Synthèse des sondes d'ARN radioactives

Prélever 12.5 µl de [α -³³P]dUTP (Amersham Pharmacia Biotech) et sécher complètement à la centrifugeuse sous vide. Dissoudre le culot dans le mix suivant en ajoutant l'enzyme en dernier lieu :

H ₂ O-DEPC	6.5 µl
Tampon de transcription 5x (Promega)	4 µl
DTT 100 mM (Promega)	2 µl
RNAsine (Promega)	0.5 µl
ADN plasmidique linéarisé 1 µg	3 µl
rATP 2.5 mM (Promega)	1 µl
rCTP 2.5 mM (Promega)	1 µl
rGTP 2.5 mM (Promega)	1 µl
T7 polymérase 20U/µl ou T3 polymérase 17U/µl (Promega)	1 µl

Incuber 2 heures à 37°C. Digérer ensuite l'ADN avec 1 µl de « DNase-RNase free » 1U/µl pendant 15 minutes à 37°C. Ajouter 1 µl d'EDTA 0.5 M pH 8.0 et 28 µl d'H₂O-DEPC.

II.11.3. Purification des sondes marquées

Purifier chaque sonde sur une colonne « mini Quick Spin RNA » (Roche) : mélanger la résine par inversion, enlever le capuchon et casser l'embout, placer la colonne sur un tube de 1.5 ml et centrifuger 2 minutes à 3000 rpm. Remplacer le tube de 1.5 ml par un nouveau, déposer la sonde sur la colonne et centrifuger 4 minutes à 3000 rpm.

II.11.4. Détermination de la radioactivité des sondes

Prélever 1 µl de chaque sonde marquée et y ajouter 4 ml de liquide scintillant. Lire les dpm au compteur à scintillation LS 6500 (Beckman). Continuer l'HIS si les dpm se situent entre 2 et 4.10⁶ dpm/µl.

II.11.5. Fixation des tissus

Anesthésier le poisson dans un mélange eau/glace. Faire une incision du côté dorsal et pectoral du poisson. Placer l'animal dans un tube de 50 ml et y ajouter 50 ml de PBS-4% PFA froid. Laisser O/N à 4°C sous agitation. Mettre le tube dans la centrifugeuse sous vide jusqu'à ce que le poisson se retrouve dans le fond du tube. Déposer l'échantillon dans une cassette. Placer la cassette dans la machine de fixation, déshydratation, et inclusion « Tissue-Tek Vip » (Sakura) : 3 bains successifs de 1.5 heure dans du méthanol, 1.5 heure dans du toluène et 1.5 heure dans de la paraffine (Shambon).

II.11.6. Préparation des coupes

II.11.6.1. Enrobage

L'enrobage a été réalisé à l'aide de l'Histocentre 2 (Shandon).

Placer le tissu dans un moule, orienter le tissu dans la position souhaitée et remplir le moule de paraffine à 58°C. Laisser durcir au moins 15 minutes sur plaque réfrigérante. Retirer le bloc de paraffine du moule.

II.11.6.2. Microtomisation

Dégrossir le bloc de paraffine. Laisser dans le Molifex (BDH) O/N. Placer le bloc une minute dans de la glace. Couper des tranches de tissu de 6 µm d'épaisseur au microtome (RM 2145, Leica).

II.11.6.3. Etalement des coupes de tissu sur des lames porte-objets

Déposer quelques gouttes d'H₂O-DEPC sur une lame porte-objet « Super Frost Plus » (VWR international) et déposer la coupe à l'aide d'une pince mouillée. Placer la lame porte-objet sur une plaque chauffante à 54°C durant 1 minute. Egoutter les lames et les laisser sécher quelques minutes en position verticale. Buvarder. Chauffer 1 minute sur une plaque chauffante à 54°C puis placer les lames à 48°C dans une étuve durant 1.5 heure. Ensuite passer au point 12.6.4. pour la coloration HES ou au point 12.7. pour l'hybridation *in situ*.

II.11.6.4. Coloration des coupes

II.11.6.4.1. Déparaffinage et hydratation

Placer les lames 2x 3 minutes dans du toluol, 2x 3 minutes dans du méthanol absolu (VWR international), 3 minutes dans du méthanol 70%, rincer 10 minutes à l'eau courante.

II.11.6.4.2. Coloration à l'hémalum, à l'érythrosine et au safran

➤ Coloration des noyaux

Placer les lames 8 minutes dans la solution d'hémalum, les rincer à l'eau courante, les placer ensuite 1 minute dans l'alcool-HCl puis 10 minutes dans de l'eau courante.

➤ Coloration du cytoplasme

Placer les lames 7 minutes dans la solution d'érythrosine, les rincer à l'eau courante puis les immerger pendant 1 minute dans de l'alcool éthylique 70%.

➤ Coloration du tissu conjonctif

Déshydrater les lames 2x dans de l'alcool isopropylique, les colorer 7 minutes dans la solution de safran, rincer 3x dans de l'alcool isopropylique et dans du toluol.

II.11.6.4.3. Montage des lames porte-objets

Monter les lames avec la solution de montage DPX Mountant (BDH) et les recouvrir d'une lamelle couvre-objet Menzel (VWR international). Placer un poids sur la lamelle couvre-objet et laisser O/N.

II.11.7. Déparaffinage

Incuber les lames 10 minutes dans du xylène (Vel). Placer les lames 3 minutes dans de l'éthanol 100%. Laver les lames 2x5 minutes dans de l'éthanol 100%, 1x5 minutes dans des solutions d'éthanol 95%, 85%, 60% et 30%. Rincer les lames 5 minutes dans du PBS. Refixer les lames 20 minutes dans du PBS-4% PFA. Rincer 2x5 minutes dans du PBS.

II.11.8. Traitement à la protéinase K

Préchauffer 250 ml de solution de protéinase K 1µg/ml à 37°C. Traiter ensuite les lames pendant 6 minutes avec la solution de protéinase K à 37°C. Rincer 3 minutes dans de l'H₂O-DEPC, 3 minutes dans une solution de triéthanolamine 0.1 M pH 8.0 à TA. Déposer 650 µl d'anhydride acétique (Sigma) dans un bac, y mettre les lames, ajouter 250 ml de triéthanolamine 0.1 M pH 8.0 et incuber 10 minutes à TA. Rincer 2 minutes dans du SSC 2x à TA. Déshydrater les coupes par passages successifs de 3 minutes dans des solutions d'éthanol à 50%, 70%, 100%, 100%. Laisser sécher les lames 1 heure sur un papier.

II.11.9. Hybridation

Réchauffer la solution d'hybridation à 60°C et y ajouter 500 µl de formamide désionisée (Vel) ainsi que 10 µl de SDS (Sigma) 10% par 500 µl de solution d'hybridation.

Ajouter les sondes d'ARN « anti-sens » et « sens » à raison de $1.5 \cdot 10^6$ dpm/100 μ l de tampon d'hybridation. Placer la solution d'hybridation 10 minutes à 100°C. Déposer 100 μ l sur chaque lame et recouvrir d'un morceau de parafilm. Déposer les lames dans une chambre contenant des serviettes en papiers humectées d'une solution SSC 4x,50% formamide et placer la chambre humide durant 17 heures à 55°C.

II.11.10. Traitement à la RNase et lavages

Retirer le parafilm à l'aide d'une pince. Incuber les lames 30 minutes dans du SSC 4x,50% formamide à 50°C. Rincer les lames 15 minutes dans du SSC 2x à TA. Placer les lames dans une solution de RNase (0.1 mg/ml) (Boehringer). Incuber 30 minutes à 37°C et incuber ensuite 30 minutes les lames dans la solution RNase ne contenant pas de RNase à 50°C.

Mettre les lames 1 heure sous agitation dans 900 ml de SSC 2x à 60°C et puis, toujours sous agitation, dans 900 ml de SSC 0.2x à 65°C.

II.11.11. Déshydratation

Passer les lames 1 minute successivement dans chacune des solutions suivantes :

50% éthanol-NH₄Ac 0.3 M

70% éthanol-NH₄Ac 0.3 M

95% éthanol-NH₄Ac 0.3 M

100% éthanol

100% éthanol

Placer ensuite les lames sur un papier et les laisser sécher.

II.11.12. Autoradiographie

II.11.12.1. Sur film photographique

Placer les lames sèches dans une cassette d'autoradiographie (Kodak), les fixer à l'aide de papier collant et recouvrir le tout de film plastique (Saran). Déposer, dans une chambre noire, un film photographique (Kodak Biomax MR) par dessus et laisser exposer à TA.

Placer, dans une chambre noire, le film dans la machine de développement Fujifilm, FPM 100A: bains successifs de développeur, de fixateur et d'eau.

II.11.12.2. Par trempage dans une émulsion photographique

Cette partie de l'expérience doit être réalisée dans une chambre noire à un mètre au moins d'une lampe rouge de 15W équipée d'un filtre (Kodak) jusqu'à la fixation des lames. Préchauffer 15 minutes l'émulsion autoradiographique (RPN 41, Amersham Biosciences) à 43°C. Transvaser l'émulsion dans une chambre d'émulsion (RPN39, Amersham Biosciences) et tremper chaque lame porte-objet 5 secondes dans l'émulsion. Ensuite placer les lames 5 secondes à la verticale sur un papier Whatman (Filter Service), essuyer le verso et les déposer 10 minutes sur une plaque de verre refroidie sur un bac de glace. Laisser sécher les lames à TA durant 2 heures. Placer les lames dans une boîte contenant du silicagel et enveloppée d'aluminium et emballer le tout avec un sac opaque. Laisser exposer à 4°C durant 8 jours.

II.11.12.2.1. Développement des lames recouvertes d'émulsion photographique

Mettre les lames à température ambiante pendant 1 heure. Diluer 7.8 g de développeur D-19 (Kodak) dans 50 ml d'H₂O à 52°C. Placer le développeur D-19 dilué et les lames à

15°C. Développer les lames en les trempant 4 minutes dans le développeur D-19 à 15°C. Rincer les lames 3 minutes dans de l'H₂O à 15°C. Fixer les lames en les plongeant 5 minutes dans du fixateur (Kodak) dilué 5x à TA. Rincer 3 minutes dans de l'H₂O et puis 10 minutes dans de l'H₂O courante.

II.11.12.2.2. Coloration des coupes après développement photographique

Préparer une solution de bleu de toluidine 0.1% (Merck) dilué dans de l'H₂O. Incuber les lames dans cette solution durant 15 minutes. Placer les lames 2x 1 minute dans de l'H₂O, puis 30 secondes dans la série de solution d'éthanol 50%, 70%, 90%, 100%, 100% (VWR international), puis 2x dans de l'isopropanol 100% (VWR international), et enfin 3x dans du toluol 100% (VWR international).

II.11.12.2.3. Montage

Monter les lames au DPX Mountant (BDH) avec une lamelle couvre-objet Menzel (VWR international). Placer un poids sur la lamelle couvre-objet et laisser O/N. Observer les lames au microscope Olympus AX70 (Omnilabo) en fond noir et en fond clair.

II.12. Solutions

Agarose 0.8% (1 litre) : 40 g d'agarose (Eurogentec) dans 1 litre de tampon d'électrophorèse TAE 1x, mettre au micro-onde jusqu'à dissolution de l'agarose, placer à 60°C. Ajouter 1 µl de bromure d'éthidium 10 mg/ml (Sigma) pour 40 ml d'agarose à 0.8%.

H₂O-DEPC (1 litre) : ajouter 1 ml de DEPC (Sigma) dans un litre d'eau MilliQ, mélanger plusieurs fois, laisser O/N et autoclaver.

Erythrosine : Ajouter 2 g d'érythrosine (Merck) et 10 gouttes de formol (Merck) dans 1 litre d'eau.

Formamide désionnifiée : Dans une bouteille, placer de la résine (BIO RAD), de la formide et agiter. Conserver à 4°C.

Hémalun : Porter à ébullition 1 litre de solution saturée en alun de potassium (Merck) dans de l'eau distillée et y ajouter 3 g d'hématéine (Fluka) hors du feu. Faire bouillir, ensuite refroidir et filtrer et ajouter 20 ml d'acide acétique glacial (Merck). Filtrer l'hémalun avant chaque emploi.

Milieu LB liquide : Ajouter 10 g de LB à 500 ml avec de l'H₂O milliQ. Stériliser par autoclavage.

Milieu LB gélosé : Ajouter 10 g de LB (Difco) et 8 g d'agar pour 500 ml d'H₂O milliQ. Stériliser par autoclavage. Laisser refroidir en évitant toute solidification. Ajouter éventuellement 500 µl d'ampicilline 100 mg/ml. Couler dans des boîtes de pétri.

MOPS 10x (1litre) : Dissoudre 41.85 g d'acide 4-morpholinopropanosulfonique (Sigma) et 6.80 g d'acétate de sodium.3H₂O (MM : 136.08 g/mol) (Vel) dans 800 ml d'H₂O-DEPC. Ajouter 20 ml de Na₂EDTA 0.5 M et ajuster le pH à 7.0 avec du NaOH (Merk) 10N. Ajuster le volume à 1 litre avec de l'H₂O-DEPC. Conserver à -4°C en l'absence de lumière.

NH₄OAc 10M : Dissoudre 770.08 g d'acétate de sodium (Vel) dans 800 ml d'H₂O-DEPC

NaAc 3M (1 litre) : Dissoudre 408.24 g de NaAc-3H₂O (Vel) dans 800 ml d'H₂O. Ajuster le pH à 5.2 avec de l'acide acétique (Merk) ou à 7 avec de l'acide acétique dilué. Ajuster le volume à 1 litre avec de l'H₂O-DEPC. Stériliser par autoclavage.

Na₂EDTA 0.5 M pH 8.0 : Dissoudre 186.12 g de Na₂EDTA-2H₂O (Merck) dans 800 ml d'H₂O-DEPC. Ajuster le pH à 8.0 avec du NaOH (Merk) et le volume à 1 litre avec de l'H₂O-DEPC. Autoclaver.

PBS-4% paraformaldéhyde pH 7.4 : Dissoudre 8 g de paraformaldéhyde (Merk) dans 200 ml de PBS à 65°C durant 1 heure et refroidir sur glace avant utilisation. Ajuster à pH 7.4 avec du NaOH 10N.

PBS 10x (1 litre) : Dissoudre 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 36.8 g de Na₂HPO₄·7H₂O et 2.4 g de KH₂PO₄ dans 800 ml d'H₂O. Ajuster le pH à 7.4 avec de l'HCl.

Safran : Ajouter 5 g de safran du Gatinais (Labonord) à 1 litre d'alcool éthylique absolu. Bouillir 1 heure avec une colonne réfrigérante, ensuite refroidir, filtrer. Avant chaque emploi, diluer 1/1 dans de l'alcool absolu.

Solution d'hybridation pour l'hybridation *in situ* (10 ml) : Mettre 4 ml d'H₂O-DEPC dans un tube de 15 ml et ajouter 2 g de sulfate de dextran (USB). Dissoudre en incubant à 37°C sous agitation. Ajouter 2400 µl de NaCl 5 M, 200 µl Tris-HCl 1 M pH 7.5, 132 µl de Ficoll 3% (Sigma), 132 µl de polyvinyl pyrrolidone 3% (Sigma), 668 µl de BSA 3% (Sigma), 40 µl d'EDTA 0.5 M pH 8.0, 200 µl d'ADN de sperme de saumon 10 mg/ml (Sigma), 200 µl d'ARNt de levure 10 mg/ml (Sigma). Ajuster le volume à 10 ml avec de l'H₂O-DEPC. Incuber quelques heures à 37°C sous agitation. Aliquoter par 500 µl et stocker à -20°C.

SSC 20x (1 litre) : Dissoudre 175.3 g de NaCl (VWR international) et 88.2 g de citrate de sodium dihydraté (Merk) dans 800 ml d'H₂O-DEPC. Ajuster le pH à 7.0 avec de l'HCl 1N (VWR international). Ajuster le volume à 1 litre d'H₂O milliQ-DEPC. Stériliser par autoclavage.

Solution de coloration et d'alourdissement pour ARN :

Formamide (Vel).....	720 µl
MOPS 10x.....	160 µl
Formaldéhyde 37% (Merk).....	260 µl
H ₂ O-DEPC.....	180 µl
Glycérol 80% (Sigma).....	100 µl
Bleu de bromophénol (Merk)	80 µl

Solution de coloration et d'alourdissement pour ADN : 0.25% de bleu de bromophénol, 0.25% de xylène cyanol (USB) et 15% de ficoll.

Solution de préhybridation pour « Northern blot » (500 ml) : 50 g de sulfate de dextran (USB) et 5 g de SDS (Sigma) dans 423 ml d'eau. Chauffer 30 minutes à 65°C au bain-marie. Ajouter 29 g de NaCl (VWR international). Chauffer 1 heure à 65°C. Conserver à -20°C.

Solution d'hybridation pour « Northern blot » : 25 ml de solution de préhybridation avec 150 µl d'ADN de sperme de saumon 2 mg/ml (Sigma).

Tampon de protéinase K : 25 ml de Tris-HCl 1M pH 8.0, 25 ml d'EDTA 0.5 M pH 8.0 et 200 ml d'H₂O-DEPC.

Tampon d'électrophorèse TAE 50x (1 litre) : Dissoudre 242 g de Tris (Sigma) dans 500 ml d'H₂O, ajouter 100 ml de Na₂EDTA 0.5 M pH 8.0 et 57.1 ml d'acide acétique glacial (Merck) et ajuster le volume à 1 litre avec de l'H₂O MilliQ.

TE 1x (1 litre) : Ajouter 10 ml de Tris 1 M (pH 8.0, 7.6 ou 7.4) et 2 ml de Na₂EDTA 0.5 M pH 8.0 dans 800 ml d'H₂O, mélanger, ajuster le volume à 1 litre avec de l'H₂O MilliQ et stériliser par autoclavage.

Triéthanolamine 0.1 M pH 8.0 : 9.285 g de TEA (Sigma) et 1.2 g de NaOH et porter à 500 ml avec H₂O-DEPC. Vérifier le pH.

Tampon RNase (500 ml) : 50 ml de NaCl 5 M, 5 ml de Tris-HCl 1 M pH 7.5, 1 ml d'EDTA 0.5 M pH 8.0 et ajuster le volume à 500 ml avec de l'H₂O-DEPC.

Tris-HCl 1M (1 litre) : Dissoudre 121.14 g de tris(hydroxyéthyl)aminométhane dans 800 ml d'H₂O-DEPC. Ajouter de l'HCl 1N pour obtenir le pH voulu. Ajuster le volume à 1 litre.

*Résultats, discussion
et perspectives*

Durant ce mémoire, le profil d'expression du gène *necdin-like2* (*ndln2*) de *Danio rerio* a été étudié chez l'adulte (mâle et femelle). Nous disposions d'un fragment d'ADNc de *ndln2* de 831 paires de bases cloné dans pBluescriptKS+. Ce fragment a été utilisé comme sonde pour l'hybridation d'un « Northern blot » et pour produire les sondes d'ARN que nous avons utilisées dans nos expériences d'hybridation *in situ*.

III.1. Purification de pBluescript KS+*ndln2*

Nous disposions au début de ce travail d'une petite quantité du plasmide pBluescriptKS+*ndln2.1* qui contient un fragment d'ADNc de *necdin-like2* cloné dans le site *NotI* de pBluescriptKS+ comme représenté à la figure 12.

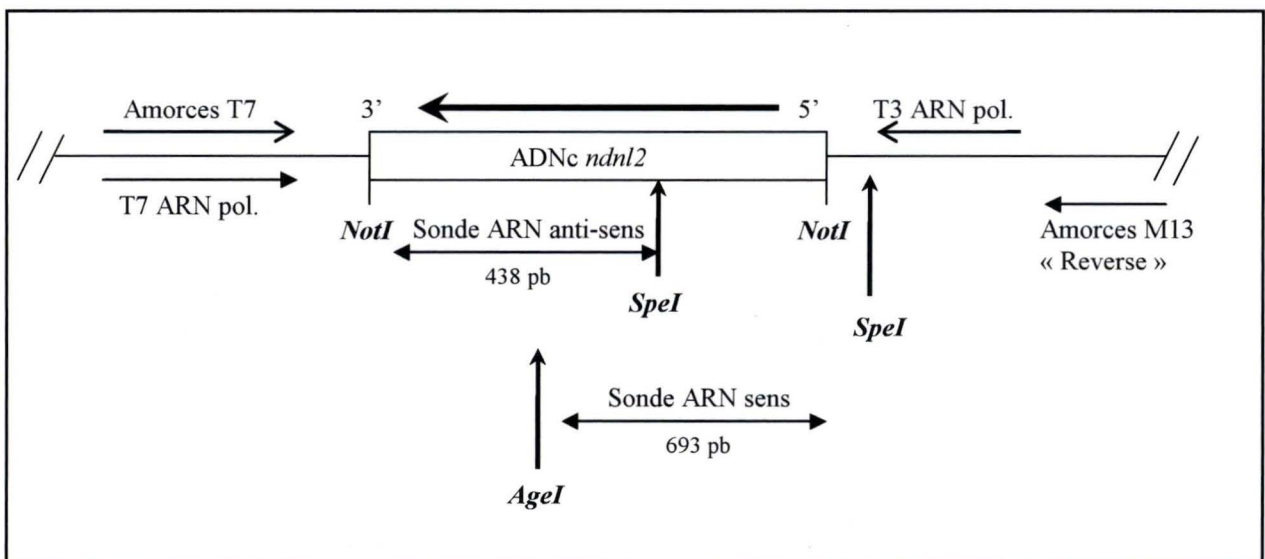


Figure 12. Représentation schématique du fragment d'ADNc de *ndln2* cloné dans le plasmide pBluescriptKS+. Le sens de transcription et l'orientation de *ndln2* sont indiqués par la flèche 5' → 3'.

Nous avons introduit ce plasmide dans *E. coli* par transformation et avons préparé un stock d'ADN de ce plasmide comme décrit dans la section « Matériels et méthodes ».

La figure 13 représente la structure génomique de *ndnl2* et le fragment d'ADNc cloné dans pBluescriptKS+.

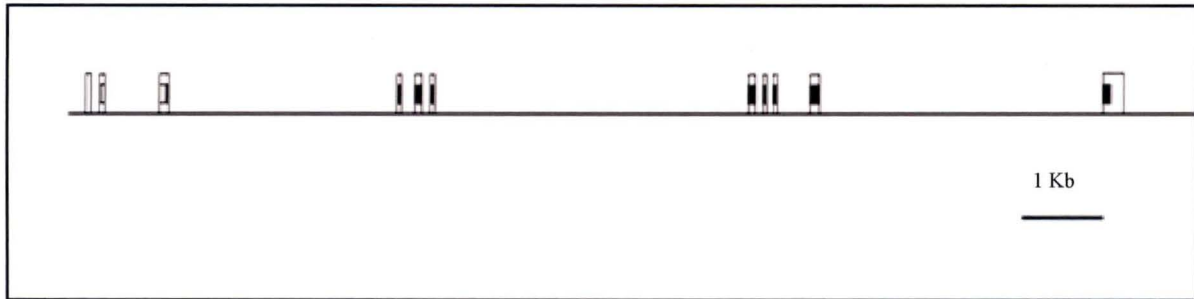


Figure 13. Structure génomique du gène *necdin-like2* du *Danio rerio*. Les boîtes représentent les exons, la grille de lecture est représentée par des rectangles vides et le domaine MCD par des rectangles noirs. La phase ouverte de lecture est répartie sur 10 exons. Les derniers exons sont couverts par notre sonde.

III.2. Étude du profil d'expression de *ndnl2*

III.2.1. Northern blot

Les travaux du groupe de Wevrick ont montré que *ndnl2* est exprimé au cours du développement du poisson et que cette expression persiste jusqu'au stade juvénile **xxxxx**.

Nous avons réalisé une analyse par « Northern blot » pour déterminer si *ndln2* était exprimé dans les tissus du poisson adulte.

Différentes parties du poisson zèbre ont été disséquées et l'ARN en a été extrait :

- la carcasse (constituée principalement de muscles squelettiques)
- les yeux
- la tête (sans les yeux)
- les organes internes du mâle
- les organes internes de la femelle y (compris les organes reproducteurs)
- les ovaires

La quantité et l'intégrité de l'ARN ont été évaluées par électrophorèse en gel d'agarose. Les concentrations d'ARN ont été mesurées au spectrophotomètre. Nous avons ensuite séparé par électrophorèse en gel d'agarose 10 µg d'ARN des différentes parties du poisson. Après la séparation, l'ARN a été transféré sur une membrane de nylon (Figure 14).

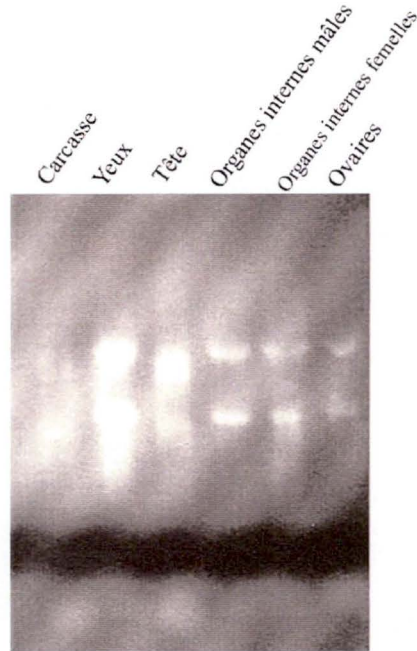


Figure 14. Photographie de la membrane de nylon après électrophorèse et transfert de l'ARN de différentes parties du poisson.

La sonde a été amplifiée par PCR au départ du pBluescriptKS+ndln2 en utilisant les amorces M13 « Reverse » et T7 (Figure 15).

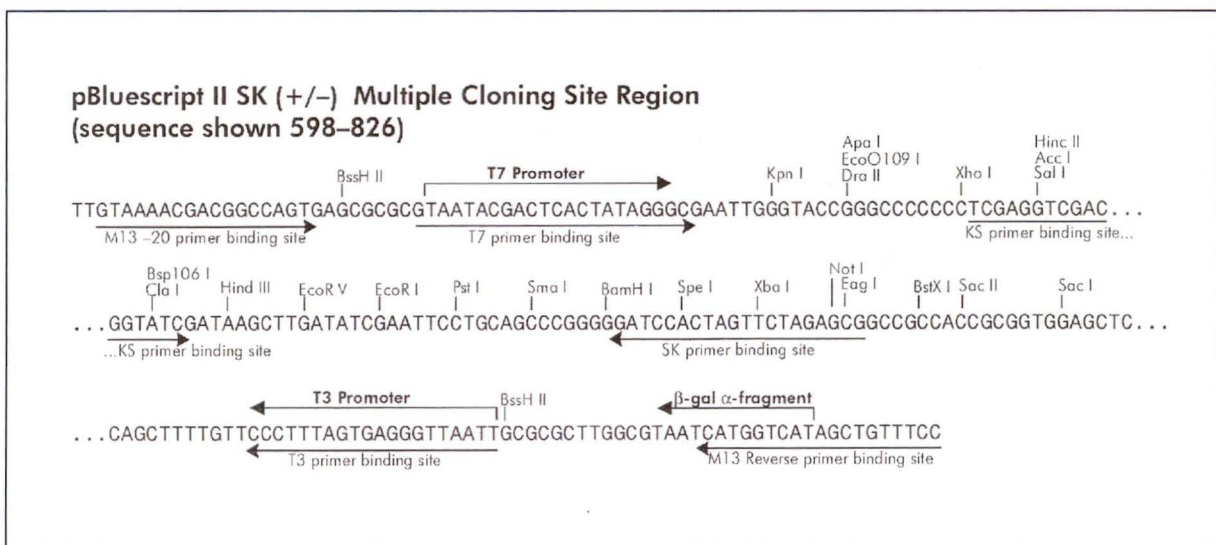


Figure 15. Séquence complémentaire des amorces T7 et M13 « Reverse » utilisés la sondes.

Le produit PCR obtenu a été purifié après une électrophorèse préparative en gel d'agarose (Figure 16).

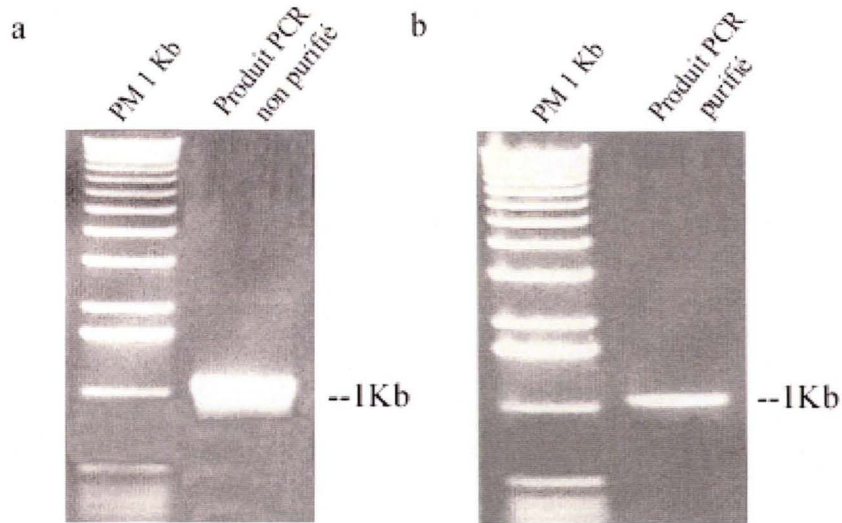


Figure 16. Photographie après électrophorèse en gel d'agarose du produit de PCR amplifié par les oligonucléotides T7 et M13 « Reverse » au départ de pBluescript KS+ndln2. **a.** Produit PCR avant la purification. **b.** Produit PCR après purification. PM 1 Kb = marqueur de poids moléculaire « 1 Kb » (Invitrogen).

La sonde d'ADN a été marquée au ^{32}P et hybridée à l'ARN immobilisé sur la membrane de nylon. Un film photographique a été exposé à la radioactivité de la membrane O/N. L'autoradiographie montre une forte expression de *ndnl2* dans les ovaires. Le signal observable dans la piste « organes internes » de la femelle est vraisemblablement dû à la présence de tissu ovarien (Figure 17).

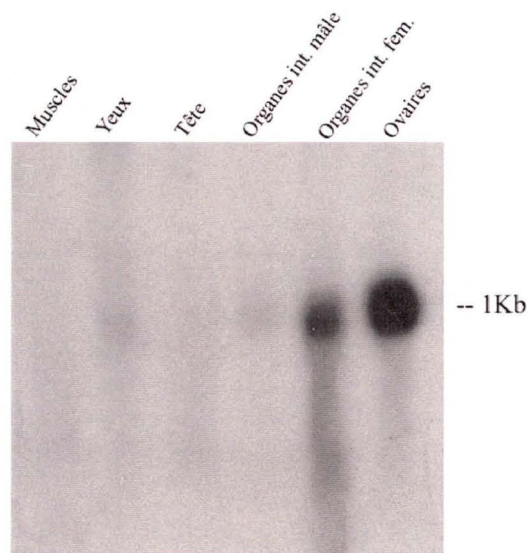


Figure 17. Autoradiographie du « Northern blot » montrant l'expression de *ndln2* dans l'ovaire. Le film a été exposé O/N.

Nous avons aussi détecté une faible expression dans les yeux et dans les organes internes du mâle.

Aucune expression n'a été observée dans la tête ni dans la carcasse. Nous ne pouvons cependant pas en conclure qu'il n'y a pas d'expression dans ces tissus car le « Northern blot » n'est pas assez sensible pour détecter de faibles niveaux d'expression ou une expression limitée à une petite population de cellules présentes dans l'échantillon. Nos résultats montrent en outre que notre sonde est spécifique.

III.2.2. Hybridation *in situ*

Afin de localiser l'expression de *ndln2* au niveau cellulaire, nous avons réalisé des expériences d'hybridation *in situ*.

Après anesthésie, des poissons adultes mâles et femelles ont été fixés à la paraformaldéhyde et enrobés dans de la paraffine. Des coupes parasagittales ont été réalisées on microtome. Après un traitement à la protéinase K, les coupes ont été hybridées avec une sonde d'ARN « anti-sens » et une sonde « sens » contrôle marquées au ^{33}P .

Du pBluescriptKS+*ndln2* a été linéarisé avec l'enzyme de restriction *SpeI* pour la sonde anti-sens et *AgeI* pour la sonde sens (Figure 18). Des sondes d'ARN « anti-sens » et « sens » ont été produites par transcription *in vitro* avec les ARN polymérases T7 et T3 respectivement. pBluescriptKS+*ndln2.1* ne contient qu'un seul site *AgeI*, la digestion par cette enzyme linéarise donc le plasmide. pBluescriptKS+*ndln2.1* contient par contre deux sites *SpeI* : un site dans le site multiple de clonage du vecteur et un site dans le fragment d'ADNc de *ndln2* (Figure 18). La digestion par cette enzyme produit donc deux fragments : 3.4 Kb et 0.4 Kb. Le clivage par les enzymes de restriction a été vérifié par électrophorèse en gel d'agarose (Figure 18).

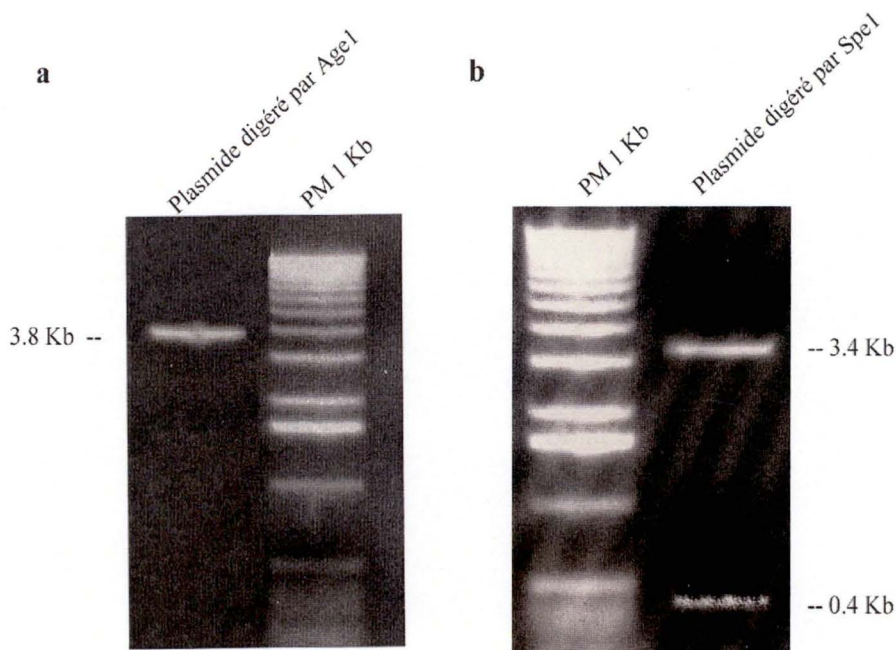


Figure 18. Photographie après électrophorèse en gel d'agarose des produits de restriction de pBluescriptKS+*ndln2.1*. **a.** Produits de restriction *AgeI*. **b.** Produits de restriction *SpeI*. PM 1 Kb = marqueur de poids moléculaire 1 « Kb ».

Mise au point des conditions de lavage après hybridation :

Une première hybridation a été réalisée sur des coupes parasagittales d'une femelle adulte afin de mettre au point notre protocole d'hybridation. Différentes conditions de lavage ont été testées et le signal obtenu par autoradiographie sur film (15 jours d'exposition) a permis de déterminer les conditions optimales de lavage pour obtenir un signal spécifique avec la sonde anti-sens et aucun signal avec la sonde sens. Le tableau 1 montre les conditions de lavage testées. La figure 19 montre le signal obtenu sur le film autoradiographique.

Tableau 5
Résultats obtenus pour les trois conditions de lavage testées.

	Traitement à la « RNase »	Lavage à 60°C 2x SSC	Lavage à 65°C 0.2x SSC	Sonde anti-sens	Sonde sens
Condition 1	----	X	X	Signal spécifique et non spécifique	Signal non spécifique
Condition 2	X	X	----	Signal spécifique et non spécifique	Signal non spécifique
Condition 3	X	X	X	Signal spécifique	Absence de signal

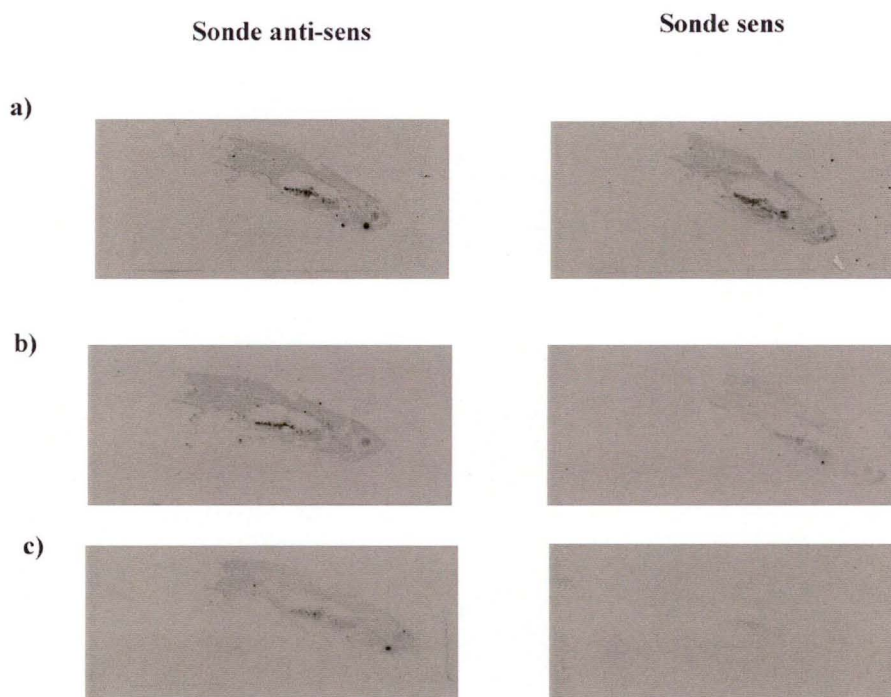


Figure 19. Autoradiographie des coupes hybridées du poisson zèbre femelle. **a.** Autoradiographie des coupes pour la condition (1). **b.** Autoradiographie des coupes pour la condition (2). **c.** Autoradiographie des coupes pour la condition (3).

Dans les conditions (1) les deux sondes génèrent un importante signal dans l'ovaire ainsi qu'un signal non spécifique dans la carcasse. Le signal non spécifique diminue dans les conditions (2). Les conditions (3) sont optimales : un signal spécifique est observé au niveau des ovaires et aucun signal n'est observable avec la sonde sens.

Une deuxième série d'hybridation a été réalisée dans les conditions de lavage (3). Des coupes parasagittales de poissons adultes mâles et femelles ont été hybridées avec les deux sondes et un film photographique a été exposé pendant dix jours. Dans cette seconde expérience, la radioactivité spécifique des sondes était plus élevée que lors de la première expérience ce qui nous a permis de diminuer le temps d'exposition. La figure 20 montre le signal obtenu sur le film autoradiographique.

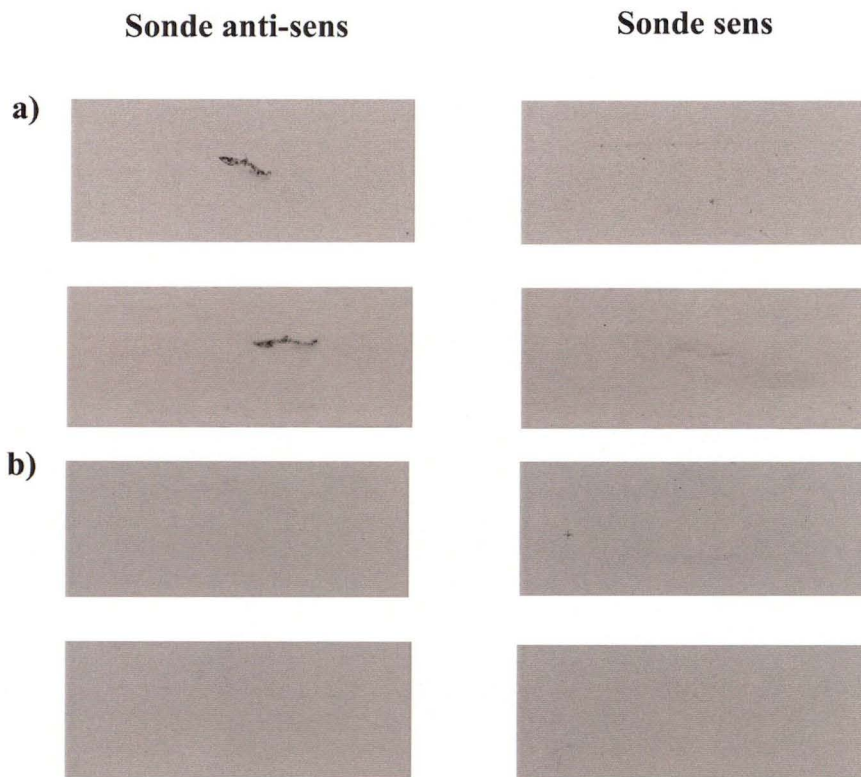


Figure 20. Autoradiographie des coupes parasagittales de poisson zèbre après hybridation avec la sonde *ndln.2* (anti-sens) et la sonde contrôle (sens). **a.** Coupes de femelles. **b.** Coupes de mâles.

Comme le montre la figure 20, aucun signal n'a été détecté chez le mâle alors que chez la femelle, un signal important est observable dans les organes internes. Lors du montage des coupes utilisées pour l'hybridation, des coupes adjacentes ont été colorées à l'HES afin d'identifier les tissus marqués par la sonde. En comparant les photographies des coupes

colorées à l'HES et les autoradiographies, nous avons pu localiser le signal au niveau des ovaires (Figure 21).

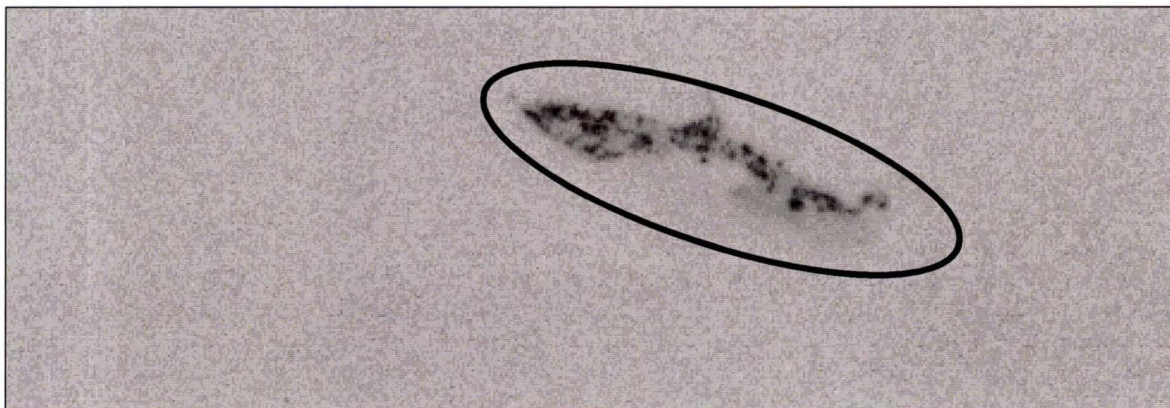


Figure 21 Comparaison de la photographie d'une coupe colorée à l'HES et de l'autoradiographie d'une coupe adjacente marquée par hybridation *in situ* avec la sonde *ndnl.2*.

Pour déterminer quelles cellules de l'ovaire sont marquées, les coupes ont été « trempées » dans un gel d'émulsion photographique formant un film sur le tissu marqué. Après développement, les grains d'argent permettent d'identifier les cellules positives. Cette méthode permet une résolution à l'échelle cellulaire contrairement au film autoradiographique.

Les coupes « trempées » ont été développées après huit jours d'exposition. L'observation microscopique des coupes développées confirme que les ovaires sont fortement marqués et montre que l'expression est limitée aux oocytes à différents stades de la vitéllogénèse : stades protoplasmiques (en croissance), en prévitéllogénèse (corticoalvéolaire) et en vitéllogénèse (Figure 22 à 25). Nous pouvons observer un signal important dans les différentes cellules.

L'expression dans les ovocytes immatures au stade diplotène est difficile à évaluer. Aucune autre structure que l'ovaire n'est marquée ni chez le mâle, ni chez la femelle, que ce

soit l'intestin, le foie, le rein, le testicule, le cerveau, l'œil, le cœur (Figure 26 à 35). Comme attendu, aucun signal n'a été détecté dans les coupes hybridées avec la sonde sens.

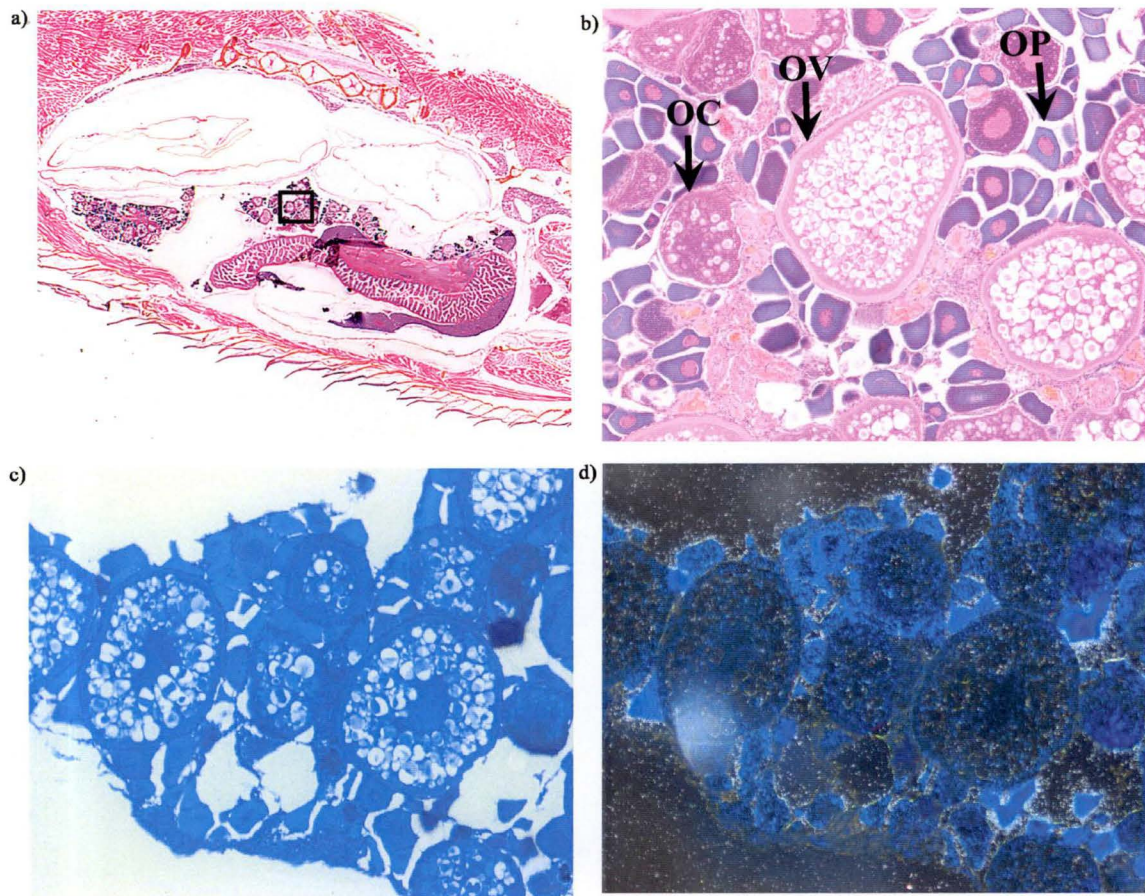


Figure 22. Coupes des organes reproducteurs de la femelle. **a.** Vue générale des organes internes sur une coupe colorée à l'HES G :12.5x. Le rectangle représente la partie de l'ovaire agrandi. **b.** Coupe d'ovaire colorée à l'HES G :100x. OP, oocyte périnucléaire ; OC, oocyte cortico-alvéolaire ; OV, oocyte en vitéllogénèse. **c.** Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond clair G :100x. **d.** Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond noir G :100x.

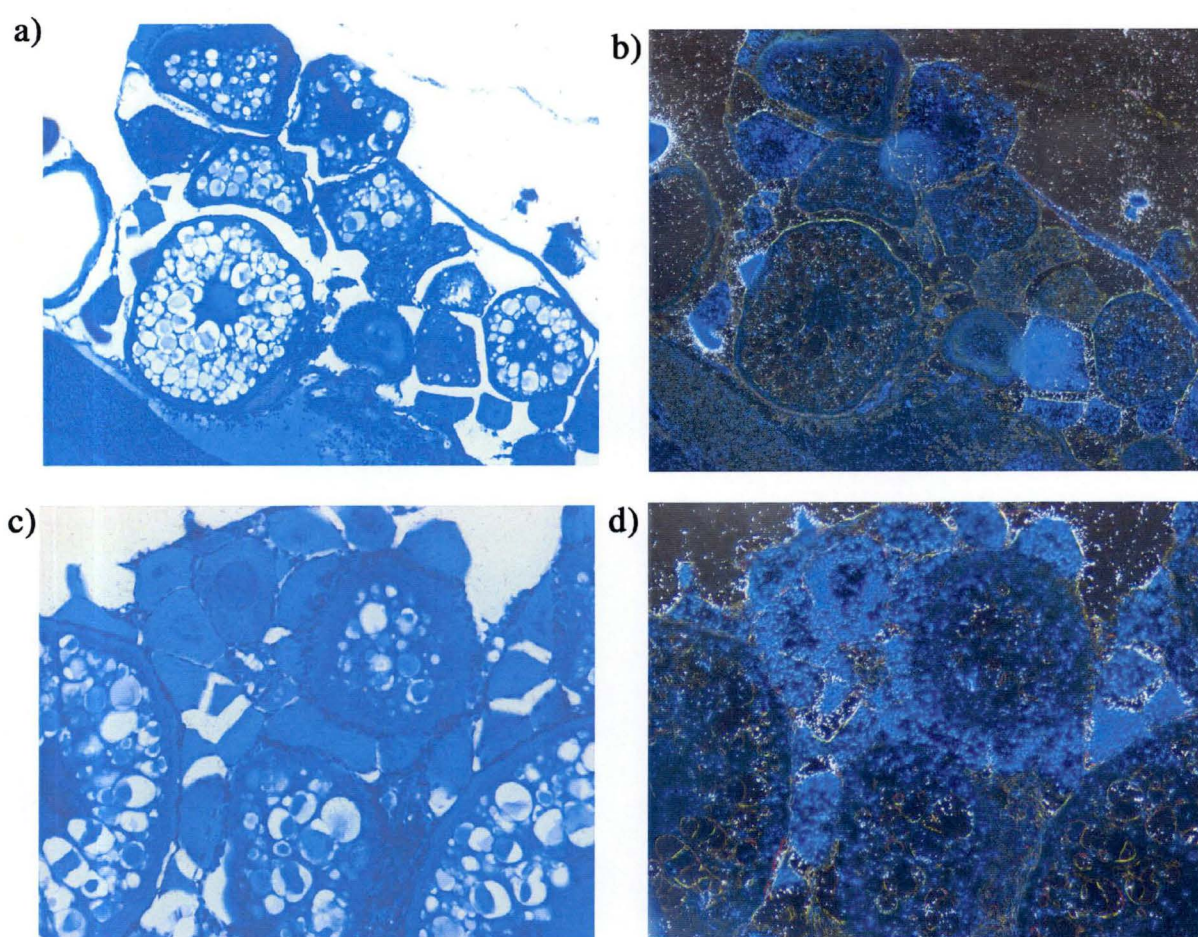


Figure 23. Coupes des organes reproducteurs de la femelle. **a-c.** Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond clair G :100x. **b-d.** Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond noir grossi 100x.

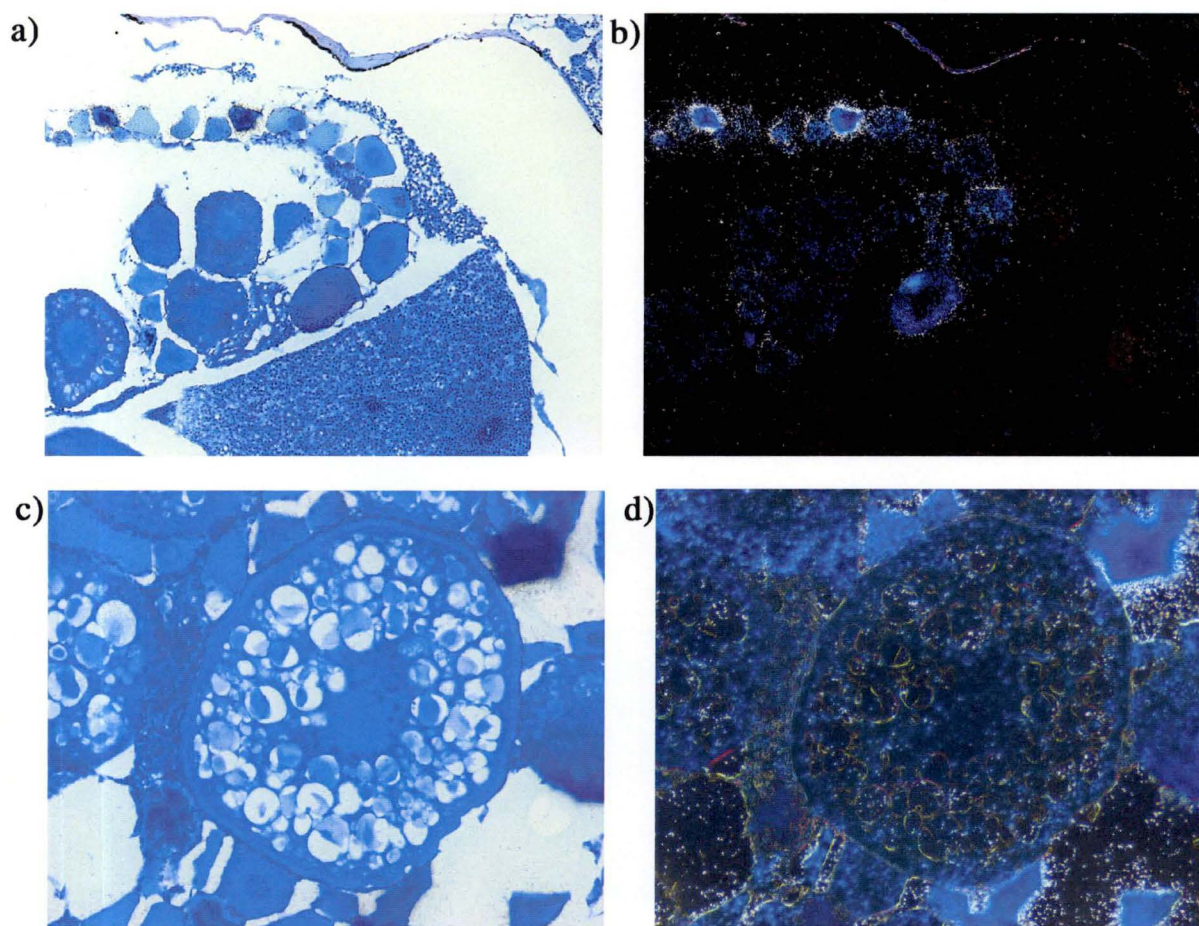


Figure 24. Coupes des organes reproducteurs de la femelle. **a-c.** Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond clair G :100x. **b-d.** Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond noir grossi 100x.

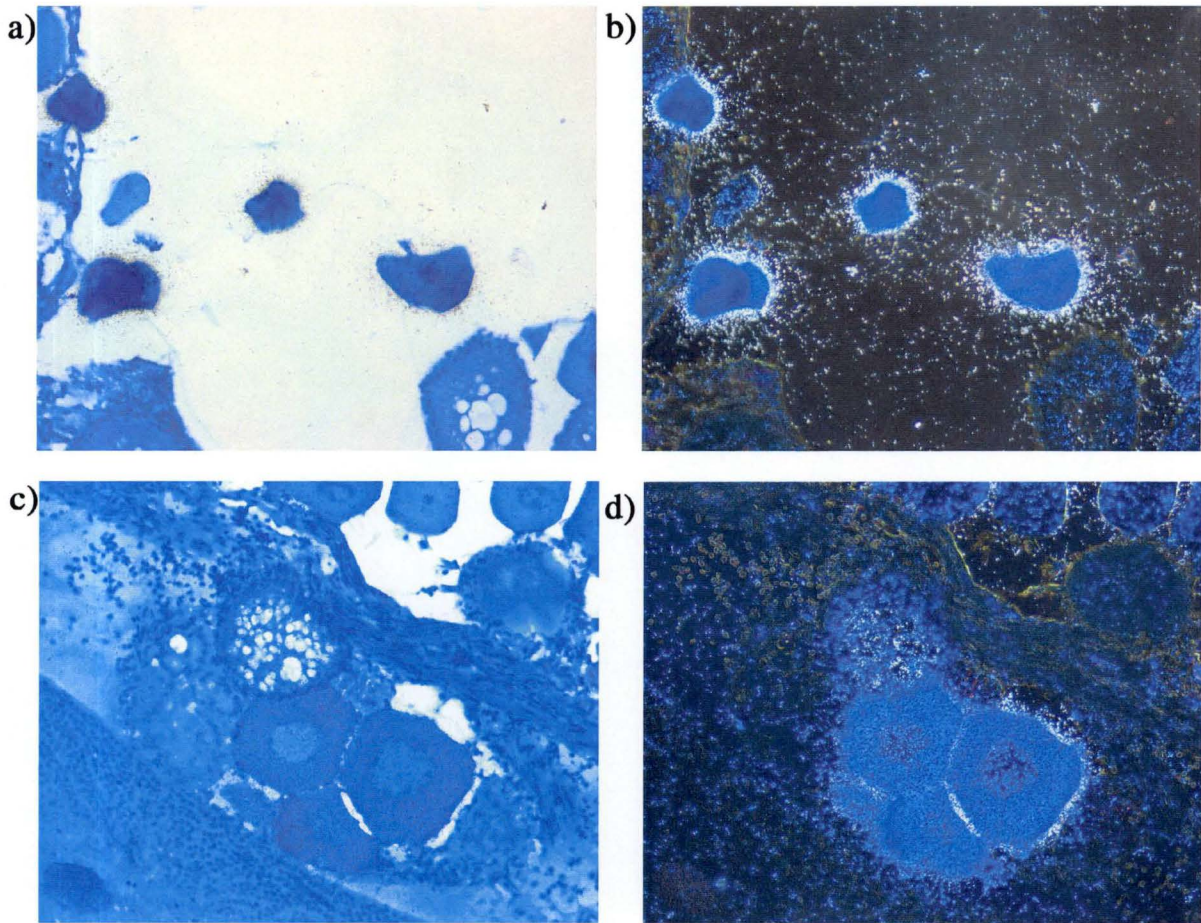


Figure 25. Coupes des organes reproducteurs de la femelle. a. Vue générale des organes internes sur une coupe colorée à l'HES et grossit 12.5x. Le rectangle représente la partie de l'ovaire agrandi. b. Coupe d'ovaire 100x coloré à l'HES. c. Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond clair grossi 100x. d. Coupe d'ovaire 100x coloré à l'HES. e. Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond noir grossi 100x.

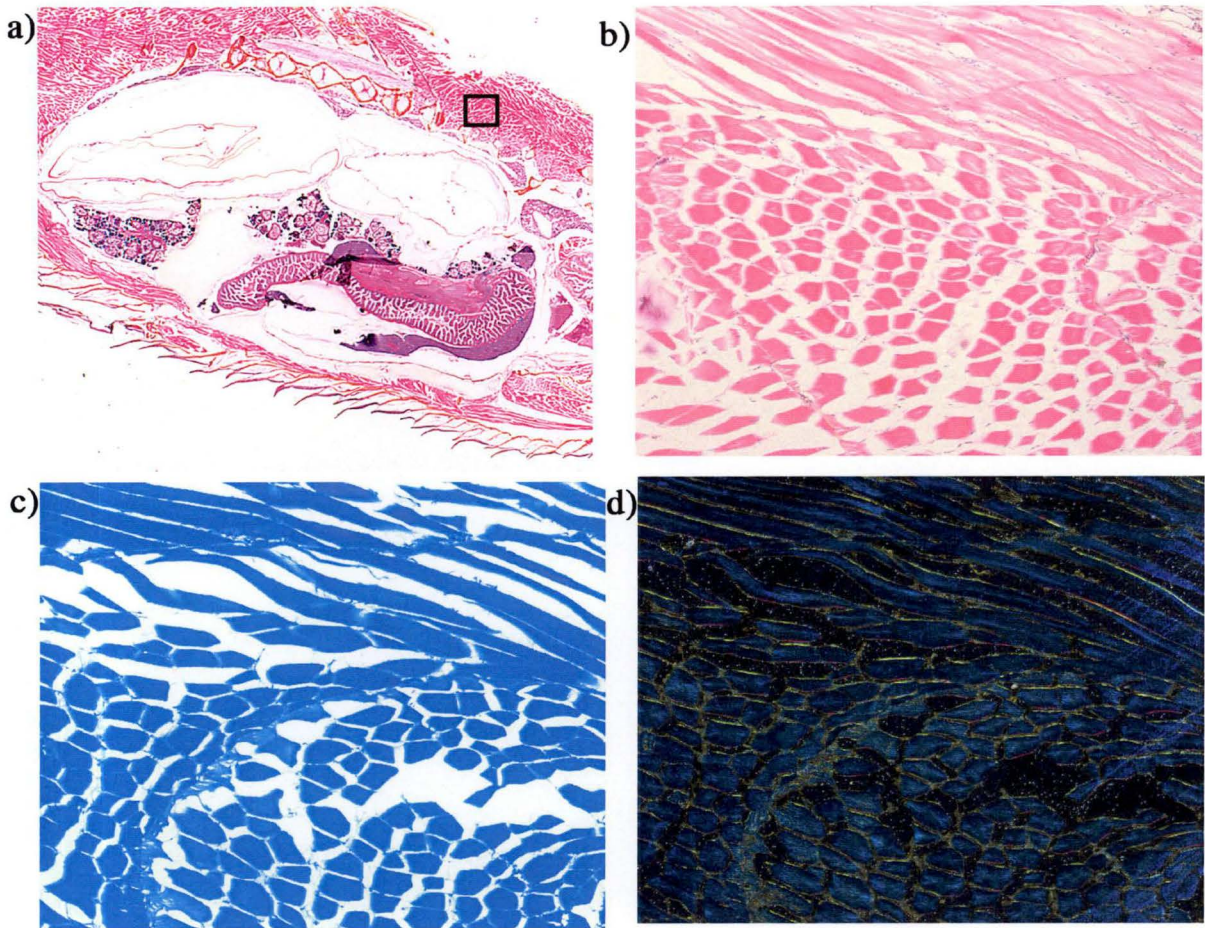


Figure 26. Coupes du muscle de la femelle coupés longitudinalement et transversalement. **a.** Vue générale des organes internes sur une coupe colorée à l'HES G :12.5x. Le rectangle représente la partie de l'ovaire agrandi. **b.** Coupe de muscle colorée à l'HES G :100x. **c.** Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond clair G :100x. **d.** Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond noir grossi 100x.

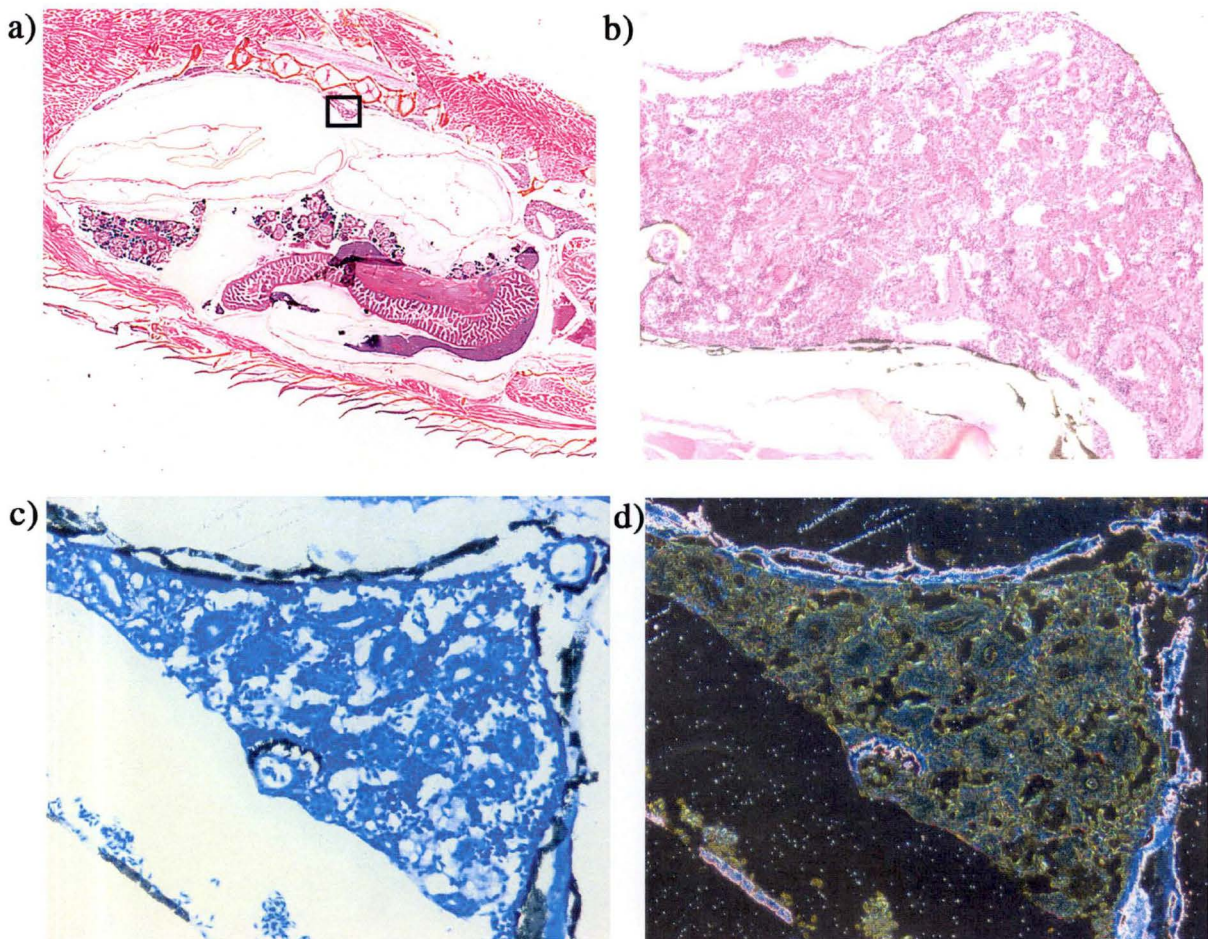


Figure 27. Coupes de rein de la femelle. **a.** Vue générale des organes internes sur une coupe colorée à l'HES G :12.5x. Le rectangle représente la partie de l'ovaire agrandi. **b.** Coupe de rein colorée à l'HES G :200x. **c.** Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond clair G :200x. **d.** Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond noir grossi 200x.

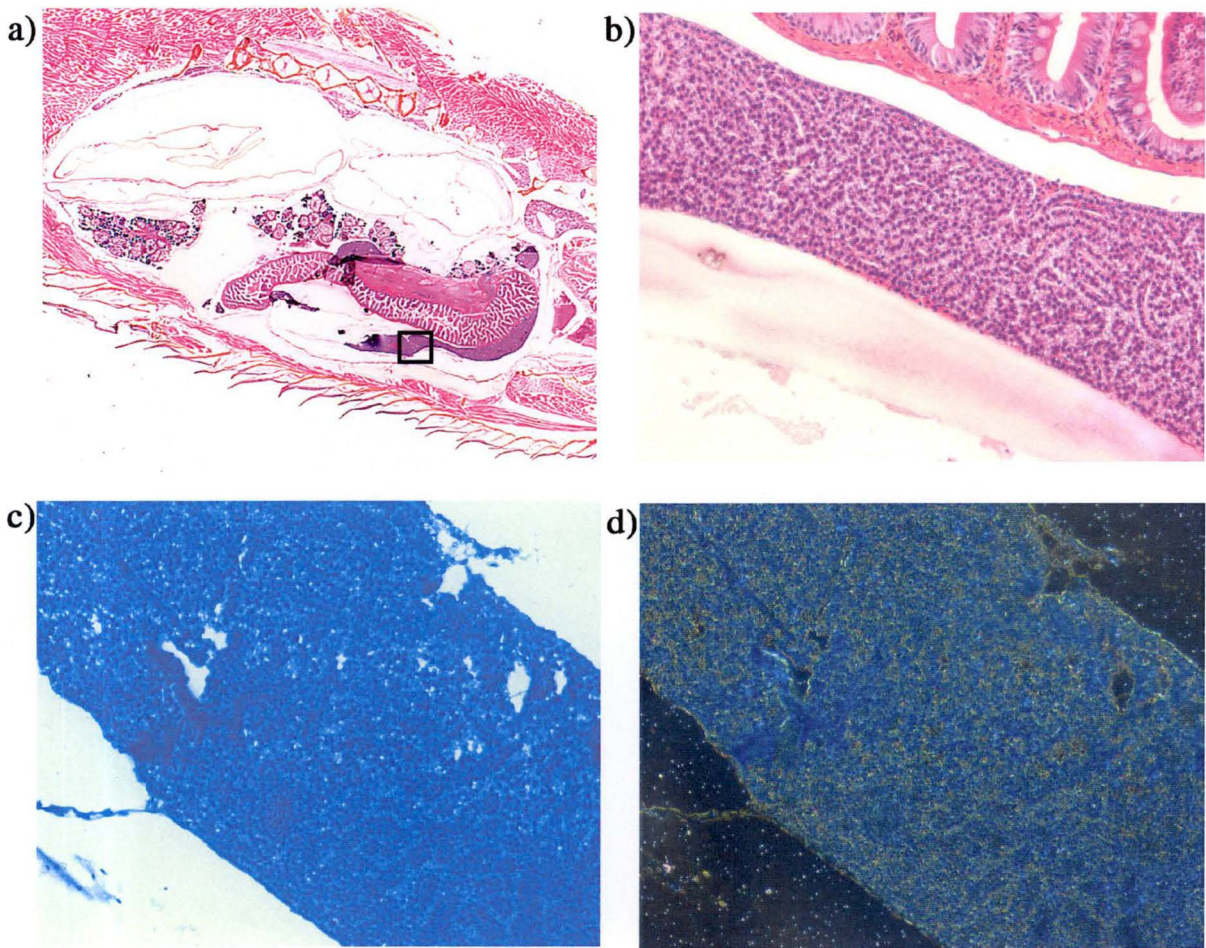


Figure 28. Coupes du foie de la femelle. a. Vue générale des organes internes sur une coupe colorée à l'HES et grossi 12.5x. Le rectangle représente la partie du foie agrandi. b. Coupe d'ovaire 200x coloré à l'HES. c. Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond clair grossi 200x. d. Coupe d'ovaire 100x coloré à l'HES. c. Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond noir grossi 200x.

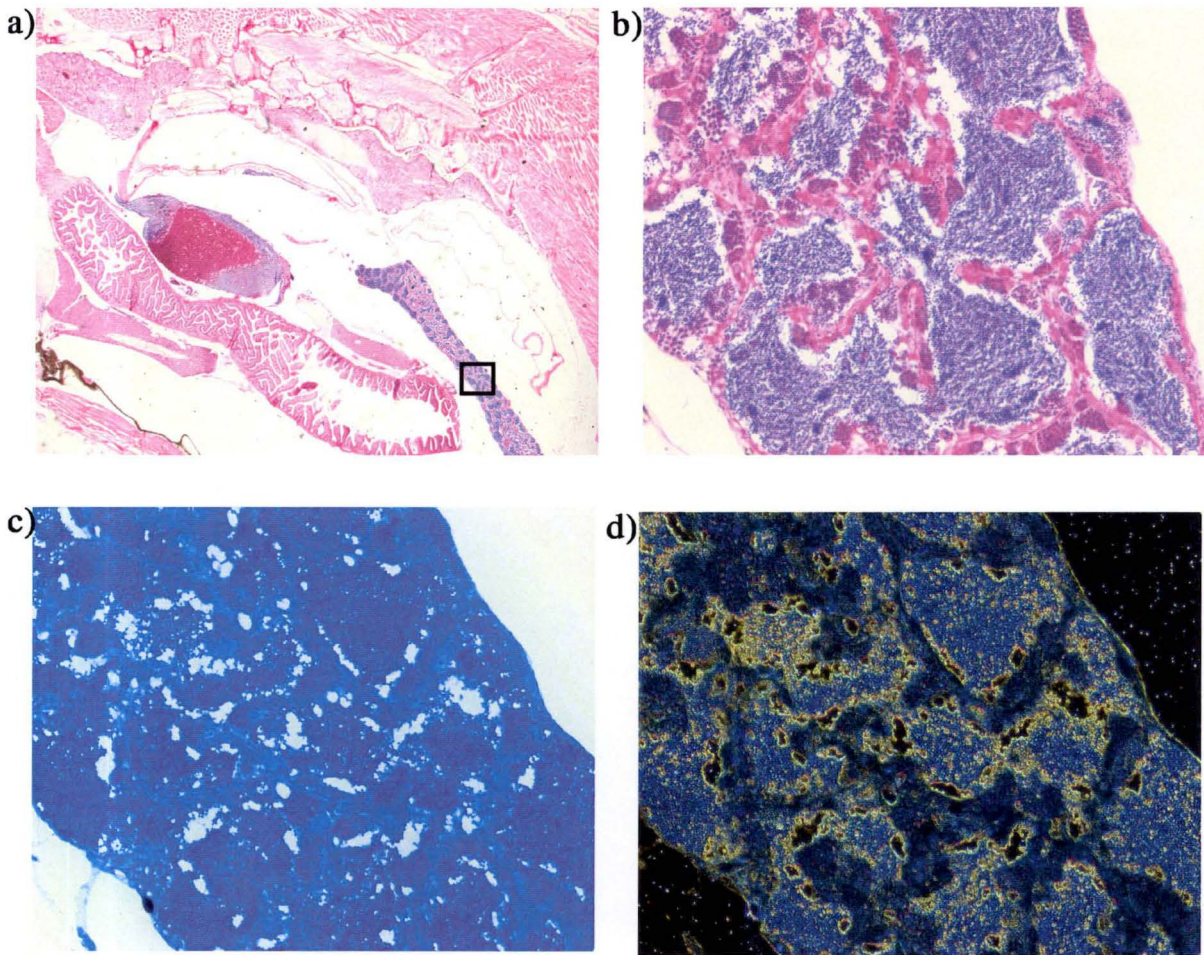


Figure 29. Coupes des organes reproducteur du mâle. a. Vue générale des organes internes sur une coupe colorée à l'HES et grossit 12.5x. Le rectangle représente la partie de l'ovaire agrandi. b. Coupe d'ovaire 100x coloré à l'HES. c. Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond clair grossi 100x. d. Coupe d'ovaire 100x coloré à l'HES. c. Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond noir grossi 100x.

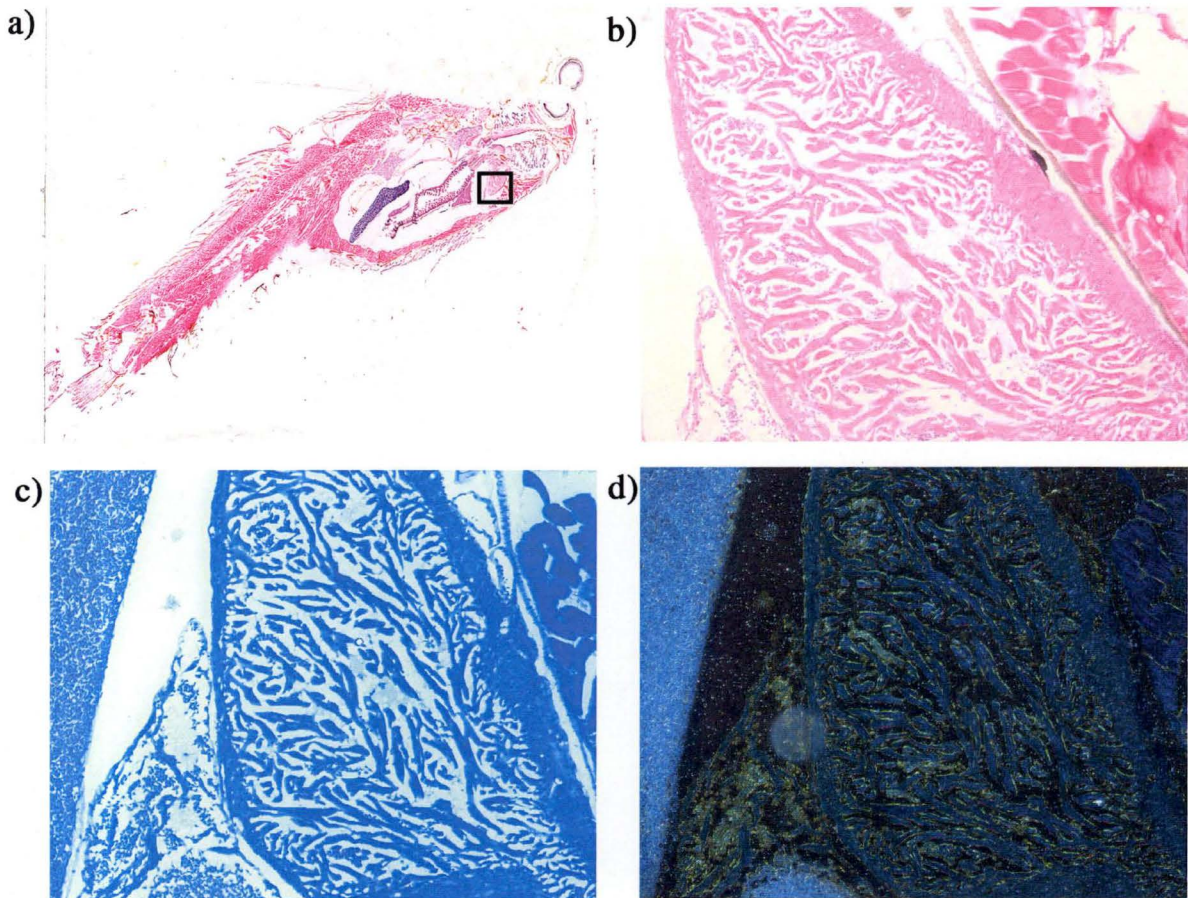


Figure 30. Coupes de cœur de poisson mâle. a. Vue générale des organes internes sur une coupe colorée à l'HES. Le rectangle représente la partie du cœur agrandi. b. Coupe du cœur 100x coloré à l'HES. c. Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond clair grossi 100x. d. Coupe d'ovaire 100x coloré à l'HES. c. Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond noir grossi 100x.

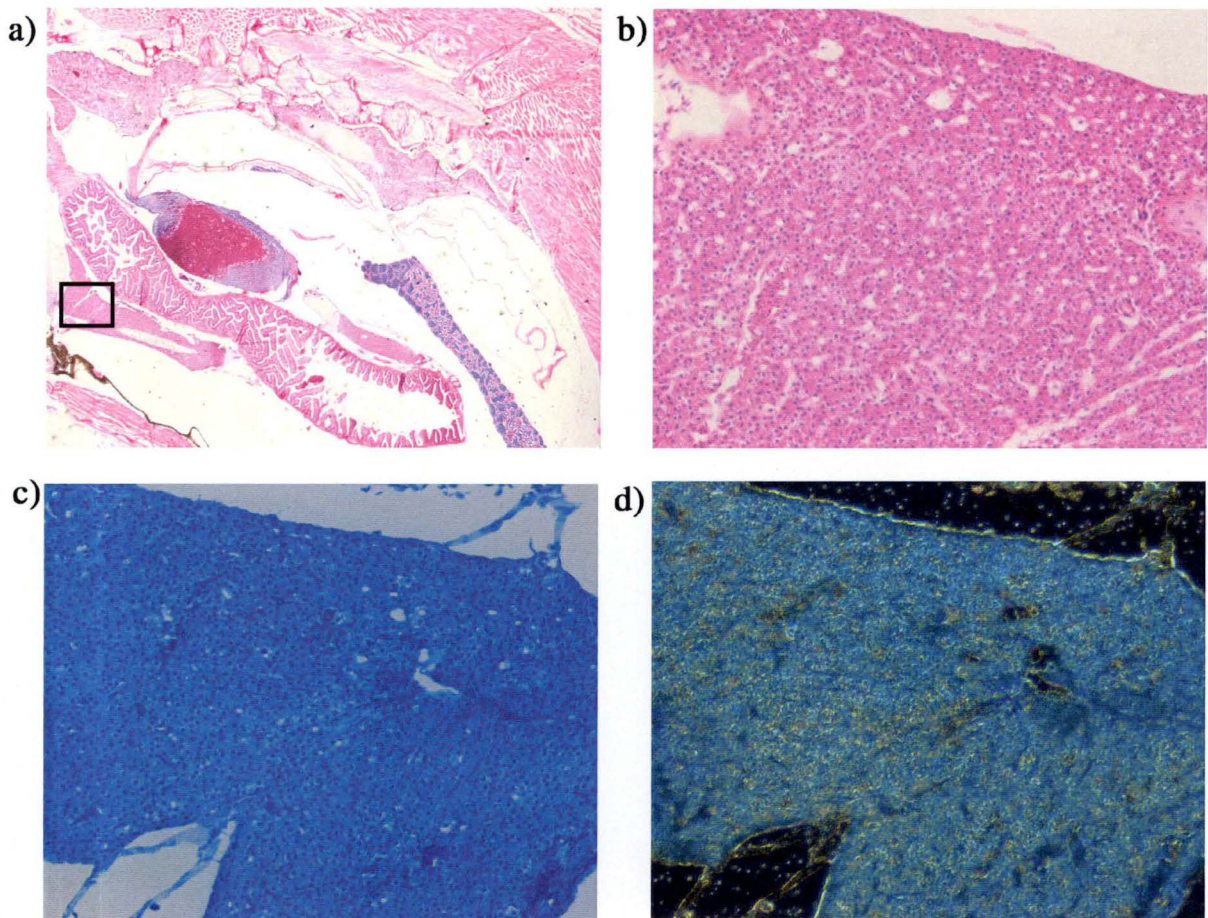


Figure 31. Coupes du foie du mâle. **a.** Vue générale des organes internes sur une coupe colorée à l'HES et G :12.5x. Le rectangle représente la partie de l'ovaire agrandi. **b.** Coupe de foie colorée à l'HES G :100x. **c.** Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond clair G :200x. **d.** Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond noir grossi 200x.

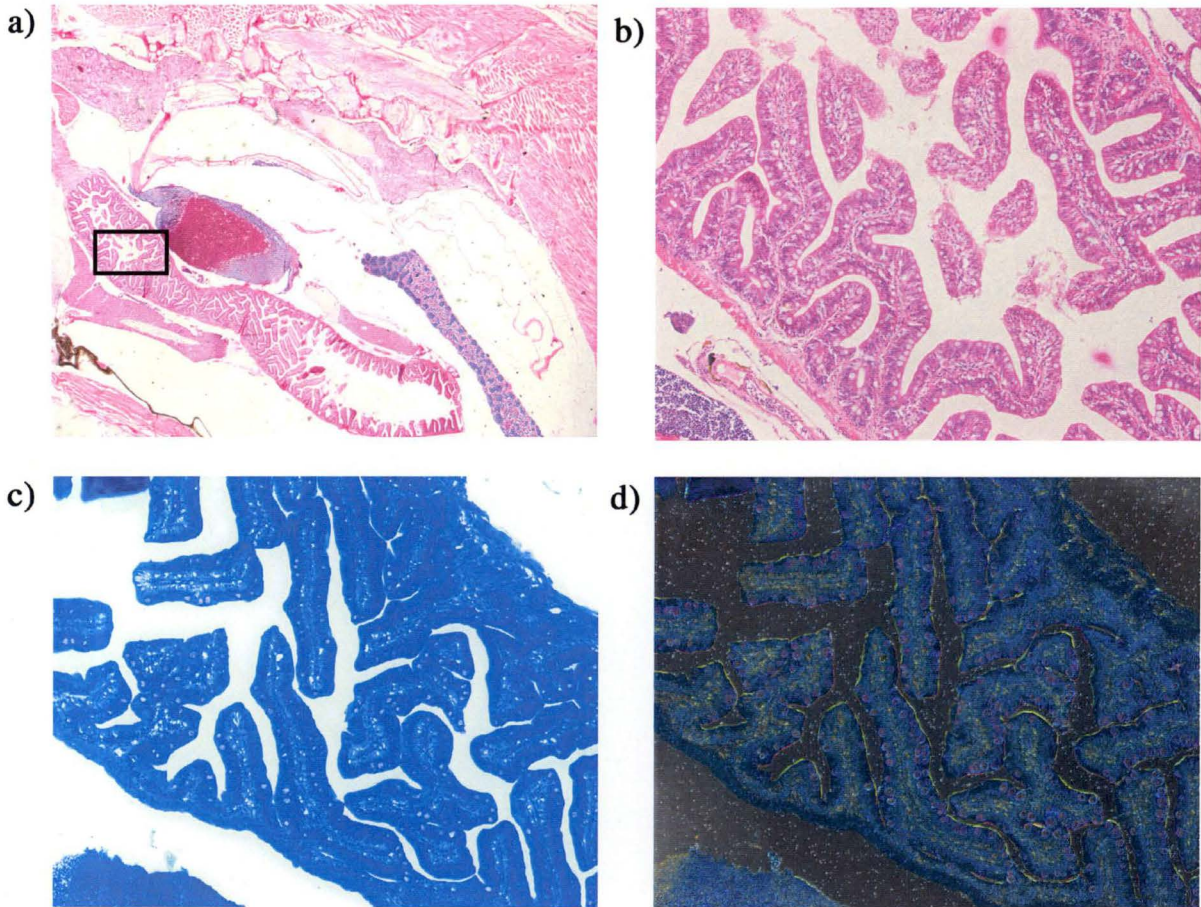


Figure 32. Coupes de l'intestin du mâle. **a.** Vue générale des organes internes sur une coupe colorée à l'HES et G :12.5x. Le rectangle représente la partie de l'ovaire agrandi. **b.** Coupe d'intestin colorée à l'HES G :100x. **c.** Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond clair G 100x. **d.** Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond noir grossi 100x.

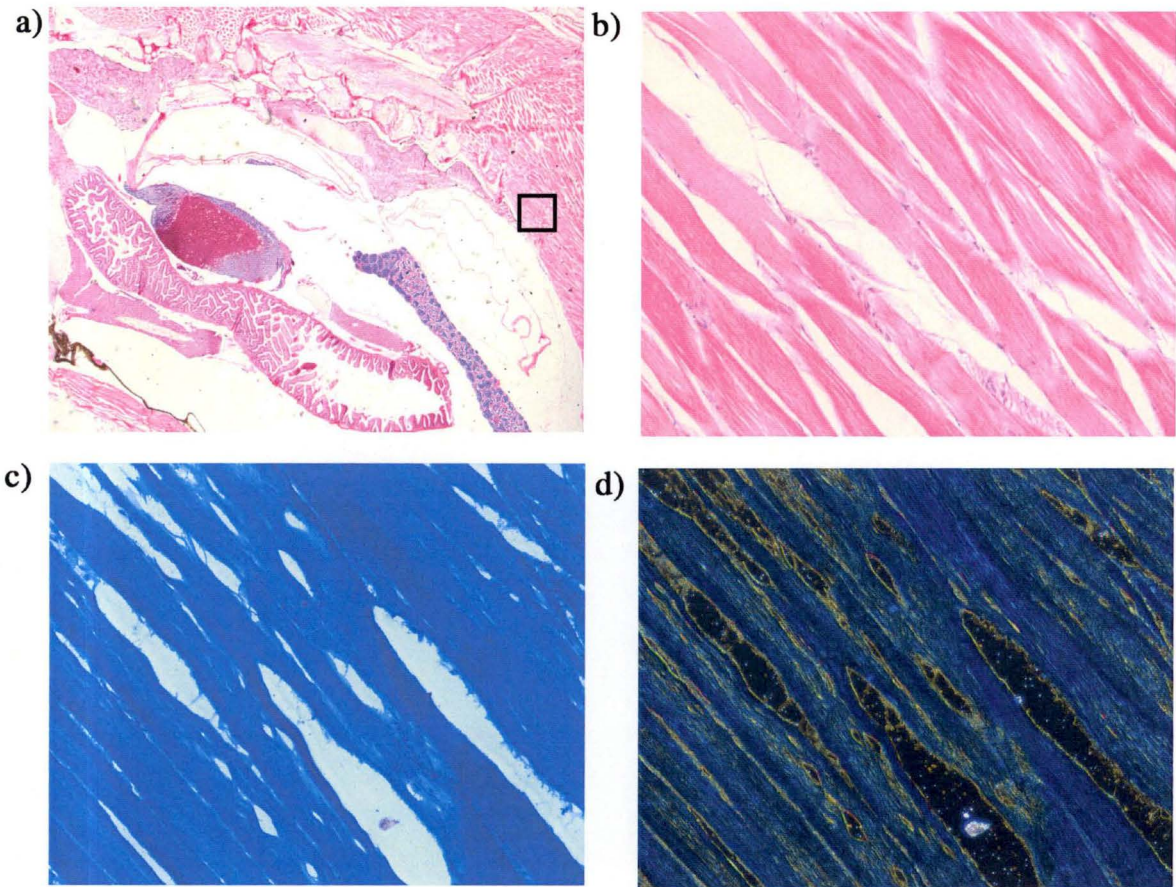


Figure 33. Coupes de muscle du mâle. **a.** Vue générale des organes internes sur une coupe colorée à l'HES G :12.5x. Le rectangle représente la partie de l'ovaire agrandi. **b.** Coupe de muscle colorée à l'HES G :200x. **c.** Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond clair G :200x. **d.** Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond noir G :200x.

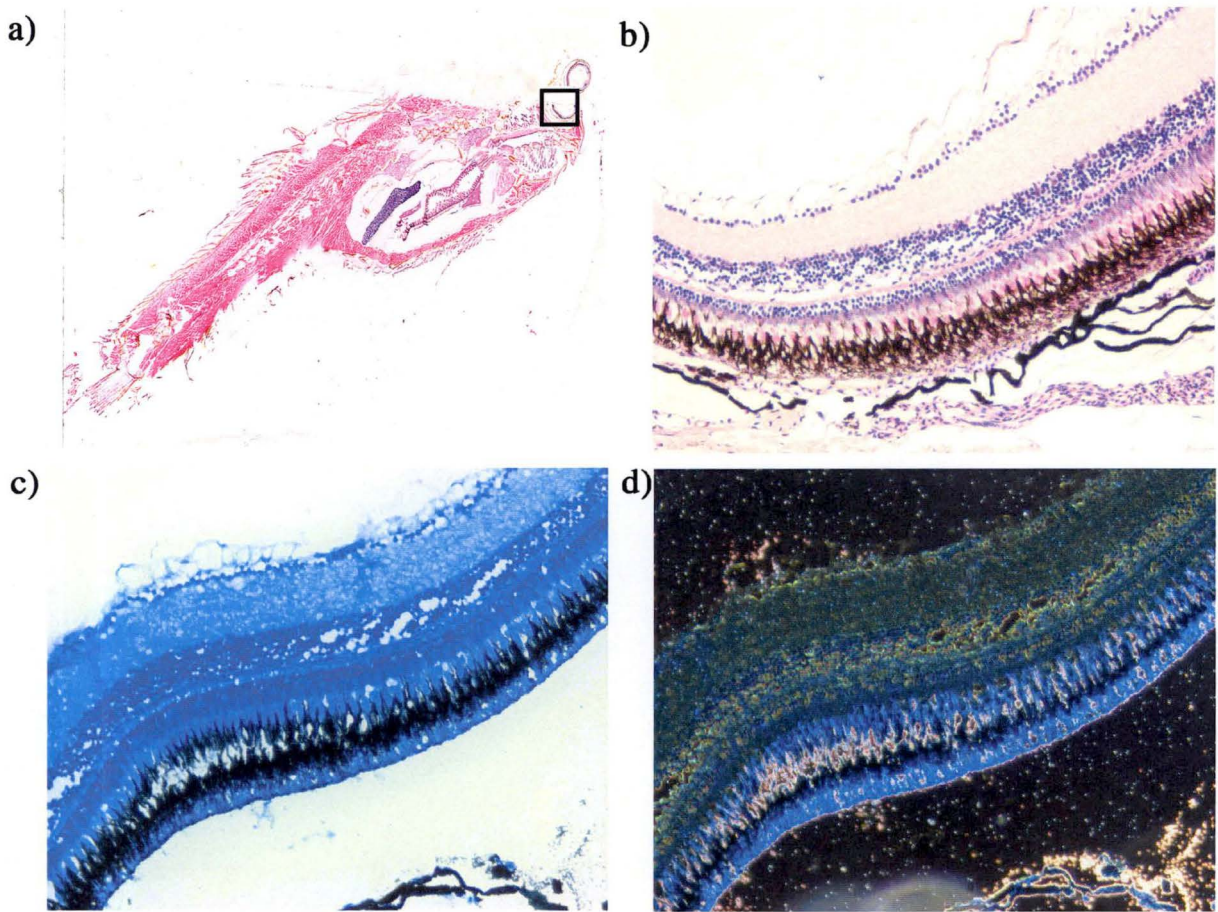


Figure 34. Coupes de l'oeil du mâle. **a.** Vue générale du poisson colorée à l'HES G :12.5x. Le rectangle représente la partie de l'ovaire agrandi. **b.** Coupe de l'oeil colorée à l'HES G :200x. **c.** Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond clair G :200x. **d.** Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond noir G : 200x.

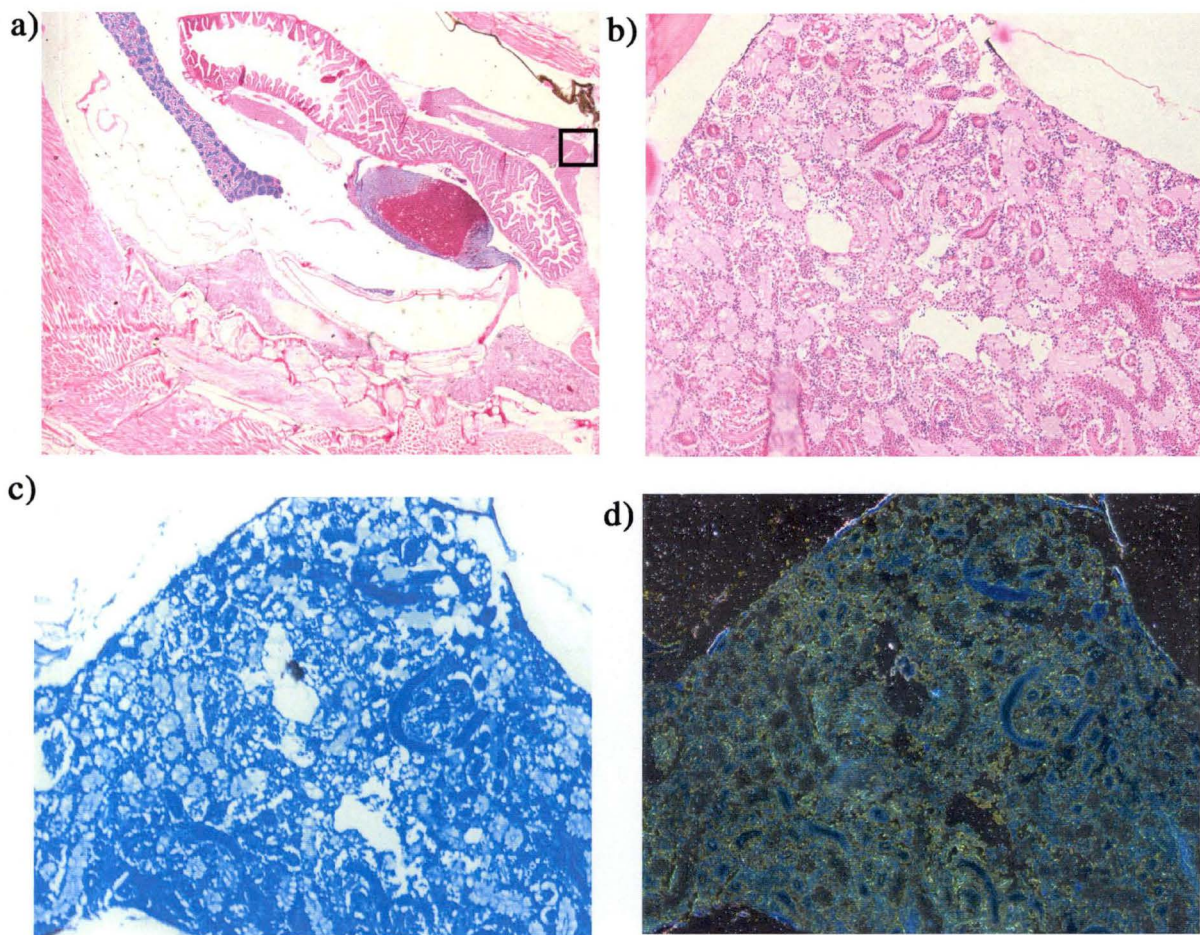


Figure 35. Coupes de rein du mâle. **a.** Vue générale des organes internes sur une coupe colorée à l'HES et grossit 12.5x. Le rectangle représente la partie de l'ovaire agrandi. **b.** Coupe de rein colorée à l'HES G :100x. **c.** Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond clair G :100x. **d.** Coupes hybridées avec la sonde « anti-sens » en fond noir grossi 100x.

III.3. Conclusion et perspectives

Le génome des mammifères contient plusieurs dizaines de gènes *Mage*. La majorité de ces gènes (les *Mage* de type I) sont des rétrogènes et ne sont exprimés que dans la lignée germinale. Par exemple les *Mage-a* sont exprimés dans les spermatogonies, *Mage-b1*, *-b2* et *-b3* sont exprimés dans les spermatoïdes, et *Mage-b4* est exprimé à la fois dans les spermatogonies et dans les ovocytes. Les *Mage* de type II sont au contraire exprimés dans de nombreux tissus somatiques au cours du développement et chez l'adulte. Parmi les gènes de type II, les *Mage-d* ont une structure qui indique clairement qu'ils dérivent en ligne directe du gène *Mage* archétypal qu'on trouve chez les vertébrés non-mammaliens. Tous les autres gènes qu'on trouve aujourd'hui dans le génome des mammifères sont des rétrogènes issus d'événements de rétroposition (suivis de duplications) des gènes archétypaux.

La fonction des protéines *Mage* reste mal définie, mais des observations réalisées *in vitro* et l'examen de souris déficientes en *Mage-d1* indiquent que cette protéine a un rôle dans certaines cascades signalétiques aboutissant à l'apoptose. La protéine *Necdin* semble au contraire protéger certains neurones de l'apoptose et permettre leur maintien dans un état post-mitotique.

Le gène *Mage* du poisson zèbre ne contient qu'un seul gène *Mage*, *ndnl2*. Ce gène a la même structure et les mêmes sites d'épissage que les *Mage-d* des mammifères. *Ndnl2* est donc un représentant actuel du gène *Mage* originel des vertébrés.

Nous avons étudié le profil d'expression de *ndnl2* et avons été surpris que ce gène s'exprime chez l'adulte, à la manière des gènes « secondaires » de type I des mammifères : dans les cellules de la lignée germinale, avec la différence notable que *ndnl2* s'exprime uniquement dans la gonade mâle.

Il est tentant d'imaginer que *ndnl2* participe à la différenciation sexuelle des gonades. En effet, l'apoptose joue un rôle central dans cette différenciation en éliminant les gonocytes de la gonade mâle, ce qui permet à la spermatogenèse de démarrer. Les oocytes des poissons femelles sont épargnés par cette apoptose et poursuivent leur maturation. On pourrait alors imaginer que *ndnl2* soit exprimé spécifiquement dans les gonocytes femelles et les protège de l'apoptose qui se produit chez les mâles. Avant d'examiner plus avant cette hypothèse, il nous faudra naturellement déterminer si *ndnl2* est exprimé dans les gonades immatures, au moment où la vague apoptotique ravage le testicule qui commence à se différencier. Si c'était le cas, *ndnl2* pourrait être un gène de différenciation sexuelle. L'expression de *ndnl2* pourrait alors dépendre d'un « master gene », à moins que *ndnl2* ne soit lui-même un « master gene ». Dans ce dernier cas, le chromosome 23 où se trouve situé *ndnl2* pourrait exister sous une forme « femelle » avec *ndnl2*, 23^{ndnl2} , ou sous une forme « mâle », 23^0 dépourvue de *ndnl2*. Cette hypothèse audacieuse pourrait être facilement testée par une analyse de poissons mâles et femelles en « Southern blot ».

Outre ces perspectives très orientées, nous pourrions à l'avenir essayer d'identifier grâce à la méthode du double hybride dans la levure, des partenaires interactionnels de *ndnl2*. L'identification de tels partenaires pourrait nous mettre sur la voie de la fonction moléculaire de *ndnl2*.

*Références
bibliographiques*

Atlas digital de morphologie microscopique du Département d'histologie et embryologie

Papers to Appear in Forthcoming Issues. *Cell Immunol* **185**, 82 (1998).

Barker, P. A. & Salehi, A. The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *J Neurosci Res* **67**, 705-712 (2002).

Bertrand, M., Huijbers, I., Chomez, P. & De Backer, O. Comparative expression analysis of the MAGED genes during embryogenesis and brain development. *Dev Dyn* **230**, 325-334 (2004).

Bischof, J. M., Ekker, M. & Wevrick, R. A MAGE/NDN-like gene in zebrafish. *Dev Dyn* **228**, 475-479 (2003).

Blackburn, D. in *Encyclopedia of reproduction* (ed. NPG) 994-1003 (New York, 1999).

Boon, T., Cerottini, J. C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P. & Van Pel, A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **12**, 337-365 (1994).

Chomez, P., De Backer, O., Bertrand, M., De Plaen, E., Boon, T. & Lucas, S. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res* **61**, 5544-5551 (2001).

Clotman, F., De Backer, O., De Plaen, E., Boon, T. & Picard, J. Cell- and stage-specific expression of mage genes during mouse spermatogenesis. *Mamm Genome* **11**, 696-699 (2000).

Cooper, D. in *Encyclopedia of the human genome* (ed. NPG) 135 (London, 2003).

De Backer, O., Arden, K. C., Boretta, M., Vantomme, V., De Smet, C., Czekay, S., Viars, C. S., De Plaen, E., Brasseur, F., Chomez, P., Van den Eynde, B., Boon, T. & van der Bruggen, P. Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res* **59**, 3157-3165 (1999).

De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J. J., Szikora, J. P., De Smet, C., Brasseur, F., van der Bruggen, P., Lethe, B., Lurquin, C. & et al. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* **40**, 360-369 (1994).

De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F. & Boon, T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7149-7153 (1996).

Fraenkel, P. a. Z., L. in *Encyclopedia of the human genome* (ed. NPG) 819-822 (London, 2003).

Inohara, N. & Nunez, G. Genes with homology to mammalian apoptosis regulators identified in zebrafish. *Cell Death Differ* **7**, 509-510 (2000).

- Jordan, B. W., Dinev, D., LeMellay, V., Troppmair, J., Gotz, R., Wixler, L., Sendtner, M., Ludwig, S. & Rapp, U. R. Neurotrophin receptor-interacting mage homologue is an inducible inhibitor of apoptosis protein-interacting protein that augments cell death. *J Biol Chem* **276**, 39985-39989 (2001).
- Lee, S., Walker, C. L., Karten, B., Kuny, S. L., Tennese, A. A., O'Neill, M. A. & Wevrick, R. Essential role for the Prader-Willi syndrome protein necdin in axonal outgrowth. *Hum Mol Genet* **14**, 627-637 (2005).
- Lucas, S., Brasseur, F. & Boon, T. A new MAGE gene with ubiquitous expression does not code for known MAGE antigens recognized by T cells. *Cancer Res* **59**, 4100-4103 (1999).
- Lucas, S., De Plaen, E. & Boon, T. MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2, and MAGE-C3: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression. *Int J Cancer* **87**, 55-60 (2000).
- Lurquin, C., De Smet, C., Brasseur, F., Muscatelli, F., Martelange, V., De Plaen, E., Brasseur, R., Monaco, A. P. & Boon, T. Two members of the human MAGEB gene family located in Xp21.3 are expressed in tumors of various histological origins. *Genomics* **46**, 397-408 (1997).
- Ma, Z., Khatlani, T. S., Ohno, K., Sasaki, K., Inokuma, H. & Onishi, T. Cloning and sequencing of canine MAGE cDNA. *Tissue Antigens* **56**, 166-169 (2000).
- Masuda, Y., Sasaki, A., Shibuya, H., Ueno, N., Ikeda, K. & Watanabe, K. Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptional function. *J Biol Chem* **276**, 5331-5338 (2001).
- Miura, T. in *Encyclopedia of reproduction* (ed. NPG) 571-577 (New York, 1999).
- Muscatelli, F., Abrous, D. N., Massacrier, A., Boccaccio, I., Le Moal, M., Cau, P. & Cremer, H. Disruption of the mouse Necdin gene results in hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet* **9**, 3101-3110 (2000).
- Nüsslein Volhard, C. D., R. in *Zebrafish 1-5* (New York, 2002).
- Stone, B., Schummer, M., Paley, P. J., Crawford, M., Ford, M., Urban, N. & Nelson, B. H. MAGE-F1, a novel ubiquitously expressed member of the MAGE superfamily. *Gene* **267**, 173-182 (2001).
- Taylor, J. S., Braasch, I., Frickey, T., Meyer, A. & Van de Peer, Y. Genome duplication, a trait shared by 22000 species of ray-finned fish. *Genome Res* **13**, 382-390 (2003).
- Tcherpakov, M., Bronfman, F. C., Conticello, S. G., Vaskovsky, A., Levy, Z., Niinobe, M., Yoshikawa, K., Arenas, E. & Fainzilber, M. The p75 neurotrophin receptor interacts with multiple MAGE proteins. *J Biol Chem* **277**, 49101-49104 (2002).

- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T. & Iguchi, T. Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *J Exp Biol* **205**, 711-718 (2002).
- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T. & Iguchi, T. An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **137**, 11-20 (2004).
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. & Boon, T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**, 1643-1647 (1991).
- Yamashita, M. Apoptosis in zebrafish development. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **136**, 731-742 (2003).
- Papers to Appear in Forthcoming Issues. *Cell Immunol* **185**, 82 (1998).
- Barker, P. A. & Salehi, A. The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *J Neurosci Res* **67**, 705-712 (2002).
- Bertrand, M., Huijbers, I., Chomez, P. & De Backer, O. Comparative expression analysis of the MAGED genes during embryogenesis and brain development. *Dev Dyn* **230**, 325-334 (2004).
- Bischof, J. M., Ekker, M. & Wevrick, R. A MAGE/NDN-like gene in zebrafish. *Dev Dyn* **228**, 475-479 (2003).
- Blackburn, D. in *Encyclopedia of reproduction* (ed. NPG) 994-1003 (New York, 1999).
- Boon, T., Cerottini, J. C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P. & Van Pel, A. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* **12**, 337-365 (1994).
- Chomez, P., De Backer, O., Bertrand, M., De Plaen, E., Boon, T. & Lucas, S. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res* **61**, 5544-5551 (2001).
- Clotman, F., De Backer, O., De Plaen, E., Boon, T. & Picard, J. Cell- and stage-specific expression of mage genes during mouse spermatogenesis. *Mamm Genome* **11**, 696-699 (2000).
- Cooper, D. in *Encyclopedia of the human genome* (ed. NPG) 135 (London, 2003).
- De Backer, O., Arden, K. C., Boretto, M., Vantomme, V., De Smet, C., Czekay, S., Viars, C. S., De Plaen, E., Brasseur, F., Chomez, P., Van den Eynde, B., Boon, T. & van der Bruggen, P. Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res* **59**, 3157-3165 (1999).

- De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J. J., Szikora, J. P., De Smet, C., Brasseur, F., van der Bruggen, P., Lethe, B., Lurquin, C. & et al. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* **40**, 360-369 (1994).
- De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F. & Boon, T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci US A* **93**, 7149-7153 (1996).
- Fraenkel, P. a. Z., L. in *Encyclopedia of the human genome* (ed. NPG) 819-822 (London, 2003).
- Inohara, N. & Nunez, G. Genes with homology to mammalian apoptosis regulators identified in zebrafish. *Cell Death Differ* **7**, 509-510 (2000).
- Jordan, B. W., Dinev, D., LeMellay, V., Troppmair, J., Gotz, R., Wixler, L., Sendtner, M., Ludwig, S. & Rapp, U. R. Neurotrophin receptor-interacting mage homologue is an inducible inhibitor of apoptosis protein-interacting protein that augments cell death. *J Biol Chem* **276**, 39985-39989 (2001).
- Laduron, S., Deplus, R., Zhou, S., Kholmanskikh, O., Godelaine, D., De Smet, C., Hayward, S. D., Fuks, F., Boon, T. & De Plaen, E. MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription. *Nucleic Acids Res* **32**, 4340-4350 (2004).
- Lee, S., Walker, C. L., Karten, B., Kuny, S. L., Tennese, A. A., O'Neill, M. A. & Wevrick, R. Essential role for the Prader-Willi syndrome protein neclin in axonal outgrowth. *Hum Mol Genet* **14**, 627-637 (2005).
- Lucas, S., Brasseur, F. & Boon, T. A new MAGE gene with ubiquitous expression does not code for known MAGE antigens recognized by T cells. *Cancer Res* **59**, 4100-4103 (1999).
- Lucas, S., De Plaen, E. & Boon, T. MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2, and MAGE-C3: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression. *Int J Cancer* **87**, 55-60 (2000).
- Lurquin, C., De Smet, C., Brasseur, F., Muscatelli, F., Martelange, V., De Plaen, E., Brasseur, R., Monaco, A. P. & Boon, T. Two members of the human MAGEB gene family located in Xp21.3 are expressed in tumors of various histological origins. *Genomics* **46**, 397-408 (1997).
- Ma, Z., Khatlani, T. S., Ohno, K., Sasaki, K., Inokuma, H. & Onishi, T. Cloning and sequencing of canine MAGE cDNA. *Tissue Antigens* **56**, 166-169 (2000).
- Masuda, Y., Sasaki, A., Shibuya, H., Ueno, N., Ikeda, K. & Watanabe, K. Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptional function. *J Biol Chem* **276**, 5331-5338 (2001).
- Miura, T. in *Encyclopedia of reproduction* (ed. NPG) 571-577 (New York, 1999).

- Muscatelli, F., Abrous, D. N., Massacrier, A., Boccaccio, I., Le Moal, M., Cau, P. & Cremer, H. Disruption of the mouse Necdin gene results in hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet* **9**, 3101-3110 (2000).
- Nüsslein Volhard, C. D., R. in *Zebrafish 1-5* (New York, 2002).
- Stone, B., Schummer, M., Paley, P. J., Crawford, M., Ford, M., Urban, N. & Nelson, B. H. MAGE-F1, a novel ubiquitously expressed member of the MAGE superfamily. *Gene* **267**, 173-182 (2001).
- Taylor, J. S., Braasch, I., Frickey, T., Meyer, A. & Van de Peer, Y. Genome duplication, a trait shared by 22000 species of ray-finned fish. *Genome Res* **13**, 382-390 (2003).
- Tcherpakov, M., Bronfman, F. C., Conticello, S. G., Vaskovsky, A., Levy, Z., Niinobe, M., Yoshikawa, K., Arenas, E. & Fainzilber, M. The p75 neurotrophin receptor interacts with multiple MAGE proteins. *J Biol Chem* **277**, 49101-49104 (2002).
- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T. & Iguchi, T. Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *J Exp Biol* **205**, 711-718 (2002).
- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T. & Iguchi, T. An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **137**, 11-20 (2004).
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. & Boon, T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**, 1643-1647 (1991).
- Van Der Bruggen, P., Zhang, Y., Chaux, P., Stroobant, V., Panichelli, C., Schultz, E. S., Chapiro, J., Van Den Eynde, B. J., Brasseur, F. & Boon, T. Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells. *Immunol Rev* **188**, 51-64 (2002).
- Yamashita, M. Apoptosis in zebrafish development. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **136**, 731-742 (2003).

17 JUIN 2005

SECRETARIAT BIOLOGIE
F.U.N.D.P.
Rue de Bruxelles, 59
B 5000 NAMUR (Belgique)
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20