



UNIVERSITÉ
DE NAMUR

Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche

researchportal.unamur.be

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Mapping de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris

Bar, Isabelle

Award date:
1991

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES

Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/23.03.91

Mapping de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris

BAR Isabelle

Résumé

Un projet de cartographie de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris est en cours, en vue de l'isolement du gène *reeler* qui joue un rôle essentiel dans le développement du système nerveux central. Dans le cadre de ce projet, nous avons localisé le gène de la sorcine (un des gènes amplifiés et surexprimés dans les lignées cellulaires présentant un phénotype MDR) par rapport au locus *reeler* et à d'autres marqueurs de l'extrémité centromérique du chromosome 5. Nous avons également tenté de mettre en évidence un polymorphisme pour le locus de la sorcine après amplification par PCR. Cette approche nous a conduit à isoler un fragment de gène de la cyclophiline de souris. Enfin, de nouveaux marqueurs de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de souris ont été recherchés par screening de banques génomiques de cosmides et de phages spécifiques du chromosome 7 humain, qui possède une zone d'homologie avec la partie proximale du chromosome 5 de souris.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1991

Promoteur : J. Vandenhante

Copromoteur : A.M. Goffinet

Je tiens à remercier tout spécialement le Professeur J.Vandenhaute, qui a permis la réalisation de ce mémoire.

Merci au Professeur A.M. Goffinet pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et suivi au cours de ce travail.

Merci également à tous les membres du laboratoire, Christiane, Danielle, Daniel, I.Becsei, Marie-Claire, Pascal et Thanh, pour leur bonne humeur et leur assistance efficace.

Toute ma reconnaissance à Melle M. Raes, Mme S. Wattiaux, Meurs J.L. Bister et O. Laloux, qui ont accepté de lire ce mémoire.

Merci à mes amis pour le soutien moral qu'ils m'ont apporté au cours de ce travail et de ces 4 années d'étude.

A ma famille, sans qui rien de ceci n'aurait été possible,

merci.

TABLE DE MATIERES

Chapitre I. INTRODUCTION.

I. Introduction: la mutation neurologique <i>reeler</i>.	I.1
II. Objectifs du travail.	I.4
III. Localisation du gène codant pour la sorcine par rapport au locus <i>reeler</i>.	I.5
III.1. La sorcine et le phénomène "multidrug resistance".	I.5
III.2. Intérêt du choix de la sorcine.	I.7
III.2.1. Position du locus <i>reeler</i> par rapport au point de translocation <i>T31H</i> .	I.7
III.2.2. Localisation des loci <i>mdr-1</i> et <i>En-2</i> par rapport au point de translocation <i>T31H</i> .	I.8
III.2.3. Analyse de lignées congéniques.	I.9
III.2.4. Conclusions de ces expériences et critères influençant le choix de la sorcine.	I.13
III.3. Estimation de la distance génétique entre le locus <i>reeler</i> et les loci voisins.	I.14
III.3.1. Rappel théorique: calcul de la distance génétique.	I.14
III.3.2. Technique permettant le calcul des distances génétiques.	I.14
III.3.3. Application à la détermination de la distance génétique séparant <i>reeler</i> des loci voisins.	I.16
IV. Recherche de nouveaux marqueurs de l'extrémité centromérique du chromosome 5.	I.19
IV.1. Choix des banques chromosomiques.	I.19
IV.2. Banques génomiques dérivées du chromosome 7 humain: stratégie de screening.	I.20

Chapitre II. MATERIEL ET METHODES.

I. Tampons, enzymes et solutions stocks.	II.1
II. Milieux de culture pour bactéries, bactériophages λ, antibiotiques.	II.3
II.1. Milieu liquide LB.	II.3
II.2. Milieux solides contenant de l'agar ou de l'agarose.	II.3
II.3. Solutions d'antibiotiques.	II.3
II.4. Solutions pour culture de bactériophage λ .	II.3

III. Quelques techniques couramment utilisées en biologie moléculaire.	II.4
III.1. Digestions enzymatiques.	II.4
III.2. Electrophorèse en gel d'agarose.	II.4
III.3. Electrophorèse en gel de polyacrymalide.	II.7
III.4. Purification d'acides nucléiques: extraction par phénol-chloroforme.	II.7
IV. Extraction de DNA génomique à partir de tissus provenant de mammifères.	II.7
IV.1. Principe.	II.7
IV.2. Pour extraction à partir de cellules de souris ou de hamster.	II.7
IV.3. Pour extraction de DNA à partir de cellules de sang humain.	II.9
V. Extraction de DNA plasmique.	II.9
VI. Techniques de screening de banques génomiques: hybridation sur plaques et hybridation sur colonies.	II.10
VI.1. Screening d'une banque de phages λ spécifique du chromosome 7 humain: hybridation sur plaques.	II.10
VI.2. Screening d'une banque de cosmides spécifique du chromosome 7 humain: hybridation sur colonies.	II.13
VII. Southern Blotting alcalin.	II.16
VII.1. Séparation des fragments de restriction de DNA génomique par électrophorèse sur gel d'agarose.	II.17
VII.2. Transfert du DNA sur membrane denylon: Southern Blotting alcalin.	II.17
VIII. Techniques d'hybridation à l'aide de sondes radioactives.	II.18
VIII.1. Principe.	II.18
VIII.2. Aspects théoriques.	II.18
VIII.3. Préparation de sondes radioactives: Multiprime DNA labelling system.	II.19
VIII.4. Préhybridation des membranes.	II.21
VIII.5. Hybridation des membranes.	II.21
VIII.6. Lavage des membranes.	II.21
VIII.7. Autoradiographie des membranes.	II.22
IX. Synthèse des oligonucléotides.	II.22
IX.1. Matériel de départ : premier nucléoside fixé sur support solide et phosphoramidites.	II.22
IX.2. Synthèse d'un oligonucléotide.	II.23

X. Techniques de PCR.	II.26
X.1. Principe.	II.26
X.2. Mise en oeuvre d'une PCR.	II.27
X.3. Protocole standard d'une PCR.	II.29
XI. Technique de DNA recombinant.	II.30
XI.1. Souche bactérienne.	II.30
XI.2. Le plasmide bactérien.	II.31
XI.3. Principe du test blanc-bleu.	II.31
XI.4. Réaction de restriction.	II.31
XI.5. Réaction de ligation.	II.32
XI.6. Réaction de transformation.	II.32
XII. Séquençage.	II.33

Chapitre III. RESULTATS ET DISCUSSION

I. Mapping du locus de la sorcine.	III.1
I.1. Mise en évidence d'un polymorphisme de restriction entre les lignées "B6" et "C" pour le locus de la sorcine.	III.1
I.2. Calcul de la distance génétique entre le locus de la sorcine et le locus <i>reeler</i> .	III.2
I.3. Discussion: organisation de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris.	
III.5.	
II. Tentative de mise en évidence d'un polymorphisme pour le locus de la sorcine par PCR et essai d'isolement du gène chez la souris.	III.7
II.1. Choix des primers.	III.7
II.2. Tentative de mise en évidence d'un polymorphisme entre les lignées "C" et "B6" par PCR.	III.8
II.3. Clonage et séquençage du fragment Sor600.	III.11
II.4. Discussion : échec de la mise en évidence d'un polymorphisme par PCR pour le locus de la sorcine, et isolement du gène de la cyclophiline.	III.15
III. Recherche de nouveaux marqueurs de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris.	III.17
III.1. Screening d'une banque de cosmides spécifique du chromosome 7 humain.	III.16

- III.2. Screening d'une librairie de Charon A21 spécifique du chromosome 7 humain. III.19
- III.3. Discussion : tentative d'isolement de nouveaux marqueurs de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris et problème des séquences répétées. III.22

Chapitre IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Chapitre V. BIBLIOGRAPHIE

LISTE DES ABBREVIATIONS

Chapitre I.

INTRODUCTION.

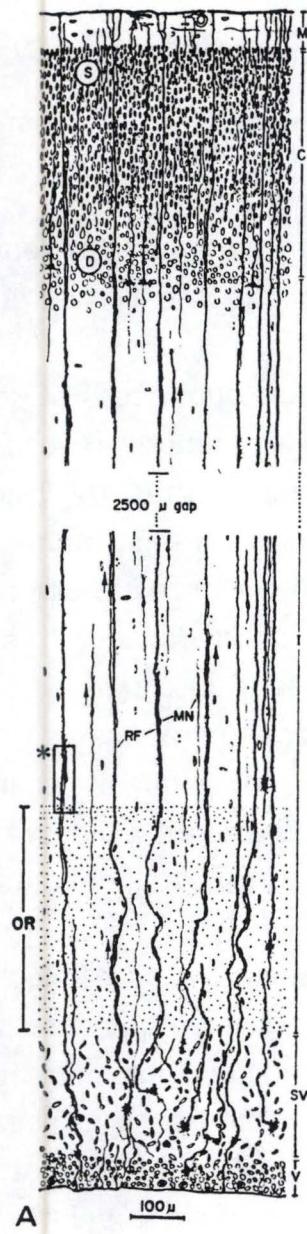
I. INTRODUCTION : LA MUTATION NEUROLOGIQUE REELER.

Ce mémoire s'inscrit dans un projet de cartographie de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris ayant pour but la localisation du gène *reeler* en préalable à son clonage positionnel.

Reeler (symbole génétique: *r*) est une mutation autosomique récessive de la souris, isolée pour la première fois par Falconer à Edinburgh en 1948 et réapparue en 1969 à Orléans. Les animaux homozygotes sont reconnus vers le 15^{ème} jour après la naissance, par la présence d'une ataxie extrême et de tremblements; ils sont nettement moins actifs que les individus normaux. Leur croissance est retardée, probablement parce qu'ils sont désavantagés pour l'obtention de nourriture et d'eau par rapport aux individus sains. Malgré les signes neurologiques, les principales caractéristiques comportementales (par ex. natation) sont normales.

Des études morphologiques ont mis en évidence, chez les animaux mutants, des altérations du système nerveux central (SNC) qui apparaissent au cours du développement, lors de la formation des premiers patterns cellulaires ("architectonique").

Rappelons que le SNC dérive de l'ectoderme embryonnaire. Par induction mésodermique, ce dernier forme la plaque neurale qui s'invagine en gouttière puis se referme sur elle même pour constituer le tube neural primitif. L'ensemble des cellules du SNC dérivent de la paroi du tube neural dont la cavité donne naissance aux cavités liquidiennes du SNC que sont les ventricules. Les neurones et les éléments gliaux proviennent de précurseurs qui prolifèrent autour des ventricules primitifs, constituant des zones à forte densité cellulaire et à haut index mitotique appelées zones ventriculaires ou germinatives. Après un certain nombre de division, les neurones perdent leur capacité mitotique - ce qui n'est pas le cas des cellules gliales. Les neurones immatures migrent depuis le lieu de leur dernière division mitotique jusqu'à une position qui correspond à leur localisation dans le cerveau mature. Cette migration, essentiellement prénatale, nécessite le détachement des cellules postmitotiques des autres éléments de la zone ventriculaire et leur déplacement à travers le tissu, vers leur position finale. Ce mouvement suit des voies précises et une séquence temporelle déterminée pour s'arrêter en des localisations extrêmement bien définies. La migration peut s'effectuer sur moins de 100 µm pour les cerveaux de petits rongeurs, jusqu'à plusieurs mm dans certaines régions du cortex humain.



A Camera lucida drawing of the occipital cerebral wall of the monkey fetus at mid-gestation. Composite illustration is derived from Golgi impregnated section (black profiles) and from adjacent section counterstained with toluidine blue (outline of cell nuclei). The middle 2000 μm of the intermediate zone, similar in structure to the sectors drawn, is omitted. The rectangle marked with an asterisk shows the approximate position of cell reconstruction in *B*. Abbreviations: C = cortical plate; I = intermediate zone; M = molecular layer; MN = migrating neuron; RF = radial fiber; SV = subventricular zone; V = ventricular zone. *B* Three-dimensional reconstruction of migrating neurons, based on serial electron micrographs made at the level of the intermediate zone indicated by the rectangle in *A*. The lower portion of the diagram contains parallel fibers of the optic radiation (OR) and the remainder is occupied by a more disposed fiber system. Except at the lower portion of the figure, most of these fibers are deleted from the diagram to expose the radial fibers (striped vertical shafts RF_{1-6}) and their relations to the migrating cells A, B, and C. The soma of migrating cell A, with its nucleus (N) and voluminous leading process (LP), is situated within the reconstructed space, except for the terminal part of the attenuated trailing process and the tip of the vertical ascending pseudopodium. Cross sections of cell A in relation to the several vertical fibers in the fascicle are drawn at levels a through d at the right side of the figure. The perikaryon of cell B is cut off at the top of the reconstructed space, whereas the leading process of cell C is shown just penetrating between fibers of the optic radiation (OR) on its way across the intermediate zone. LE indicates lamellate expansions; PS indicates pseudopodia.

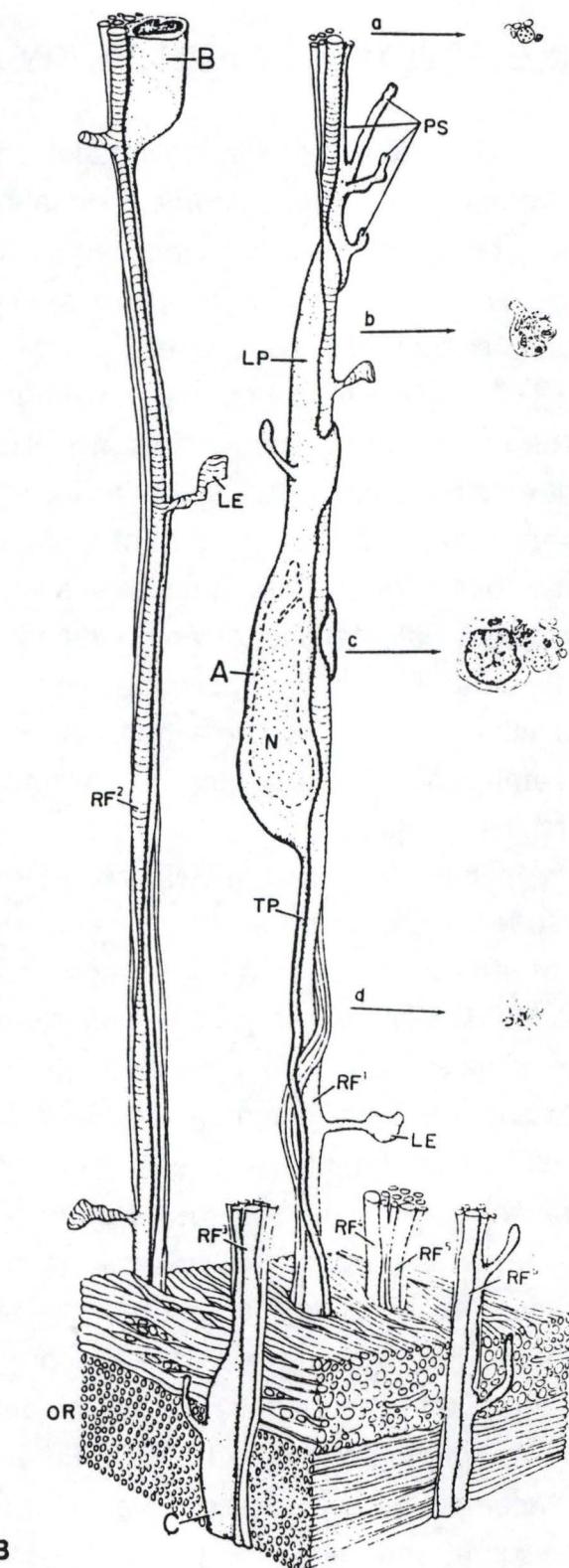


Figure I.1. Représentation schématique de la migration neuronale au cours de l'ontogenèse du système nerveux central (d'après Rakic, 1990).

On distingue deux types de migrations neuronales (revu par Rakic, 1990). Dans la migration dite radiale, les cellules postmitotiques quittent la zone ventriculaire et se dirigent à travers le parenchyme vers un point situé en face de leur point d'origine. Au cours de cette migration, les neurones sont guidés par les prolongements cytoplasmiques radiaux des éléments neuroépithéliaux et gliaux qui peuplent la zone ventriculaire (voir fig.I.1.). La migration tangentielle, plus rare, est parallèle à la surface cérébrale et perpendiculaire aux prolongements gliaux radiaux. Une fois arrivés à destination, les neurones embryonnaires s'organisent en patterns cellulaires précis, appelés "architectonique primaire", et se différencient. Les prolongements dendritiques et axoniques se déploient et les premières jonctions synaptiques se mettent en place.

La mutation *reeler* affecte certains de ces événements. Les cellules neuronales apparaissent normalement au cours de l'embryogenèse (en nombre et au moment adéquat) et leur migration initiale depuis la région ventriculaire vers leur position finale se fait de manière correcte. De même, les processus de différentiation cellulaire et l'établissement des jonctions synaptiques après la migration ne sont pas altérés. La mutation semble plutôt affecter la capacité des neurones à s'organiser en structures architectoniques normales en fin de migration, comme s'il leur manquait une capacité de "stabilisation neuronale postmigratoire". Ceci a pour conséquence que les phénomènes de maturation se produisent sur une structure architectonique mal ordonnée, ce qui conduit à un développement de plus en plus anarchique à divers niveaux du système nerveux. L'effet de la mutation est maximal au niveau du cervelet, qui est très atrophié et à l'origine des signes cliniques, très net aussi au niveau des structures corticales (hippocampe, cortex cérébral), et discret mais détectable à d'autres endroits du SNC.

Ces observations démontrent que la présence d'un allèle normal au niveau du locus *reeler* est nécessaire au positionnement correct des neurones embryonnaires en fin de migration, et donc que le développement de l'architectonique normale est sous contrôle génétique. Les facteurs responsables de l'établissement d'une configuration stable des structures neuronales sont mal connus. Bien que l'importance d'interactions du type neurone-neurone (homotypique), neurone-glie (hétérotypique) ou encore mixte soit généralement évoquée, les facteurs à la base des ces interactions ne sont pas caractérisés. Vu le phénotype unique engendré par la mutation *reeler*, il est permis de penser que l'isolement du gène *reeler*, puis la caractérisation de son produit et de son mode d'action, permettraient d'élucider une étape essentielle de l'ontogenèse du système nerveux central. Cependant, à part le fait que le locus *reeler* est situé à l'extrémité

centromérique du chromosome 5 (Falconer, 1951), les informations génétiques dont nous disposons sont très réduites, de sorte que la première étape vers l'isolement du gène *reeler* consiste en l'établissement d'une carte plus précise de l'extrémité centromérique du chromosome 5 permettant de mieux localiser le locus et de s'en approcher progressivement.

II. OBJECTIFS DU TRAVAIL.

Le nombre de marqueurs connus du chromosome 5 est assez faible. Les travaux réalisés au laboratoire visent en premier lieu à positionner ces marqueurs connus par rapport au gène *reeler*, et en second lieu à trouver de nouveaux marqueurs plus proches du locus *reeler*.

Dans ce contexte, la première partie du travail a consisté à étudier un marqueur potentiel, le gène codant pour la sorcine, et à le localiser par rapport au locus *reeler*. En parallèle, nous avons tenté d'isoler le gène de la sorcine chez la souris. La deuxième partie du travail est centrée sur la recherche de nouveaux marqueurs permettant de préciser la carte du chromosome 5. Ces marqueurs ont été recherchés dans des banques génomiques spécifiques du chromosome 7 humain, qui présente une zone d'homologie avec la partie proximale du chromosome 5 de la souris.

III. LOCALISATION DU GENE CODANT POUR LA SORCINE PAR RAPPORT AU LOCUS REELER.

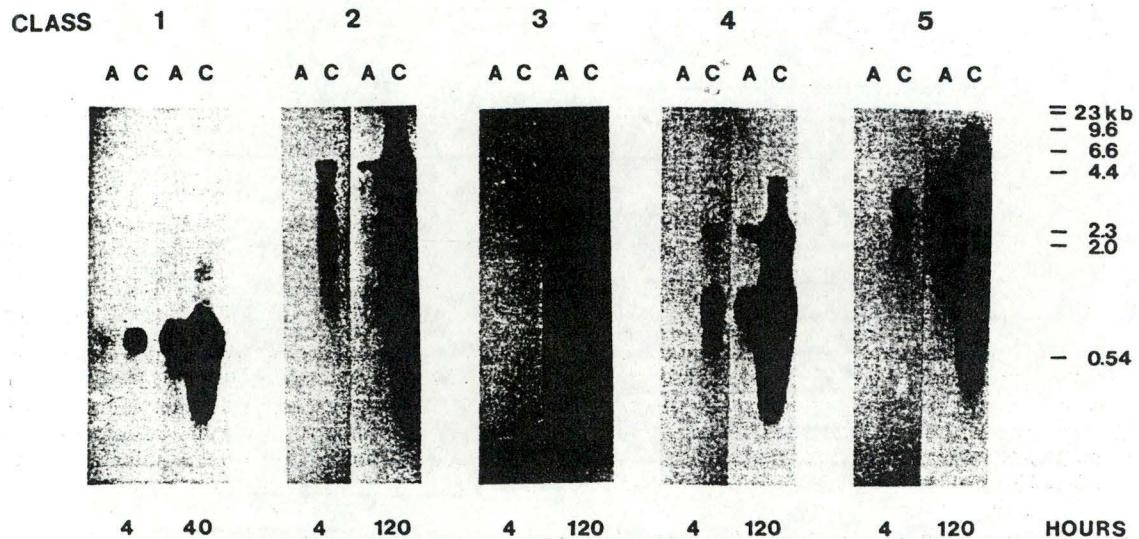
III.1. La sorcine et le phénomène "multidrug resistance".

La sorcine est une protéine cytoplasmique de 22-Kd surexprimée dans les lignées cellulaires en culture présentant une résistance multidrogue (multidrug resistant cells ou MDR cells). Bien que sélectionnées par leur résistance à une drogue particulière, les lignées cellulaires présentant le phénotype MDR, montrent une résistance croisée avec une vaste gamme d'agents cytotoxiques, souvent sans relation de structure avec la drogue utilisée pour la sélection. Les drogues pour lesquelles se manifeste le phénomène MDR (anthracycline, colchicine, adryamycine, alcaloïdes Vinca, actinomycine D, ...) incluent des agents utilisés en chimiothérapie du cancer, ce qui explique l'intérêt porté à ce phénomène (pour une revue générale : Endicott et Ling, 1989). On a montré que la résistance multidrogue s'accompagne de l'amplification (augmentation du nombre d'exemplaires) de gènes codant pour une famille de protéines membranaires de 170-Kd appelées P-glycoprotéines et que le degré d'amplification est proportionnel au degré de résistance exprimé (Riordan et al., 1985). Les P-glycoprotéines fonctionneraient comme des pompes utilisant l'ATP (ATPases) pour expulser les agents toxiques hors des cellules. Chez les eucaryotes supérieurs, les P-glycoprotéines forment une famille multigénique de protéines fortement homologues, constituée de 2 membres chez l'homme (*mdr-1* et *mdr-3*) et de 3 membres chez les rongeurs (*mdr-1*, *mdr-2* et *mdr-3* chez la souris; *pgp1*, *pgp2* et *pgp3* chez le hamster). Les gènes codant pour les P-glycoprotéines ont été localisés au niveau de la région chromosomique 1q26 chez le hamster (Jongsma et al., 1987), du chromosome 5 proximal chez la souris (Martisson et Levan, 1987) et de la zone 7q21-31 chez l'homme (Trent et Witkowski ,1987).

Le phénomène d'amplification génique ne concerne pas seulement les gènes codant pour les P-glycoprotéines, mais également d'autres séquences flanquantes, soit parce que ces séquences contiennent des loci participant au phénotype MDR, ou plus simplement parce que ces séquences sont situées à proximité du locus visé par l'amplification. L'ensemble des séquences coamplifiées forme un amplicon (appelé amplicon MDR) , c'est à dire un ensemble de loci amplifiés en un seul bloc. La caractérisation de l'amplicon MDR a été réalisée par plusieurs auteurs, en particulier par le groupe de P. Borst et A.M.Van der Bliek. Une banque de cDNA a été construite à partir de mRNA de la lignée cellulaire résistante à la colchicine CH^RC5 et screenée pour isoler les clones de cDNA correspondant à

Classe de gènes	mRNA (s) (nt)	Degré d'amplification	Nature du gène	équivalent chez	
			hamster	souris	homme
1	750	10			
2a	-	10			
2b	4500	10	P-glycoproteine (pgp3)	mdr-3	mdr-3
2c	4500	30	P-glycoproteine (pgp2)	mdr-1	
3	3200	30	P-glycoproteine (pgp1)	mdr-2	mdr-1
4	1000/2600	30			
5	3600	30			
6	2600	30	sorcine	sorcine	sorcine

Tableau III.1. Classes de gènes amplifiés surexprimés dans les lignées CHO-CH^RC5.
Gènes équivalents chez la souris et chez l'homme.



Overexpression of five different groups of mRNAs identified by the differential screening of a cDNA library made from the CH^RC5 cell line. Size-fractionated poly(A)⁺ RNA from the parental cell line AUXB1 (A) and from the resistant cell line CH^RC5 (C) was hybridized to representative cDNAs. Autoradiograms of the filters are shown with two exposures chosen such that the signal from the AUXB1 RNA on the long exposures (40 or 120 h) is comparable to that from the CH^RC5 RNA on the short exposures (4 h). The samples were alternated with the size marker, denatured *Hind*III-digested phage lambda DNA, which was detected with nick-translated phage lambda DNA.

Figure III.1. Identification de 5 classes de gènes d'après la longueur des transcripts reconnus en Northern blot.

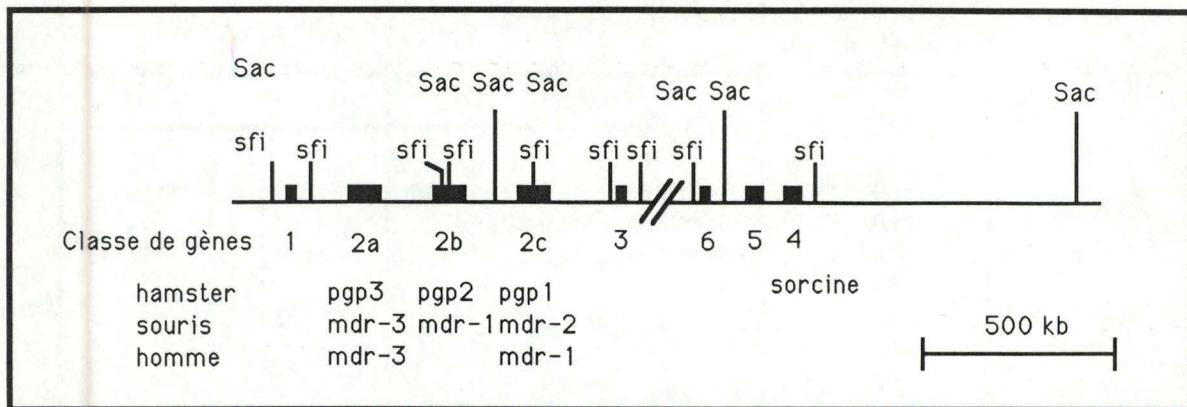


Figure III.2. Carte physique du domaine MDR chez le hamster chinois et loci correspondants connus chez la souris et chez l'homme. Des fragments de restriction de taille importante ont été produits par digestion de DNA de hamster CHRC5 avec les enzymes de restriction *Sfi*I ou *Sac*II (enzymes coupant très rarement). Ces fragments ont été séparés par électrophorèse en gel pulsé et transféré sur membranes de nitrocellulose. Les membranes ont ensuite été hybridées avec des cDNA représentatifs de chaque classe de gènes afin de déterminer l'organisation de l'amplicon MDR.

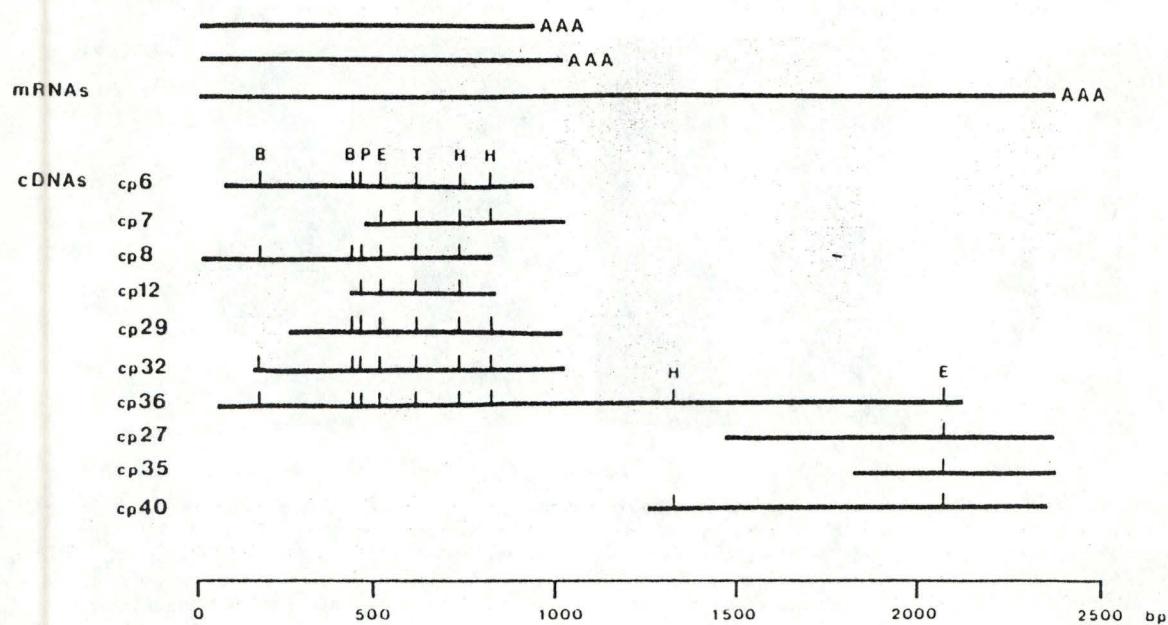


Figure III.3. Situation des clones de cDNA correspondant au gène de classe 4 par rapport aux transcripts de 100 et 2500 nucléotides. B, P, E, T et H représentent respectivement la position des sites de restriction *Bam*H I, *Pst*I, *Eco*R I, *Tag*I et *Hind*III.

des mRNAs surexprimés (Van der Bliek et al; 1986 a). 18 clones de cDNA ainsi sélectionnés ont ensuite été testés par Northern blot pour retrouver les transcripts correspondants. En fonction des résultats des Northern blots, les clones peuvent être classés en cinq classes, correspondant à 5 gènes différents, selon la taille des transcripts reconnus (une sixième classe a été isolée par la suite (Jongsman et al., 1990) (voir tableau III.1. et figure III.1.). Le groupement de ces cinq gènes en un seul amplicon a été démontré par des expériences d'électrophorèse en champ pulsé. L'hybridation des sondes de cDNA sur du DNA génomique de cellules résistantes séparé sur ce type de gel montre que, chez le hamster, les cinq gènes s'étendent sur une distance d'au moins 1100Kb (Van der Bliek et al., 1986 a). L'organisation de l'amplicon MDR a été plus ou moins déterminée (voir figure III.2.). Cependant, la distance précise entre chaque locus, ainsi que leur position exacte, ne sont pas connues avec certitude.

Seuls les produits des gènes de classe 2 et 4 ont pu être isolés. La classe 2 correspond en fait à 3 gènes (classe 2a, 2b, 2c), codant pour la famille multigénique des P-glycoprotéines (Van der Bliek et al., 1986 a). Le second produit isolé est celui du gène de classe 4. Il s'agit du gène codant pour la **sorcine**, également appelée V19 ou CP₂₂ (Van der Bliek et al., 1986 b).

Les clones de cDNA correspondant au gène de classe 4 reconnaissent des mRNAs de 1000 et 2500 nucléotides. Parmi les 11 clones de cDNA correspondant à des gènes de classe 4, 10 reconnaissent les 2 transcripts (clones cp6, cp7, cp8, cp12, cp29, cp32, cp36, cp35, cp40), et un clone de cDNA reconnaît uniquement le plus grand transcript (cp27) (voir fig.III.3.).

Les séquences de ces cDNA ont été déterminées et ont permis de montrer que les transcripts de 1000 et 2500 nucléotides correspondent à un seul gène, et sont caractérisés par une multiplicité des sites de polyadénylation. A partir de la séquence des clones de cDNA, l'établissement de la séquence en acides aminés a permis de montrer que les mRNAs de classe 4 codent pour une protéine de 198 acides aminés, correspondant à la sorcine. La sorcine est une protéine cytoplasmique de 22-Kd possédant une séquence similaire à la calpaine, (une protéase calcium-dépendante), et plus particulièrement à la chaîne légère de cette protéine. La sorcine possède 4 sites de fixation pour le calcium, ceci étant peut-être à mettre en relation avec la capacité d'agents bloquant les canaux calciques de s'opposer au phénomène MDR. Cette hypothèse n'est cependant pas prouvée, la surexpression de la sorcine dans les lignée cellulaires MDR pouvant simplement résulter d'une amplification fortuite suite à la position du gène à proximité des loci *mdr*.

Chromosome 5

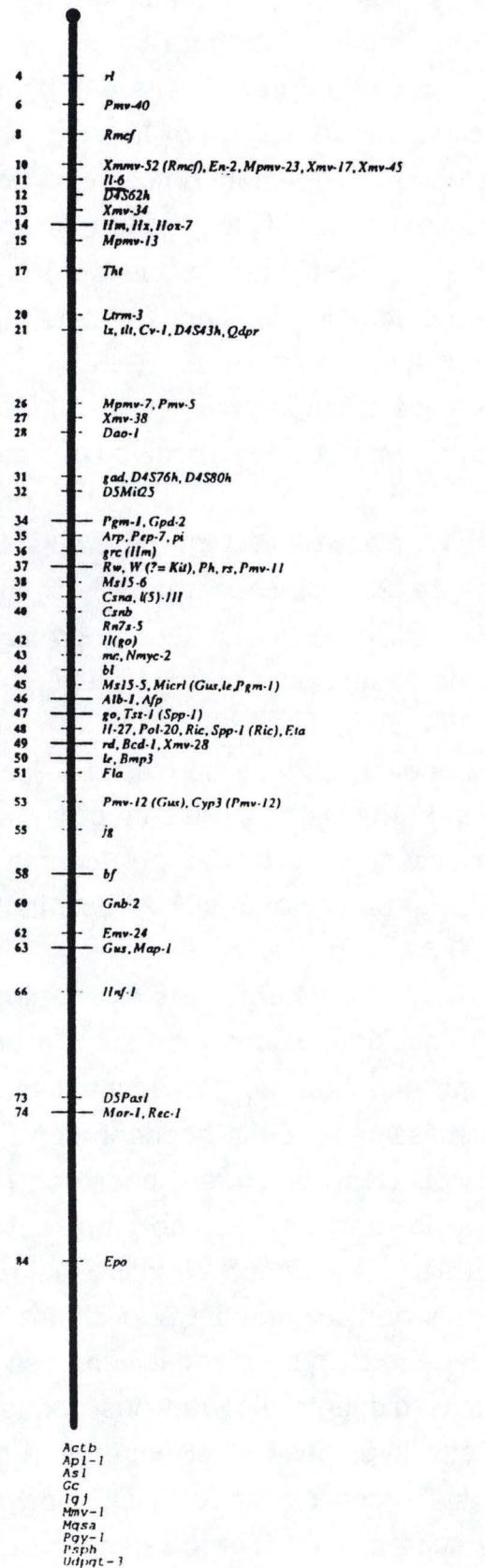


Figure III.4. Carte du chromosome 5 de la souris (d'après Mouse Genome, mars1991).

Des comparaisons de séquences, ainsi que des techniques d'hybridation, ont montré une bonne conservation de la protéine entre espèces.

III.2. Intérêt du choix de la sorcine.

La carte chromosomique actuelle de la souris (fig.III.4.) montre que nous disposons d'un nombre très limité de marqueurs de l'extrémité centromérique du chromosome 5. Nos recherches se sont orientées vers le locus sorcine sur base des travaux antérieurs du laboratoire (Goffinet et Dernoncourt, 1991) qui ont permis de situer le gène *reeler* par rapport à 3 marqueurs connus de l'extrémité centromérique du chromosome 5 , à savoir le point de translocation *T(5;12)31H*, le locus multidrug resistance-1(*mdr-1*), et le locus engrailed-2 (*En-2*), et que nous résumerons brièvement.

III.2.1. Position du locus *reeler* par rapport au point de translocation *T31H*.

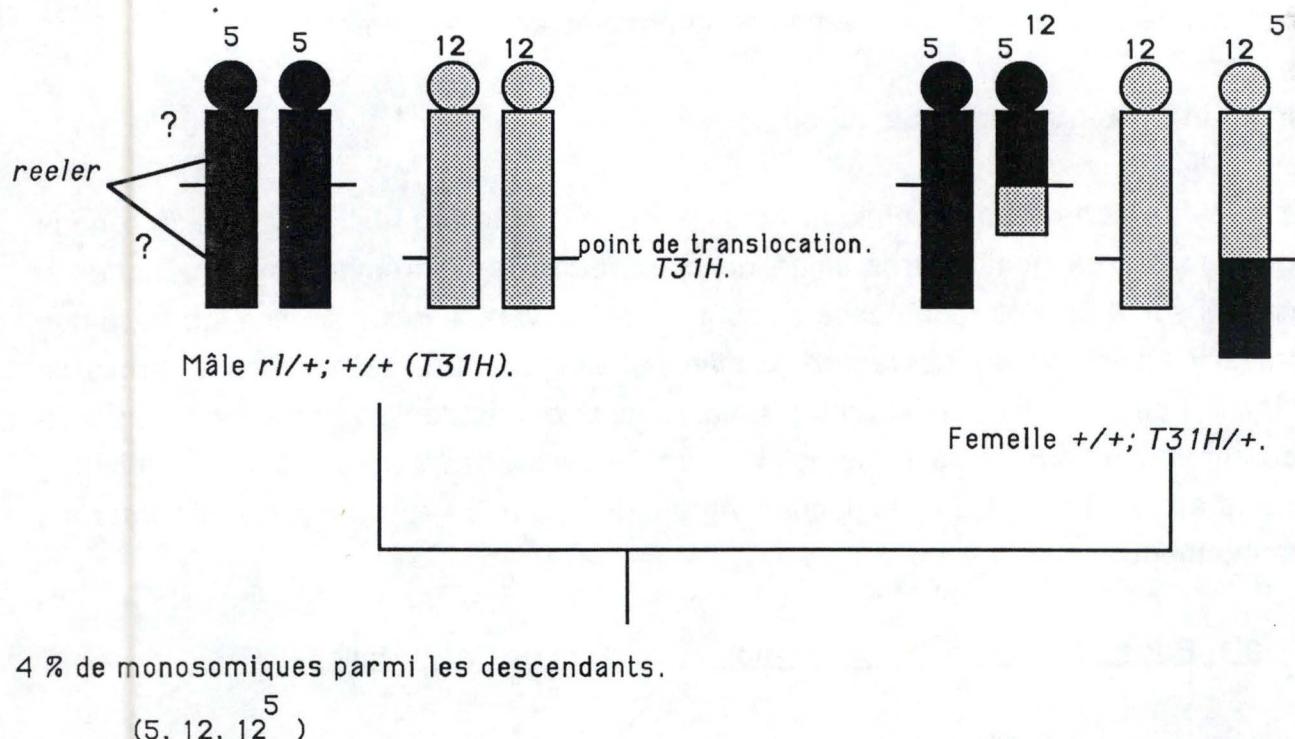
A. La translocation *T31H*.

La translocation *T31H* est une translocation réciproque affectant les chromosomes 5 et 12, et conduisant à la formation d'un petit chromosome 5^{12} et d'un long chromosome 12^5 . Le chromosome transloqué 5^{12} correspond à l'extrémité centromérique du chromosome 5 plus une petite partie distale (par rapport au centromère) du chromosome 12. Le chromosome transloqué 12^5 comprend la plus grande partie (proximale) du chromosome 12, plus une grande partie (distale par rapport au centromère) du chromosome 5. La souche de souris *T31H* est maintenue en croisant des femelles porteuses hétérozygotes pour la translocation (déterminée par caryotype) avec des mâles normaux, les mâles porteurs étant en général stériles. Les individus homozygotes sont létaux. Des individus monosomiques (4%) de caryotype 5, 12, 12^5 et trisomiques (10%) de caryotype 5,5,12,12, 5^{12} peuvent être obtenus, les mâles étant stériles et les femelles fécondes.

B. Localisation de *reeler* par rapport au point de translocation.

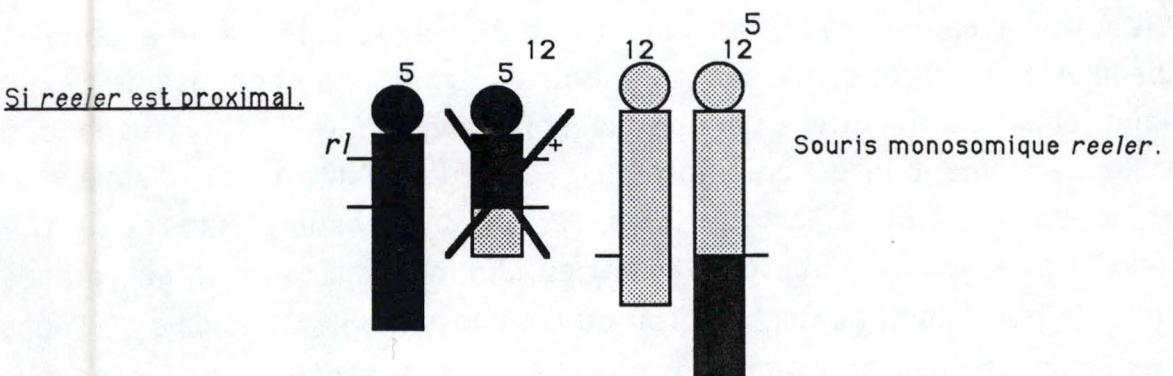
Pour déterminer si le locus *reeler* est distal ou proximal par rapport au point de translocation, des mâles hétérozygotes pour le gène *reeler* (*rl/+*) ont été croisés avec des femelles porteuses de la translocation (*T31/+*) et homozygotes *+/+* pour le caractère *reeler* (voir fig.III.5.). Parmi la descendance, on s'attend à trouver $\approx 4\%$

Position du locus *reeler* par rapport au point de translocation *T31H*.



4 % de monosomiques parmi les descendants.

5
(5, 12, 12)



Si *reeler* est distal.

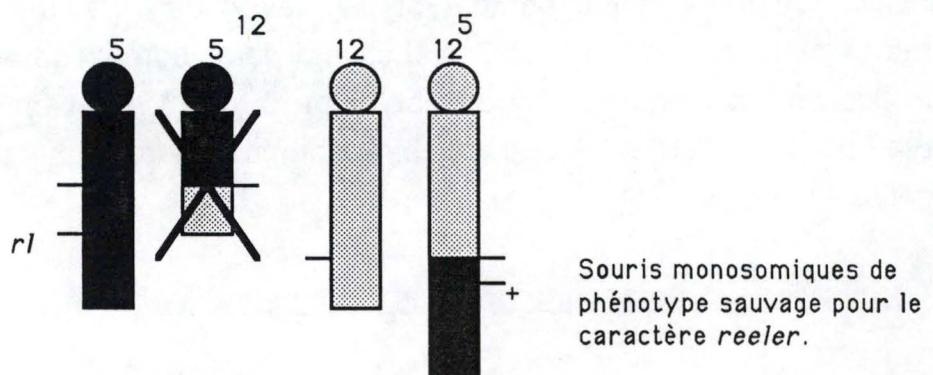


Figure III.5. Mise en évidence de la position du locus *reeler* par rapport au point de translocation *T(5;12)31H*.

d'individus monosomiques tertiaires, de caryotype 5, 12, 12⁵. Ces individus ont perdu le chromosome transloqué 5¹² et ne possèdent que la partie distale du chromosome 5 provenant de la mère (+/+ pour le caractère *reeler*). Si le gène *reeler* est proximal par rapport au point de translocation, on s'attend à ce que les individus monosomiques issus de ce croisement (détectés par analyse du caryotype) présentent le phénotype *reeler* (déterminé par dissection du cerveau). En effet, le caractère *reeler* est récessif, et ne peut donc s'exprimer que si l'allèle sauvage est absent, ce qui est le cas si cet allèle se trouve sur la partie proximale du chromosome 5. En revanche, si le locus *reeler* est distal par rapport au point de translocation, un allèle sauvage est fourni par la partie distale du chromosome 5 situé sur le chromosome transloqué 12⁵ et les individus monosomiques issus du croisement devraient avoir un cerveau normal. Des individus monosomiques *reelers* ont bien été obtenus, ce qui prouve que le locus *reeler* est proximal par rapport au point de translocation et se trouve donc près de l'extrémité centromérique du chromosome 5.

III.2.2. Localisation des loci *mdr-1* et *En-2* par rapport au point de translocation T31H.

A. Le locus *mdr-1* et sonde pCHP1.

Le locus *mdr-1* de la souris a déjà été présenté dans le paragraphe traitant de la sorcine. Pour rappel, il s'agit d'un gène codant pour un des membres de la famille multigénique des P-glycoprotéines. Ce gène fait partie de l'amplicon MDR, situé sur l'extrémité centromérique du chromosome 5 chez la souris.

Le locus *mdr-1* peut être reconnu par la sonde pCHP1. Il s'agit d'une sonde de ≈600 bp , spécifique des P-glycoprotéines. Elle correspond à un clone de cDNA isolé d'une banque construite à partir de mRNAs de la lignée cellulaire hautement résistante de hamster CHR30 (Riordan et al., 1985).

B. Le locus *En-2* et la sonde mp2.

Il existe chez la souris 2 gènes, *En-1* et *En-2* , qui possèdent des séquences homologues à celles du gène *engrailed* chez la Drosophile. La région d'homologie correspond à une séquence de 107 acides aminés, comprenant une région centrale de 60 acides aminés connue sous le terme d'homéo box. Ces homéo box se retrouvent chez la Drosophile dans de nombreux gènes participant à l'embryogenèse, et plus spécialement à la segmentation et à la spécialisation de

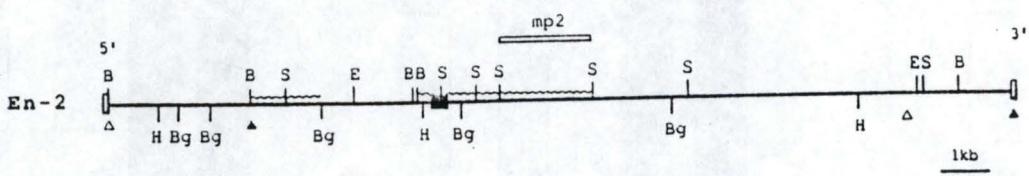
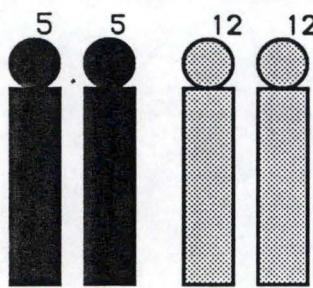
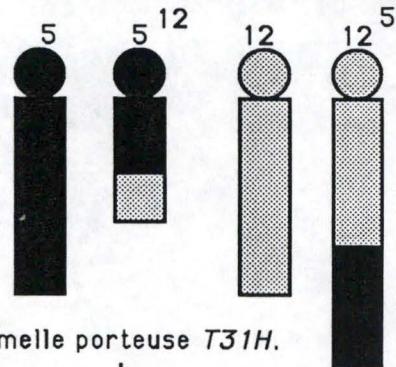


Figure III.6. Position de la sonde *mp2* par rapport au locus *En-2*. B, H, Bg, E et S représentent respectivement la position des sites de restriction *BamHI*, *HindIII*, *BglI*, *SstI* et *EcoRI*.

Localisation de *mdr-1* et de *En-2* par rapport au point de translocation.



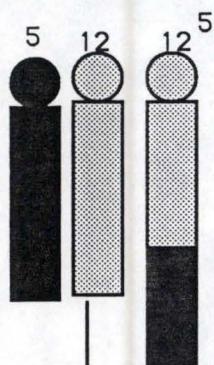
Mâle normal pour la translocation.



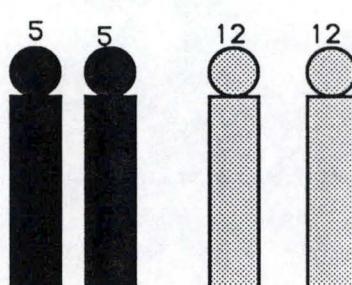
Femelle porteuse *T31H*.

Parmi les descendants, présence d'individus :

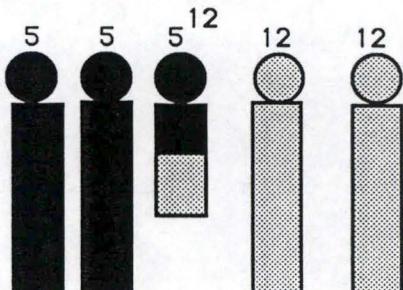
1. Monosomiques.



2. Normaux.



3. Trisomiques.



Partie proximale du chromosome 5.

1 DOSE

2 DOSES

3 DOSES

Partie distale du chromosome 5.

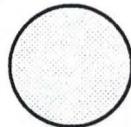
2 DOSES

2 DOSES

2 DOSES

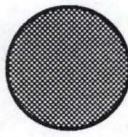
Extraction du DNA, transfert sur membrane et hybridation avec les sondes pCHP1 ou mp2.

pCHP1.



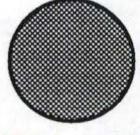
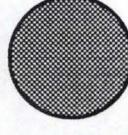
mdr-1 proximal

mp2.



En-2 distal

β -actine.



Contrôle.

Figure III.7. Localisation des loci *mdr-1* et *En-2* par rapport au point de translocation *T(5;12)31H* par effet de dose.

chaque segment. Le rôle de *En-1* et *En-2* dans l'embryogenèse de la souris n'est pas encore établi avec certitude, bien que ces gènes soient également exprimés au cours de l'embryogenèse (Joyner et Martin, 1987). Le gène *En-2* a été localisé au niveau de l'extrémité centromérique du chromosome 5, à proximité de gènes intervenant dans le développement. La sonde mp2 utilisée pour localiser *En-2* correspond à un sous-fragment de 2 Kb d'un clone de DNA génomique correspondant à ce locus (fig.III.6.).

C. Localisation de *En-2* et *mdr-1* par rapport au point de translocation.

Pour situer les loci *mdr-1* et *En-2* par rapport au point de translocation *T31*, une quantité identique de DNA de souris monosomique tertiaire (caryotype: 5,12,12⁵), trisomique tertiaire (caryotype: 5,5,12,12,5¹²), et normale (caryotype: 5,5,12,12) contenant donc respectivement 1, 3 et 2 doses de la partie proximale du chromosome 5, et 2 doses de la partie distale, a été transférée sur membrane de nylon par technique de dot blot. Le DNA est hybridé soit avec la sonde mp2, ou avec la sonde pCHP1 marquée. Si le locus reconnu par la sonde se trouve dans la région proximale du chromosome 5 par rapport au point de translocation, un effet de dose doit être visible. Cet effet se manifeste par une intensité de 1, 2 ou 3 du signal d'hybridation. Si le locus reconnu par la sonde se trouve sur la partie distale du chromosome 5, aucun effet de dose ne se manifeste, puisque cette partie du chromosome est présente en 2 exemplaires (2 doses) quelque soit le type de souris. Les résultats représentés sur la figure III.7. mettent en évidence un effet de dose pour le locus *mdr-1*, cet effet ne se manifestant pas pour le locus *En-2*. Cette expérience permet de conclure que le locus *mdr-1* est proximal, et le locus *En-2* distal par rapport au point de translocation *T31H*.

III.2.3. Analyse de lignées congéniques.

A. Présentation des souches de souris utilisées.

Les formes Edinburgh et Orléans de la mutation *reeler* sont disponibles respectivement sur fond génétique C57B1/6J (noté B6-*r1Ed* ou "B6"; souris noires) et sur fond génétique BALB/c (noté C-*r1Orl* ou "C"; souris blanches). Ces deux lignées sont pures (inbred), obtenues par croisement frères-soeurs pendant au moins 20 générations. Ceci a pour but de réduire à ≈ zéro la variabilité génétique entre individus d'une même lignée. Les souris *reeler* Orléans sur fond génétique "C" sont moins affectées d'un point de vue neurologique et survivent mieux que les mutants

reeler Edinburgh sur fond "B6" (le taux de survie des individus homozygotes sur fond BALB/c est d'environ 80%, pour un taux de survie de 20% pour l'autre fond génétique). Quelques différences morphologiques au niveau de l'organisation du système nerveux central ont été observées entre les 2 souches *reeler*. Ces différences ne correspondent cependant pas à 2 formes alléliques du locus *reeler*, mais reflètent simplement des fonds génétiques différents. On peut en effet montrer que les différences entre les souris *reeler*s B6-*r1Ed* et C-*r1Orl* disparaissent quand les 2 allèles sont transférés sur un fond génétique identique (ce qui est réalisé lors de la création de lignées congéniques).

B. Création de lignées congéniques (Flaherty, 1981).

Des lignées congéniques sont produites en remplaçant dans une lignée inbred, un locus particulier (entouré d'un petit fragment chromosomique) par le locus correspondant d'une autre lignée. Donc, une lignée congénique est tout à fait identique à la lignée de départ, si ce n'est pour un petit fragment chromosomique provenant d'une autre lignée. Les souches congéniques sont produites par backcross successifs. Pour cela, des croisements sont réalisés entre 2 lignées, une lignée inbred A, qui fournit le background génétique (= partenaire inbred = premier parent) et une seconde lignée B qui fournit le fragment chromosomique à remplacer (= lignée donneuse = second parent). Lors de chaque backcross, on sélectionne les individus ayant acquis le locus d'intérêt, provenant de la lignée donneuse B. Ce locus est appelé locus différentiel. Les descendants sélectionnés sont ainsi croisés avec la lignée inbred A, et ainsi de suite jusqu'à obtention de la lignée congénique. Au fur et à mesure des backcross, suite au mécanisme de crossing-over, le seul matériel chromosomique provenant de la lignée donneuse et conservé dans la lignée inbred se réduit à la zone de chromosome qui inclut le locus différentiel. Une souche peut être considérée comme congénique si au moins dix générations de backcross ont été produites, la première génération étant celle de la F1. La longueur moyenne du fragment chromosomique contenant le locus différentiel et provenant de la souche donneuse, est estimée comme suit :

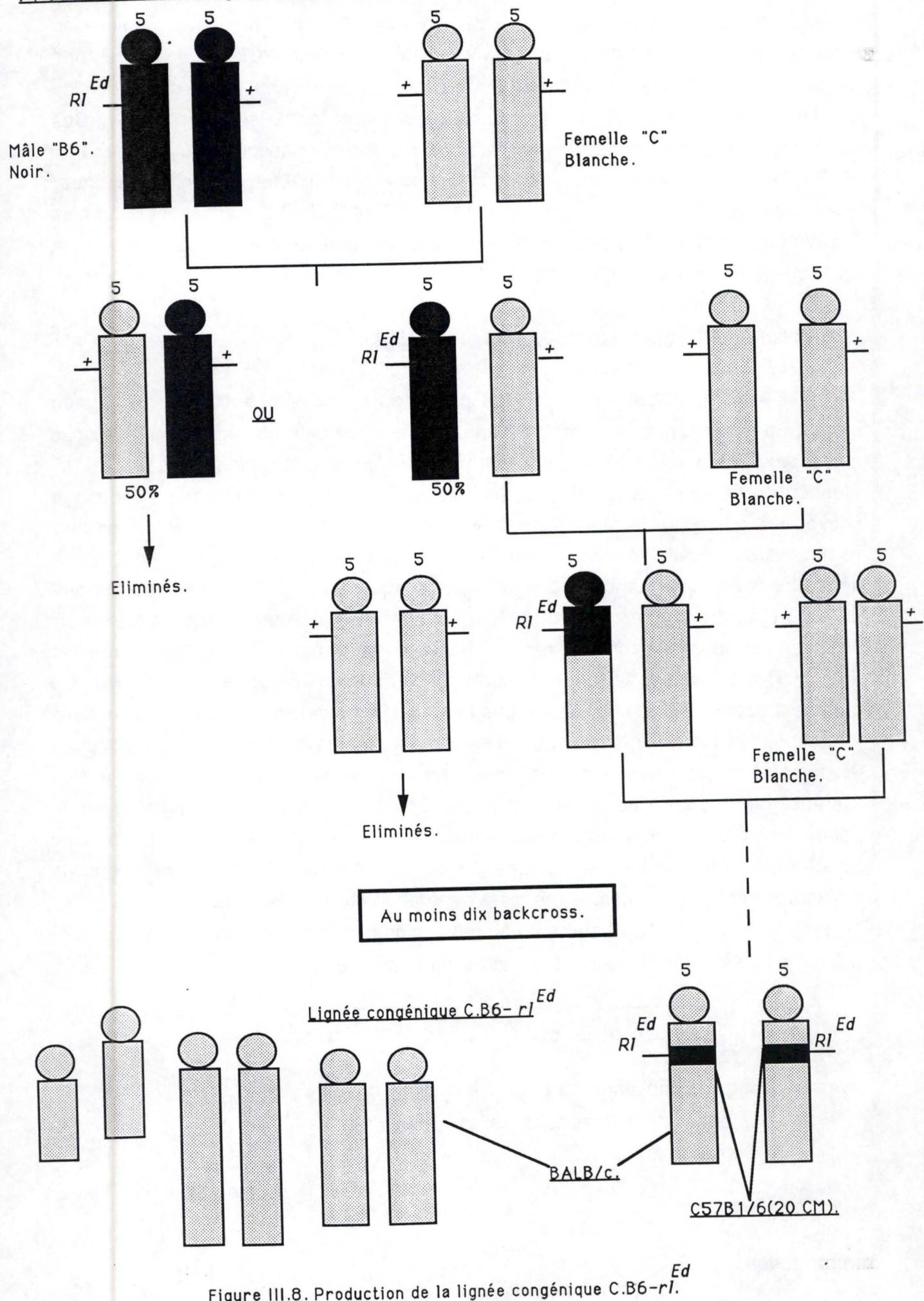
$$L_n = 200 * (1 - 2^{-n}) / n \text{ cM.}$$

avec L_n : longueur moyenne du fragment chromosomique.

n : nombre de backcross successifs réalisés.

cM : CentiMorgan.

Production d'une lignée congénique C.B6-rl.



En général, on réalise 10 à 15 générations de backcross. Le fragment de chromosome entourant le locus différentiel s'étend ainsi sur une longueur de 12 à 20 cM.

Au laboratoire, 2 lignées congéniques ont été élevées : la lignée C.B6-*r1Ed* et la lignée B6.C-*r1Orl*. La lignée congénique C.B6-*r1Ed* est constituée de souris dont tout le génome est identique à celui de souris "C" (blanches), sauf le gène *reeler* plus une petite région flanquante qui provient de la souche "B6" (noire). La lignée congénique B6.C-*r1Orl* est constituée de souris dont tout le génome est identique à celui des souris "B6" (noires) , sauf le gène *reeler* plus une petite région flanquante qui provient de la souche "C" (blanche).

A titre d'exemple, voici comment la lignée congénique C.B6-*r1Ed* a été construite (voir fig.III.8.). On croise une souris mâle "B6" (noire) hétérozygote pour le caractère *reeler* (*r1Ed/+*) avec une souris "C" (blanche) normale pour le caractère *reeler* (*/+/*). (Les individus homozygotes *r1/r1* ne survivent pas bien sur le fond "B6"). Les individus descendants (F1) ont soit le génotype *r1Ed/+* soit le génotype */+/*. La mutation *reeler* étant récessive, les individus hétérozygotes ne sont pas identifiables tels quels. Pour repérer les individus hétérozygotes, on croise alors chaque descendant mâle avec ses soeurs. Si un descendant *reeler* est obtenu, c'est que le père et la mère étaient tous deux porteurs hétérozygotes. Les individus mâles sélectionnés de cette façon sont ensuite croisés avec une souris "C" de type sauvage pour le caractère *reeler*. Les mâles hétérozygotes sont à nouveau sélectionnés et backcrossés à une femelle "C" (*/+/*). Après 10 à 12 backcross, les descendants de la dernière génération sont croisés entre eux, et les individus homozygotes pour le caractère *reeler* sont conservés. Ces individus constituent la lignée congénique, qui est entretenue par croisement frères-soeurs.

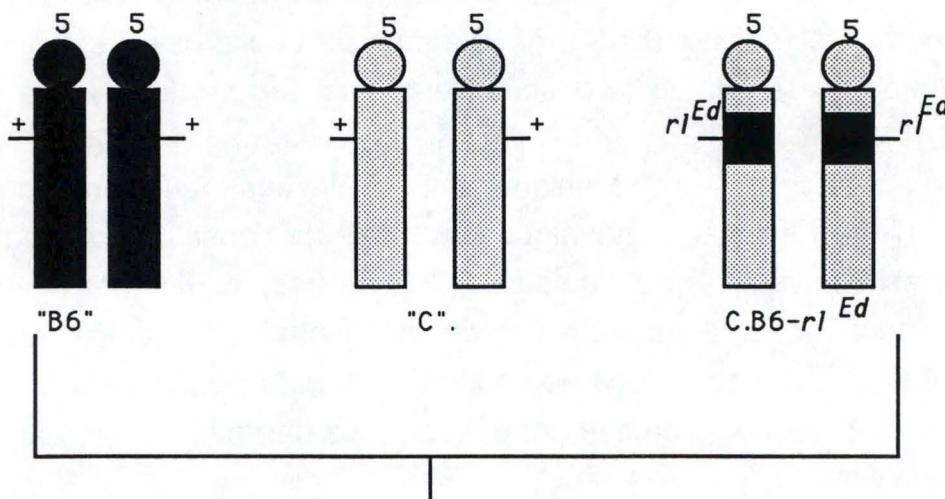
C. Le polymorphisme de restriction.

Un profil de restriction est obtenu après digestion d'ADN, (par exemple génomique), par un enzyme de restriction particulier. Les fragments obtenus sont ensuite séparés par électrophorèse et hybridés à une sonde radioactive spécifique d'un locus donné. La longueur des fragments reconnus par la sonde est mise en évidence après autoradiographie.

Le pattern obtenu , c'est à dire la longeur et le nombre des fragments reconnus, est typique d'une lignée de souris, si tous les membres de la lignée sont identiques génétiquement, ce qui est le cas des lignées inbred.

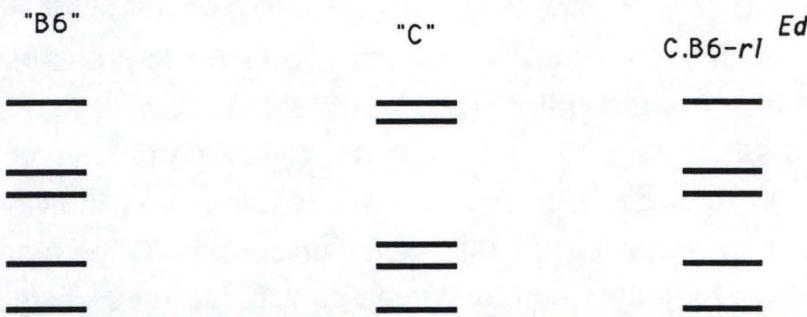
Les variations de séquences au sein d'un génome sont fréquentes. Ces variations correspondent par exemple au changement d'une paire de base, créant

Analyse de lignées congéniques.

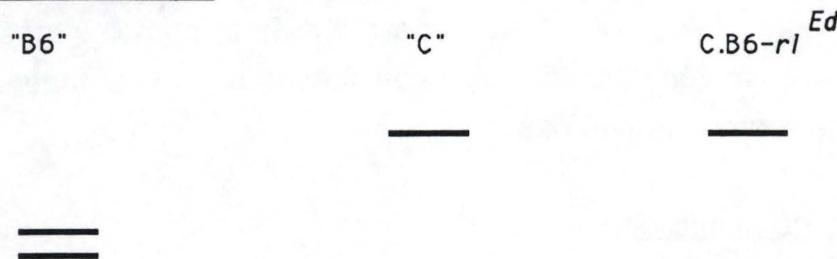


Digestion par *Msp* 1, séparation des fragments de restriction par électrophorèse et transfert sur membrane de nylon. Hybridation soit avec la sonde mp2, soit avec la sonde pCHP1.

Locus *mdr-1*: sonde pCHP1.



Locus *En-2*: sonde mp2.



1. Si la sonde se trouve près de *reeler*, elle va nous donner, après hybridation, pour la souche congénique, un polymorphisme similaire à celui de "B6".
Ceci est observé pour la sonde pCHP1; locus *mdr-1*.

2. Si la sonde est éloignée, on aura pour la souche congénique, un polymorphisme semblable à "C".
Ceci est observé pour la sonde mp2; locus *En-2*.

En conclusion :

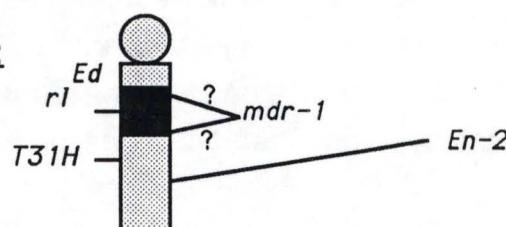


Figure III.9. Analyse de lignées congéniques: localisation des locus *mdr-1* et *En-2* par rapport à *reeler*

ou détruisant un site de restriction pour un enzyme particulier, et entraînant donc des changements dans la longueur des fragments de restriction. Le pattern de restriction donné par une autre lignée de souris pourra donc être différent après digestion par le même enzyme et hybridation par la même sonde, donnant ce qu'on appelle un polymorphisme de restriction (RFLP : restriction fragment length polymorphism). Le schéma de restriction obtenu peut servir d'empreinte, pour retrouver la lignée dont est originaire le (ou les) fragment(s) de DNA reconnu(s) par la sonde utilisée.

Le polymorphisme de restriction a permis de confirmer le caractère congénique des souches C.B6-*r1Ed* et B6.C-*r1Orl*. Ce polymorphisme, utilisé en association avec les lignées congéniques, est également d'une grande utilité pour la localisation grossière d'un nouveau locus par rapport à *reeler*.

D. Analyse des lignées congéniques.

Après digestion par l'enzyme *Msp1*, les lignées "B6" et "C" présentent un polymorphisme de restriction pour les sondes mp2 et pCHP1 (voir fig.III.9.). La sonde mp2 (locus *En-2*) reconnaît 2 fragments de 1.3 et 1.5 Kb pour la lignée "B6", et un seul fragment de 2.8 Kb pour la lignée "C". La sonde pCHP1 (locus *mdr-1*) reconnaît 5 fragments pour la lignée "B6" et 5 fragments pour la lignée "C", dont 3 sont identiques à ceux de la lignée "C".

Pour rappel, la lignée congénique C.B6-*r1Ed* est identique à la lignée "C", sauf pour un petit fragment du chromosome 5 entourant le locus *reeler* qui provient de la lignée "B6". Ces caractéristiques nous fournissent un outil important pour déterminer si une sonde reconnaît un locus situé près de *reeler*, c'est à dire dans une région de 12-20 cM entourant *reeler*, ou si le locus reconnu par la sonde est beaucoup plus éloigné de *reeler*.

Il faut appliquer le raisonnement suivant :

1. Si la sonde utilisée reconnaît un locus situé près de *reeler*, elle présente pour la lignée congénique C.B6-*r1Ed*, un profil de restriction similaire à celui de la souche "B6".
2. Si la sonde utilisée reconnaît un locus assez éloigné de *reeler*, c'est à dire en dehors du fragment de 20 cM, on observe pour la lignée congénique un profil de restriction identique à celui de la lignée "C".

En observant les résultats présenté fig.III.9., on voit que la sonde pCHP1, correspondant au locus *mdr-1*, présente un profil de restriction pour la lignée congénique similaire à celui de la ligné "B6". Le locus *mdr-1* se situe donc dans une région assez proche de *reeler*, région de plus ou moins 20 cM autour du locus.

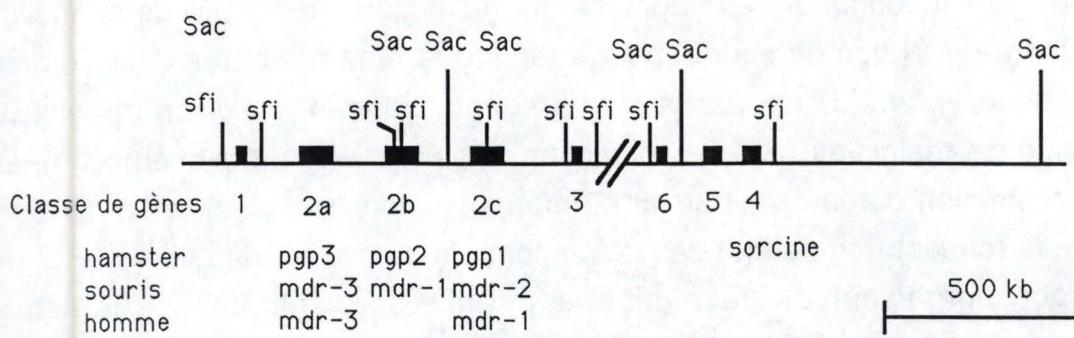


Figure III.10. Organisation de l'amplicon MDR chez le hamster, la souris et l'homme.

Par contre, la sonde mp2, correspondant au locus *En-2*, présente pour la lignée congénique, un profil de restriction identique à celui de la lignée "C". Le locus *En-2* est donc plus éloigné par rapport à *reeler* (il ne se trouve pas dans la région de plus ou moins 20 cM entourant le locus).

Il faut signaler que ces résultats ne permettent pas de savoir si *mdr-1* est distal ou proximal par rapport à *reeler*.

III.2.4. Conclusions de ces expériences et critères influençant le choix de la sorcine.

Le locus *reeler* a déjà été positionné au niveau de l'extrémité centromérique du chromosome 5. Les résultats exposés ci-dessus nous apportent quelques informations complémentaires. Ainsi, l'ordre des gènes marqueurs de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris déterminé à partir de ces expériences est le suivant :

centromère - <i>reeler</i> / <i>mdr-1</i> - <i>T31H</i> - <i>En-2</i>.

(L'ordre des 2 gènes *reeler* et *mdr-1* est inconnu à ce stade).

Nous savons donc que *reeler* et *mdr-1* se trouvent tous deux du côté proximal de la translocation *T31H* par rapport au centromère, et que ces deux loci se trouvent dans un fragment de maximum 12 à 20 cM (se référer aux expériences sur les lignées congéniques). Par ailleurs, nous savons que, chez le hamster, la sorcine fait partie de l'amplicon MDR, qui contient le locus *mdr-1*. Les dernières données indiquent que cet amplicon correspond à un fragment d'au moins 1100 Kb. Cependant, l'organisation de cet amplicon, son orientation par rapport à *reeler*, ainsi que les distances séparant chaque gène et notamment la distance entre *mdr-1* et le locus de la sorcine, ne sont pas connues (voir fig.III.10.).

Ces données nous ont amenés à examiner les questions suivantes:

- 1) le gène de la sorcine est-il lié aux loci *mdr* chez la souris comme chez le hamster?
- 2) à quelle distance se trouve-t-il du locus *reeler* ?

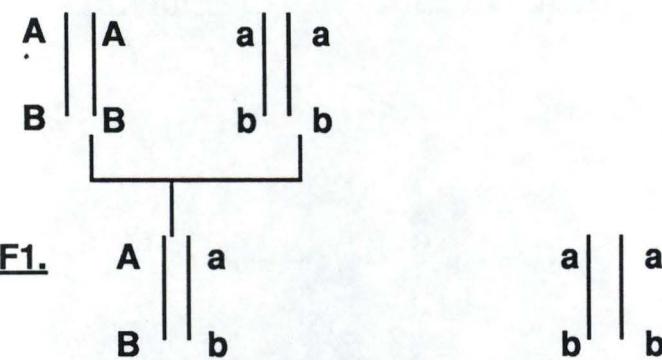
III.3. Estimation de la distance génétique entre le locus *reeler* et les loci voisins.

III.3.1. Rappel théorique : calcul de distance génétique.

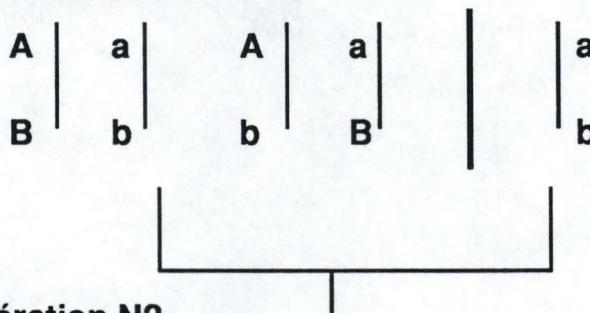
La distance relative séparant un locus particulier d'un autre locus situé sur le même chromosome peut être déterminée par calcul du pourcentage de recombinaison entre ces 2 loci, en réalisant les croisements appropriés. Ce pourcentage de recombinaison est une estimation du nombre de crossing over entre les loci. Plus la distance entre 2 loci est élevée, plus la probabilité de réalisation d'un crossing-over entre eux est importante et plus le nombre d'individus recombinants observés est élevé. Par contre, si 2 gènes sont très proches l'un de l'autre, la probabilité de production d'un crossing over entre eux est plus faible. Ces 2 loci sont hérités en bloc, sans production d'individus recombinants. L'unité génétique, définie comme correspondant à 1% de crossing over est le centiMorgan, noté cM. Pour des distances courtes (inférieures à 20 cM), le pourcentage de crossing-over est le même que le pourcentage d'individus recombinants observés. Pour des distances plus importantes, le pourcentage de crossing-over peut être plus important que le nombre de recombinants observés, suite à l'existence de doubles crossing-over. Dans le cas qui nous intéresse, on peut considérer qu'un pour cent de recombinaison correspond à une distance de un centiMorgan.

III.3.2. Technique permettant le calcul des distances génétiques.

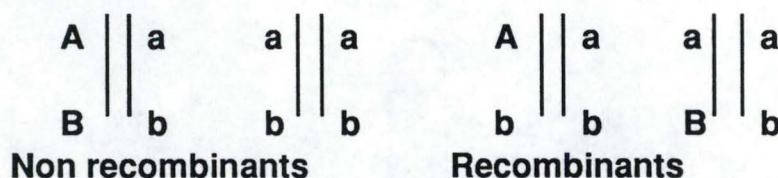
Nous avons eu recours à la technique des doubles backcross, dont le principe est le suivant. Des individus homozygotes AB/AB (A et B étant deux caractères liés), sont croisés avec des individus homozygotes ab/ab. Les descendants F1 ont tous le génotype AB/ab. Les individus F1 sont alors "rétrrocroisés" ("backcrossed") avec le parent récessif ab/ab, donnant les individus de génération dite N2.



Gamètes possibles :



Génération N2.



Les différents génotypes possibles sont représentés dans le tableau suivant:

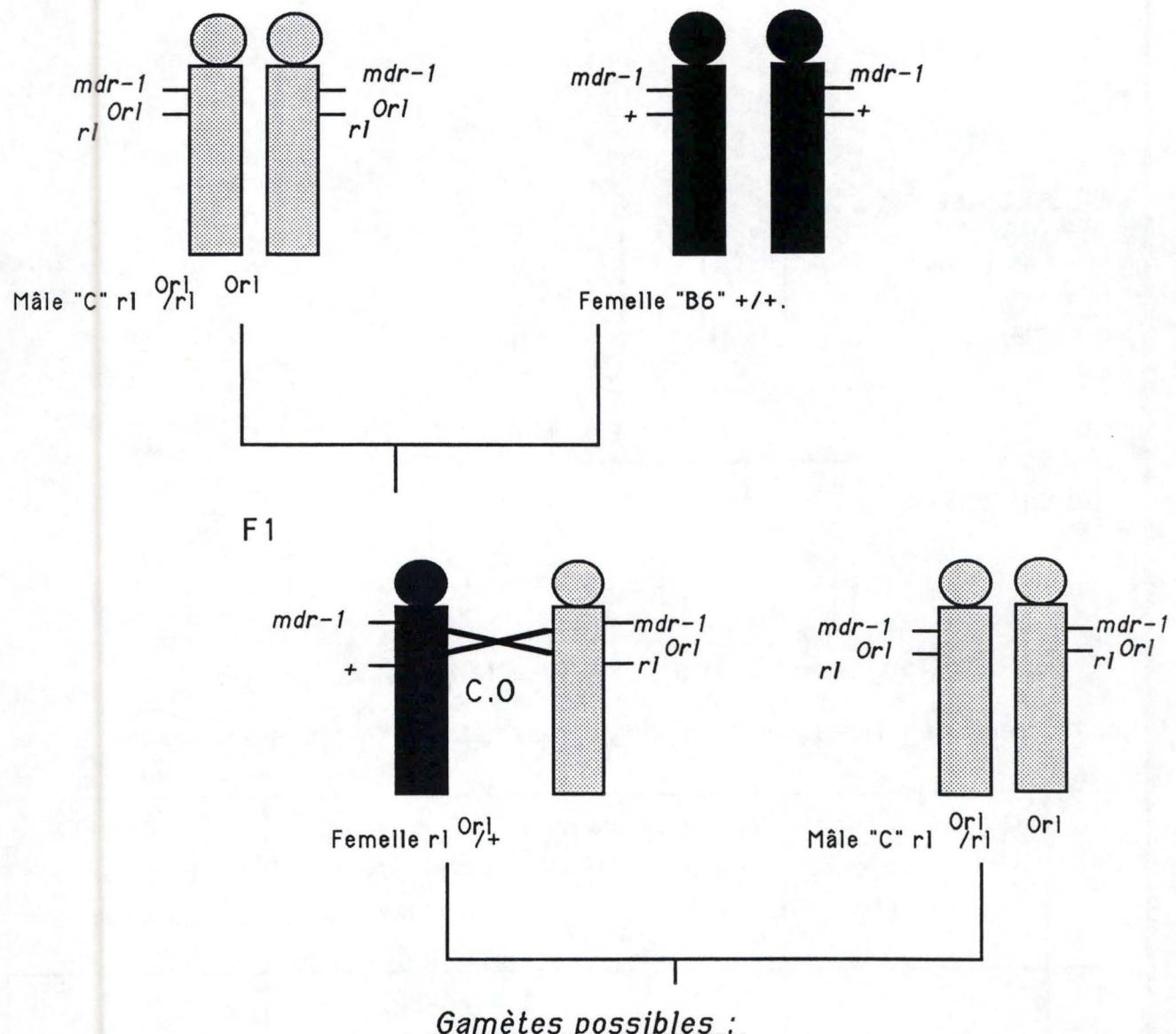
	Gamètes produits par les hétérozygotes de la F1	Fréquence attendue de ces gamètes.	Génotype des descendants N ₂ , le parent homozygote étant de génotype ab.	Nombre de descendants observés.
1	AB	(1-r)/2	AB/ab	f_1
2	Ab	r/2	Ab/ab	f_2 recombinants
3	aB	r/2	aB/ab	f_3 recombinants
4	ab	(1-r)/2	ab/ab	f_4

(Avec r = pourcentage de recombinaison).

Le pourcentage de recombinaison est donné par (Green, 1981) :

$$r = \frac{f_2 + f_3}{n}$$

Application des backcross au calcul de la distance *reeler-mdr-1*.



Mère :					Père :
<u>Non recombinants.</u>			<u>Recombinants.</u>		

Figure III.11.a. Détermination de la distance *reeler*-loci voisins: application à la détermination de la distance *reeler-mdr-1*. Croisements réalisés.

Où r est le pourcentage de recombinaison, f_2 et f_3 sont les nombres de descendants observés pour chaque type de recombinant, et n est le nombre total de descendants dans la N2.

Le calcul de l'erreur standard (SE_r) se fait comme suit :

$$SE_r = \left(\frac{r(1-r)}{n} \right)^{1/2}$$

III.3.3. Application à la détermination de la distance génétique séparant *reeler* des loci voisins.

Deux exemples sont envisagés : calcul de la distance *reeler-mdr-1* et calcul de la distance *reeler - T31H*.

A. Distance *reeler-mdr-1*.

Les backcross ont été réalisés de la manière suivante (voir figure III.11.a.) : des mâles "C" fertiles homozygotes *rlOrl/rlOrl* sont croisés avec des femelles "B6" $+/-$. Les individus F1 sont de génotype *rlOrl/+*. Les femelles F1 sont croisées avec un mâle homozygote *rlOrl/rlOrl* pour donner les descendants N2. Le caractère *reeler* des descendants est déterminé par dissection du cerveau. Leur DNA est extrait et digéré par un enzyme donnant un polymorphisme de restriction entre les 2 souches "C" et "B6", pour la sonde utilisée, puis transféré sur membrane de nylon et hybridé avec une sonde spécifique du locus d'intérêt. La sonde pCHP1 est utilisée pour le locus *mdr-1*, la sonde mp2 pour le locus *En-2* et la sonde pCP7 pour le locus de la *sorcine*.

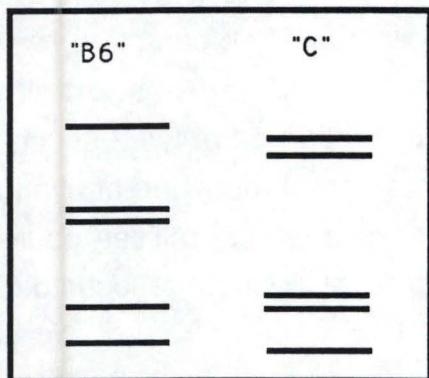
Pour mettre en évidence les individus recombinants, 2 informations sont nécessaires : le phénotype cérébral des individus N2 (*reeler* ou normal) et leur génotype pour chaque sonde. Pour comprendre comment ces 2 éléments permettent l'identification des individus recombinants, il faut se référer aux explications ci-dessous, à suivre en parallèle avec les schémas présentés figure III.11.a et b.

Individus backcross : génération N2.

	Génotype des backcross.	Phénotype.	Polymorphisme pCHP1.
R E C O M B I N A N T S		Normal	"C" / "B6"
		Reeler	"C" / "C"
R E C O M B I N A N T S		Reeler	"C" / "B6"
		Normal	"C" / "C"

Mise en évidence des recombinants sur Southern.

Pour rappel : polymorphisme présenté entre les lignées "B6" et "C" pour la sonde pCHP1 après digestion par msp1.



Individus non recombinants

Normal	Reeler
"C" / "B6"	"C" / "C"

Individus recombinants

Reeler	Normal
"C" / "B6"	"C" / "C"

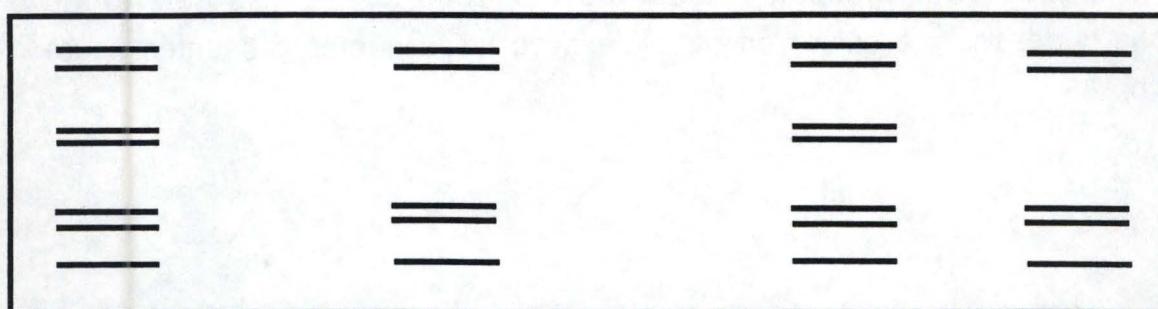


Figure III.11.b. Détermination de la distance *reeler*-loci voisins: application à la détermination de la distance *reeler-mdr-1*. Mise en évidence des individus recombinants.

Après croisement de mâles $r/Orl/r/Orl$, avec des femelles normales "B6", les individus F1 peuvent fournir les gamètes suivants (fig.III.11.a.) :

Pour la mère.

1. Sans recombinaison entre *reeler* et la sorgine .

- a. Le locus *mdr-1* et l'allèle sauvage de *reeler*, tous deux sur fond génétique "B6" (souris noires).
- b. Le locus *mdr-1* et l'allèle *reeler Orléans*, tous deux sur fond génétique "C" (souris blanches).

2. Avec recombinaison entre les loci *reeler* et *sorgine*.

Si un crossing over se produit entre le locus *reeler* et le locus *mdr-1*, les gamètes suivants peuvent être obtenus :

- a. *Mdr-1* sur fond "B6" (souris noires) et *reeler* sur fond "C" (souris blanches).
- b. *Mdr-1* sur fond "C" (souris blanches) et *reeler* sur fond "B6" (souris noires).

Pour le père.

Un seul type de gamètes est produit, où le locus de la sorgine et celui du gène *reeler Orléans* se trouvent tous deux sur fond génétique "C".

Après croisement des femelles F1 avec des mâles $r/Orl/r/Orl$, les descendants N2 auront les caractéristiques possibles suivantes (fig.III.11.b.):

a. Non recombinants.

1. Un allèle *mdr-1* sur fond "B6" (noir), et un allèle *mdr-1* sur fond "C" (blanc). Un allèle sauvage et muté du gène *reeler*. Le cerveau présentera un phénotype normal pour le caractère *reeler*. Pour rappel, la sonde pCHP1 reconnaît 5 bandes pour la lignée "C" et 5 pour la lignée "B6", dont 3 sont identiques à celles de la lignée "C". Le pattern mis en évidence dans ce cas avec la sonde pCHP1 correspond au polymorphisme spécifique de la lignée "B6" + le polymorphisme spécifique de la lignée "C", c'est à dire 7 bandes en tout.

2. Les 2 allèles *mdr-1* sur fond "C" (blanc), et les 2 allèles *reeler Orléans*.

Les individus descendants présentent donc les caractéristiques *reeler* à la dissection du cerveau. Tout le matériel génétique provient de la lignée "C". Le polymorphisme correspondra donc uniquement à celui de la lignée "C" (5 bandes).

Estimation de la distance entre le locus *reeler* et le point de translocation T31H.

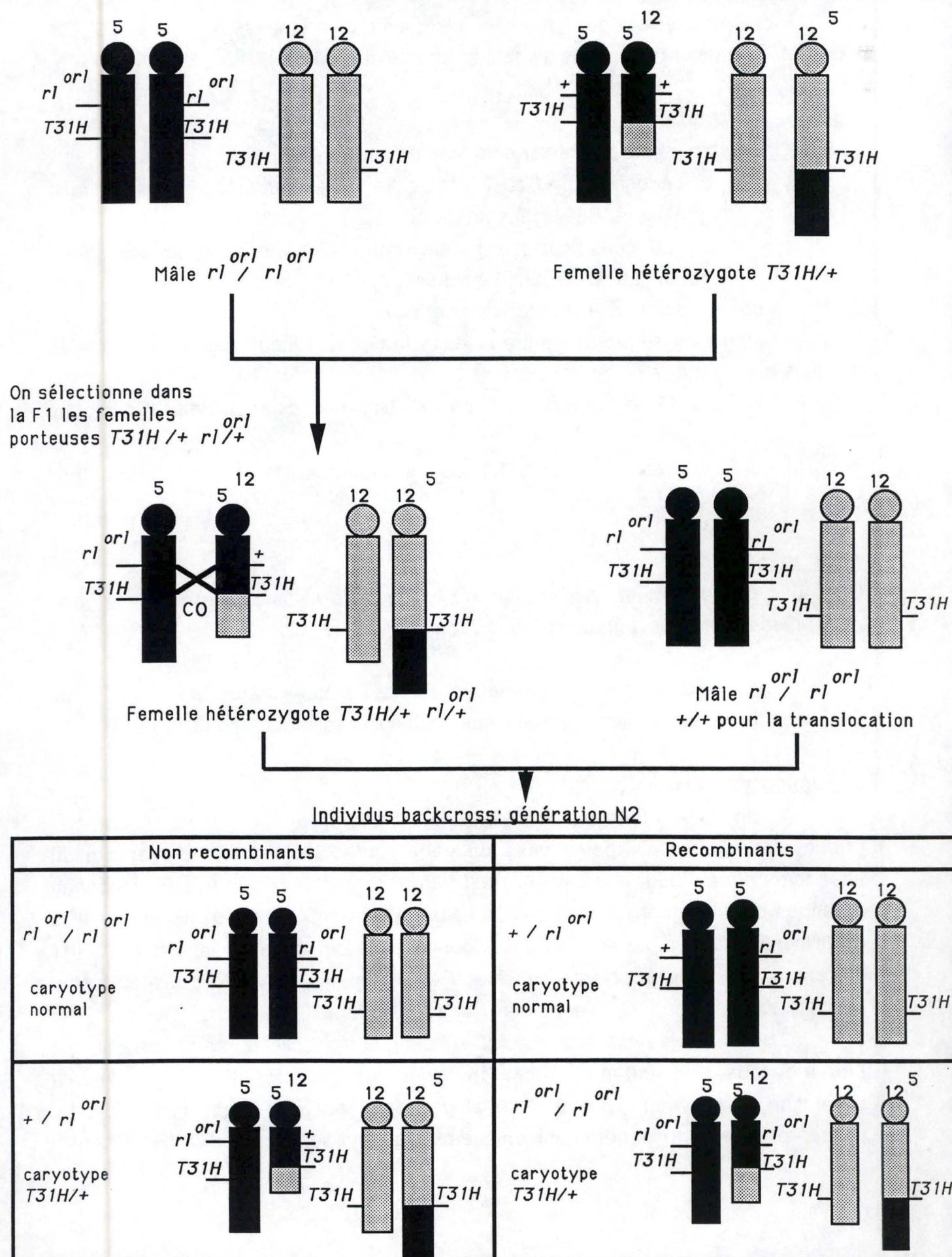


Figure III.12. Estimation de la distance génétique entre le locus *reeler* et le point de translocation T(5;12)31H: croisements réalisés, génotypes possibles des descendants N2.

b. Recombinants.

1. Un allèle *mdr-1* sur fond "C" et un allèle *mdr-1* sur fond "B6". Les 2 allèles *reeler Orléans* sur fond blanc ("C"). Les souris présentent donc le caractère *reeler* à la dissection du cerveau, mais le polymorphisme de restriction mis en évidence avec la sonde pCHP1 correspond au polymorphisme de la lignée "C" + celui de la lignée "B6" (7 bandes reconnues en tout).

2. Les 2 allèles *mdr-1* sur fond "C". Un allèle sauvage et un allèle muté du gène *reeler*. Les descendants ont un cerveau normal et le polymorphisme mis en évidence avec pCHP1 correspond uniquement à celui de la lignée "C" (5 bandes).

En tout, 127 souris N2 ont été obtenues. Parmi celles-ci, 9 recombinants ont été obtenus entre le *mdr-1* et *reeler*, pour 10 recombinaisons entre *En-2* et *reeler*. En parallèle de ces expériences, la distance *reeler-sorcine* a été estimée. Les résultats sont présentés et discutés dans la partie III. Résultats et discussion.

B .Calcul de la distance *reeler* et le point de translocation *T31H*.

Les principes sont identiques à ceux exposés ci-dessus. La mise en évidence des recombinants ne se fait pas grâce à l'existence d'un polymorphisme de restriction, mais par l'examen du caryotype. Pour cela, des femelles porteuses de la translocation sont croisées avec des mâles *r1Orl/r1Orl*. Les femelles F1 (*T31H/+*, déterminé par caryotype et *r1Orl / +*) sont "backcrossées" avec des mâles *r1Orl/r1Orl* pour donner la génération N2. Ces croisements sont représentés figure III.12. Les descendants N2 possibles sont les suivants :

Non recombinants.

1. Phénotype *reeler* (*r1Orl/r1Orl*) et caryotype normal.
2. Phénotype normal pour le caractère *reeler* (*r1Orl/+*) et porteur pour la translocation *T31H*.

Recombinants.

1. Phénotype normal pour le caractère *reeler* (*r1Orl/+*) et caryotype normal.
2. Phénotype *reeler* et porteur de la translocation *T31H*.

Sur 32 backcross, aucun recombinant n'a été obtenu.

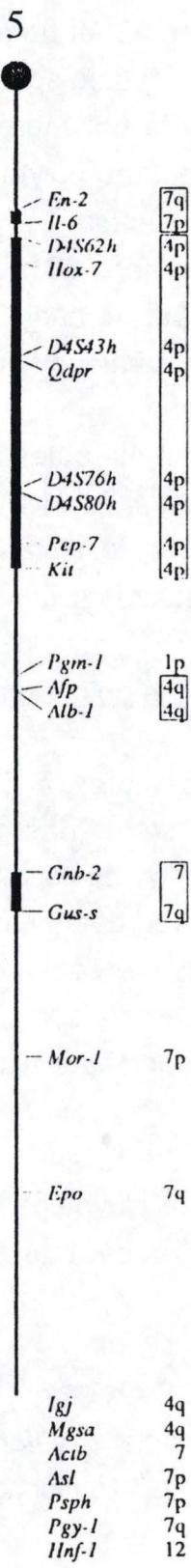


Figure IV.1. Carte du chromosome 5 de la souris et position des loci homologues sur les chromosomes humains.

IV. RECHERCHE DE NOUVEAUX MARQUEURS DE L'EXTREMITE CENTROMERIQUE DU CHROMOSOME 5.

IV1. Choix des banques chromosomiques.

Outre la localisation du locus de la sorcine, nous avons recherché de nouveaux marqueurs de l'extrémité centromérique du chromosome 5 chez la souris. Aucune banque spécifique du chromosome 5 de souris n'existe actuellement, mais il existe plusieurs librairies spécifiques des divers chromosomes humains. Nous avons donc recherché quel chromosome humain pourrait posséder une région d'homologie avec la partie proximale du chromosome 5 de la souris, c'est à dire un chromosome humain contenant des marqueurs typiques de cette région, tels que *En-2*, *mdr-1*, *IL-6*... Des régions de synténie entre des parties du chromosome 5 de la souris et les chromosomes humains 4 et 7 sont bien connues (voir fig.IV.1).

Une région de synténie, entre la partie proximale du chromosome 5 de souris et le chromosome 7 humain, est également présente, permettant de diriger notre choix vers une banque de DNA dérivée du chromosome 7 humain.

Locus *En-2*.

En 1987, Joyner et Martin ont localisé le gène *En-2* sur le chromosome 5 de la souris, à proximité d'autres marqueurs bien connus de l'extrémité centromérique du chromosome 5 (locus *Emv-1*, correspondant à un site d'intégration pour un des provirus de la leucémie murine, loci *extra-toes(Hx)* et *Hammertoe (Hm)*, conduisant à des anomalies au niveau du squelette des membres). Le locus *En-2* a été localisé sur le chromosome 7q1 chez l'homme(Logan et al., 1989). L'ordre supposé de ces marqueurs est *En-2 - Hx - Emv-1 - autres marqueurs* (Martin et al., 1990).

Locus *mdr-1*.

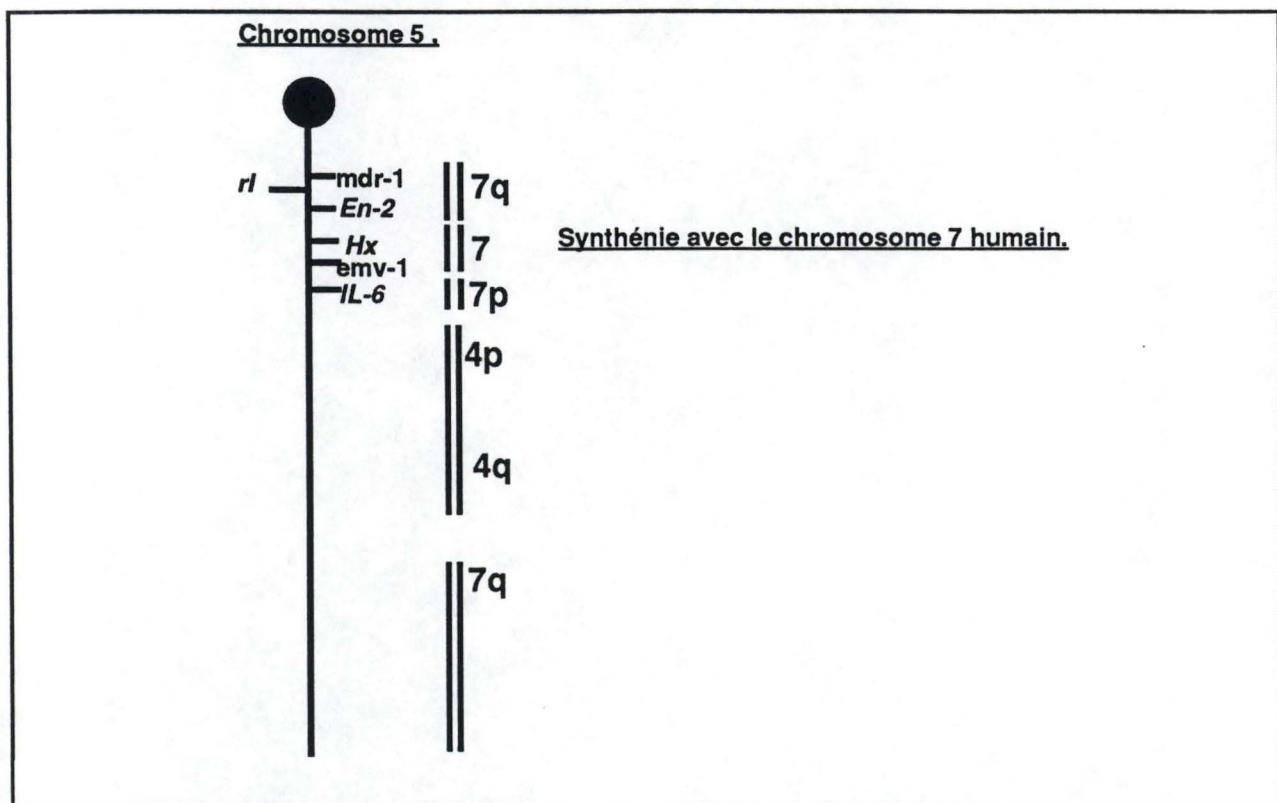
Le locus *mdr-1*, situé sur l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris (Martinson et Levan, 1987), se retrouve au niveau de la sous-région chromosomique 7q21-q31 chez l'homme (Trent et Witkowski, 1987).

Locus *IL-6*.

Comme les loci *En-2* et *mdr-1*, le locus *IL-6* (codant pour une cytokine stimulant la croissance des plasmocytes) est également situé sur l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris. L'homologue du locus *IL-6* est présent chez l'homme, au niveau du chromosome 7p, sous-régions 7p21.

Chez la souris, le locus *IL-6* serait situé à 3 cM du locus *En-2*, et en position distale par rapport à celui-ci (Mock et al., 1989).

En conclusion de ces observations, les comparaisons suivantes peuvent être établies entre le chromosome 5 de la souris et le chromosome 7 humain :



Les connaissances actuelles de l'organisation de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris, à savoir la localisation de *reeler* entre les loci *mdr-1* et *En-2*, ainsi que l'établissement d'une région de synthénie entre cette partie du chromosome 5 et le chromosome 7 humain, suggère que l'homologue humain du gène *reeler* pourrait également être localisé dans la sous-région chromosomique 7q. Ainsi, de nouveaux marqueurs flanquant le locus *reeler* pourraient être trouvés dans des banques génomiques construites à partir du chromosome 7 humain.

IV.2. Banques génomiques dérivées du chromosome 7 humain : stratégie de screening.

Nous avons décidé de rechercher de nouveaux marqueurs dans 2 banques génomiques dérivées du chromosome 7 humain, à savoir une banque construite

dans le vecteur Charon A21 et une autre construite dans le cosmid pCV108. Les informations concernants ces deux banques sont données dans la partie II (Matériel et méthodes). Les techniques de screening utilisées sont l'hybridation sur plaques (pour Charon A21) et l'hybridation sur colonies (pour les cosmides), également décrites par la suite.

La stratégie développée pour isoler des clones potentiellement intéressants est la suivante. Les banques chromosomiques sont construites à partir de lignées cellulaires hybrides homme-hamster, ces lignées possédant comme seul matériel chromosomique humain le chromosome 7, tous les autres chromosomes de la cellule provenant du hamster. Pour construire une banque spécifique du chromosome 7 humain, il faut donc pouvoir isoler uniquement le chromosome 7, et éliminer les chromosomes provenant du hamster. Bien qu'un enrichissement important en chromosome 7 soit réalisé par cytofluorimétrie de flux, les banques contiennent toujours un pourcentage de contamination par les chromosomes provenant du hamster, et un premier point dans la stratégie de screening est donc d'isoler des clones qui correspondent à un fragment de DNA de chromosome 7 humain, et non pas à du DNA de hamster. Le deuxième point à considérer est la sélection de clones de chromosome 7 humain pouvant reconnaître le DNA de souris. En considérant ces deux critères, seuls seront sélectionnés les clones donnant un signal positif après hybridation avec le DNA humain et DNA de souris, et un signal négatif après hybridation avec le DNA de hamster.

Les clones isolés de cette manière correspondent théoriquement à du DNA de chromosome 7 humain, qui présente une homologie avec le DNA de souris. Certains de ces clones constituent de nouveaux marqueurs potentiels de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris. Pour déterminer s'il s'agit vraiment de clones intéressants, les principes sont les mêmes que ceux développés pour les sondes mp-2 (locus *En-2*), pCHP1(locus *mdr-1*) et pCP7 (locus de la sorcine). La première étape consiste à mettre en évidence un polymorphisme de restriction pour les 2 lignées de souris BALB/C et C57B1/6J. Grâce aux lignées congéniques, on peut déterminer si le marqueur est assez proche du locus *reeler*. Enfin, on peut calculer la distance génétique entre ce nouveau marqueur et le locus *reeler* en examinant les animaux backcross N2.

Chapitre II.

MATERIEL ET METHODES.

I. TAMPONS, ENZYMES ET SOLUTIONS STOCKS

1. **Acrylamide 40%** : Dissoudre 380 gr d'acrylamide (DNA -sequencing grade) et 20 g de N,N'-méthylènebisacrylamide dans 600 ml d'eau distillée. Chauffer à 37°C pour dissolution et porter le volume à un litre dans de l'eau distillée. Stériliser par passage au travers d'un filtre avec pores de 0,45 microns. S'assurer que le pH est égal ou inférieur à 7 et conserver à 4°C dans des bouteilles teintées.
2. **Persulfate d'ammonium 10% (APS)** : Dissoudre 1 g de persulfate d'ammonium dans 10 ml d'eau distillée. La solution peut être conservée à 4°C pendant plusieurs semaines.
3. **CaCl₂ 1M** : Dissoudre 54 g de CaCl₂.6H₂O dans 20 ml d'eau distillée. Stériliser par passage au travers d'un filtre millipore 0,22 micron.
4. **0.5M EDTA pH8** : Ajouter 186.1 g de disodium ethylènediaminetétracétate.2H₂O dans 800 ml d'H₂O. Agiter vigoureusement à l'aide d'une puce magnétique. Porter à pH8 à l'aide de NaOH. Stériliser par autoclave. Conserver à température ambiante.
5. **BLOTO 10%(Bovine Lacto Tranfer Technique Optimizer)**: Dissoudre 10 g de poudre de lait écrémé dans de l'eau distillée. Ajouter une pointe d'azide de sodium et porter à 100 ml. Conserver à 4°C.
6. **Bromure d'éthidium (10 mg/ml)** : Ajouter 1 g de bromure d'éthidium à 100 ml d'eau. Mélanger sur agitateur magnétique jusqu'à dissolution totale. Emballer dans de l'aluminium et conserver à 4°C.
7. **CIAA** : Préparer une solution contenant 1 part d'alcool isoamylique pour 24 parts de chloroforme.
8. **DNA Carrier** : Dissoudre 1 g de DNA de sperme de saumon dans 100 ml de NaOH 0.4 N et laisser dissoudre une nuit à température ambiante sur agitateur magnétique. Placer dans un bain d'eau bouillante 45 minutes pour casser le DNA, refroidir sur glace et neutraliser avec de l'acide acétique glacial pH4.7 .Centrifuger 4 minutes à 4000 rpm (Sorvall, raptor HS 4) pour éliminer les débris, récupérer le surnageant et ajouter 2 volumes d'éthanol absolu. Placer une heure à -20°C et collecter le DNA par centrifugation(10 minutes à 4000 rpm) Rincer le culot à l'éthanol 70%, sécher et redissoudre dans 50 ml de TE pH7.5. Déterminer la concentration par lecture UV à 260 nm et diluer à une concentration finale de 10 mg/ ml. (1 DO = 40 µg/ml). Aliquoter par 1 ml et conserver à -20°C.
9. **Gel-loading buffer (6X)** : 0.25 % de bleu de bromophénol, 0.25 % xylène cyanol FF, 15 %- Ficoll (type 400, Pharmacia) dans de l'eau distillée. Conserver à température ambiante.
10. **IPTG 1M (Isopropylthio-β-D-galactoside)** : Dissoudre 2 g d'IPTG dans 8 ml d'eau distillée. Porter ensuite à 10 ml avec de l'eau distillée et stériliser par passage sur filtre millipore 0,22 micron. Répartir en aliquots de 1 ml et conserver à -20°C.
11. **MgSO₄ M** : Dissoudre 24.6 g de MgSO₄.7H₂O,dans un volume final de 100 ml d'eau distillée et autoclaver.

12. NaAC 3M : Dissoudre 408.1 g d'acétate de sodium.3H₂O dans 800 ml d'eau distillée. Ajuster le pH à 5.2 avec de l'acide acétique glacial ou à 7 avec de l'acide acétique dilué. Porter à un litre avec de l'eau distillée et autoclaver.

13. NaCl 5M : Dissoudre 292.2 g de NaCl dans 800 ml d'eau , porter à un litre et autoclaver.

14. Phénol saturé en TE : Préparer une solution contenant 250 g de phénol, 0.3 g d'hydroxyquinoline, 62.5 ml d'eau distillée et 32 ml de Tris pH 8. Placer 1 à 2' dans le four à micro-ondes jusqu'à dissolution complète, sans dépasser 65°C. Aliquoter et conserver à -20°C.

15. Protéinase K , 10 mg/ml : Dissoudre à 10 mg/ml dans de l'eau distillée stérile, aliquoter par 400 µl et conserver à -20°C.

16. RNAase exempte de DNAase : Dissoudre le RNAase A à une concentration de 10 mg/ml dans une solution 10 mM Tris-HCl(pH7.4), 15 mM NaCl. Chauffer 15 minutes dans un bain d'eau bouillante, laisser refroidir à température ambiante et aliquoter par 200 µL. Conserver à -20°C.

17. SDS 10%(Sodium dodécyl sulfate) : Dissoudre 10 g de SDS (électrophorèse grade) dans 90 ml d'eau distillée. Chauffer à 68°C pour dissolution et ajuster le pH à 7.2 . Porter à 100 ml et conserver à température ambiante.

18. 20X SSC : Dissoudre 175.3 g de NaCl et 88.2 g de citrate de sodium dans 800 ml d'eau distillée(3M NaCl, 0.3 M citrate). Ajuster à pH7 et porter à 1l avec de l'eau distillée . Autoclaver.

19. 20X SSPE : Dissoudre 175.3 g de NaCl, 27.6 g de NaH₂PO4.H₂O et 7.4 g d'EDTA (3.6 M NaCl, 0.2 M de phosphate de sodium, 0.2 M EDTA)dans 800 ml d'H₂O. Ajuster à pH 7.4 avec du NaOH concentré . Porter à un litre avec de l'eau et autoclaver.

20. Tampon d'électrophorèse TAE (Tris-acétate) 50X : Dissoudre 242 g de Tris, 57.1 d'acide acétique glacial et 37.2 g de Na₂EDTA.2H₂O. Porter à un litre avec de l'eau distillée et autoclaver.

21. Tampon d'électrophorèse TBE (Tris-borate) 10X : Dissoudre 108 g de Tris, 55 g d'acide borique dans 800 ml d'eau distillée. Ajouter 40 ml d'EDTA 0,5M, pH8. Porter à un litre et autoclaver.

22 . Tampon TE : Préparer une solution 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 7.6 ou 8, 1mM EDTA, pH8 dans de l'eau distillée et autoclaver.

23. Tris-HCl 1M (tris hydroxyméthylaminométhane), pH 7.4 ou 7.6 : Dissoudre 121.1 g de tris dans 800 ml d'eau distillée. Porter à pH désiré avec de l'HCl concentré. Porter à un litre et autoclaver

24. X-GAL (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) : Préparer une solution à 20 mg / ml dans du diméthylformamide . Aliquer dans des tubes en propylène et emballer ceux-ci dans de l'aluminium. Conserver à -20°C.

II. MILIEUX DE CULTURE POUR BACTERIES, BACTERIOPHAGES λ , ANTIBIOTIQUES.

II.1.Milieu liquide LB .

Ajouter à 950 ml d'eau distillée : 10 g de bactotryptone
5 g de yeast extract
10 g de NaCl.

Agiter jusqu'à dissolution, et ajuster le pH à 7 avec du NaOH. Porter à un litre avec de l'eau distillée et autoclaver. Attendre que la solution soit revenue à une température d'environ 50°C avant d'ajouter des substances thermolabiles telles que des antibiotiques.(Ampicilline : 50 µg/ml ; tétracycline : 10 µg/ml).

II.2.Milieux solides contenant de l'agar ou de l'agarose.

Boîtes LB : Préparer du LB liquide comme ci-dessus. Ajouter 15 g de bacto-agar avant d'autoclaver. Après stérilisation , agiter le milieu de manière à bien répartir l'agar liquéfié et laissé refroidir jusqu'à environ 50°C avant d'ajouter des composés thermolabiles au milieu. Couler ensuite la solution dans des boites de pétri de format adéquat , en évitant de former des bulles et laisser sécher les boites 2 à 3 heures sous la hotte à flux laminaire.

Entourer les boites de parafilm et les conserver , inversées, à 4°C.

Milieu top agar : Idem que ci-dessus mais ajouter 7 g d'agar/litre de milieu.Répartir dans des flacons de 100 ml et conserver à 4°C après stérilisation.

Milieu top agarose : Idem que top agar mais remplacer l'agar par 7 g/litre d'agarose.

Boîtes agar contenant une solution d'X-Gal + IPTG : A réaliser 30 minutes avant l'étalement de la culture. Sur des boîtes fraîches, étendre 40 µL d'X-Gal, bien faire pénétrer, puis étendre 10µL d'IPTG. Laisser sécher sous la hotte à flux laminaire. Attention, ne pas mélanger l'X-Gal et l'IPTG .(Risques de précipitation).

II.3.Solutions d'antibiotiques.

Ampicilline 2000X : Préparer une solution à 100 mg/ml dans de l'eau distillée. Stériliser par passage sur filtre millipore de 0.22 µm de diamètre. Aliquoter par 500 µl et conserver à -20°C.

Tétracycline 500X : Préparer une solution à 5 mg/ml dans de l'éthanol 70 %. Aliquoter par 1 ml et stériliser par passage sur millipore 0.22 µm de diamètre. Conserver à -20°C.

II.4.Solutions pour culture de bactériophages λ .

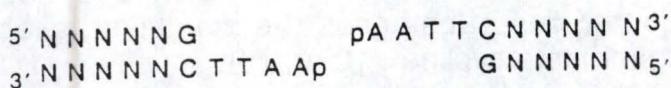
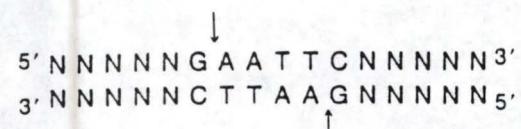
Maltose : Le maltose est en général ajouté au milieu de culture des bactéries qui vont subir l'infection par le phage.(Inducteur du récepteur pour λ .)

Préparer une solution stock à 20% (20 g dans 10 ml d'eau distillée) et stériliser par passage sur filtre millipore 0,22 micron. Conserver à température ambiante.

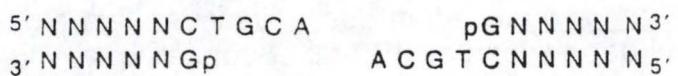
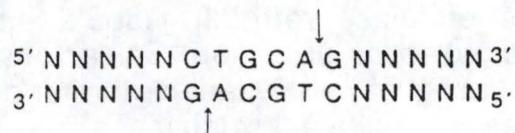
SM (Suspensio médium) : Ce milieu est utilisé pour le stockage et la dilution des bactériophages λ .

Préparer pour un litre de solution stock : 5.8 g de NaCL
 2 g de MgSO₄.7H₂O
 50 ml de Tris-HCl 1M, pH 7.5.
 0,01% gélatine.(W/V).

A. Enzyme EcoRI.



B. Enzyme PstI.



C. Enzyme HaeIII.

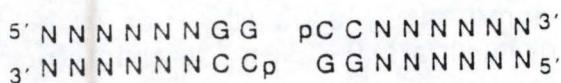
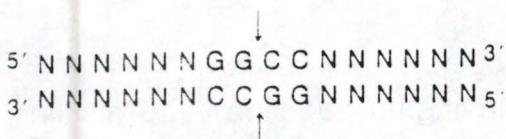


Fig. III.1.A. L'enzyme EcoRI produit des extrémités cohésives 5' protrudantes. B. L'enzyme de restriction PstI donne des extrémités 3' protrudantes. C. L'enzyme Hae III produit des extrémités à bouts francs.

Porter à un litre avec de l'eau distillée et autoclaver. Conserver à température ambiante.

III. QUELQUES TECHNIQUES COURAMMENT UTILISEES EN BIOLOGIE MOLECULAIRE

III.1. Digestions enzymatiques.

Les endonucléases de restriction sont des enzymes qui reconnaissent et clivent des séquences spécifiques (en général de 4 ou 6 bp) au niveau l'ADN bicaténaire. Les fragments générés possèdent une extrémité 5' phosphate et une extrémité 3' hydroxyle.

D'un point de vue pratique, on peut classer ces enzymes en 2 groupes (fig. III.1) :

-ceux hydrolysant les liens phosphodiesters de manière à produire des bouts francs (Blunt ends).

-ceux hydrolysant les liens phosphodiesters de manières à produire des extrémités cohésives, soit 3' protubérantes, soit 5' protubérantes.

Protocole :

Les enzymes sont utilisées aux conditions de température et dans le tampon recommandés par les fabricants.

1. Placer le DNA à digérer dans un tube eppendorf stérile.
 2. Ajouter 2 µl du tampon de digestion adéquat
 3. Ajouter une unité d'enzyme par µg de DNA à digérer.
 4. Porter à 20 µl avec de l'eau stérile.
 5. Incuber 2 à 3 heures à température adéquate.
 6. Arrêter la réaction par ajout d'EDTA à concentration finale de 10 mM.
- Si le DNA doit être déposé directement sur gel, arrêter la réaction par ajout de 4 µl de bleu.

III.2. Electrophorèses en gel d'agarose.

III.2.1 Electrophorèse analytique.

La technique d'électrophorèse en gel d'agarose est un moyen classique utilisé pour séparer des fragments d'ADN, évaluer leur taille et leur concentration.

Principe :

A un pH proche de la neutralité, les molécules d'ADN sont chargées négativement. Ces molécules placées dans un champs électrophorétique migrent donc vers l'anode.

Le rapport entre la charge et la masse des molécules étant identique quelque soit la taille des fragments, la séparation des molécules selon leur taille résulte :

1. d'une force de migration due au champs électrique.
2. d'une force de freinage différentielle exercée par le gel .

La vitesse de migration des molécules d'ADN dans un gel d'agarose dépend entre autre de la conformation de l'ADN, de la concentration en agarose du gel, du voltage appliqué, du type de tampon utilisé et du poids moléculaire de l'ADN.

Les molécules bicaténaires et linéaires de DNA migrent à une vitesse qui est inversement proportionnelle au logarithme de leur poids moléculaire.

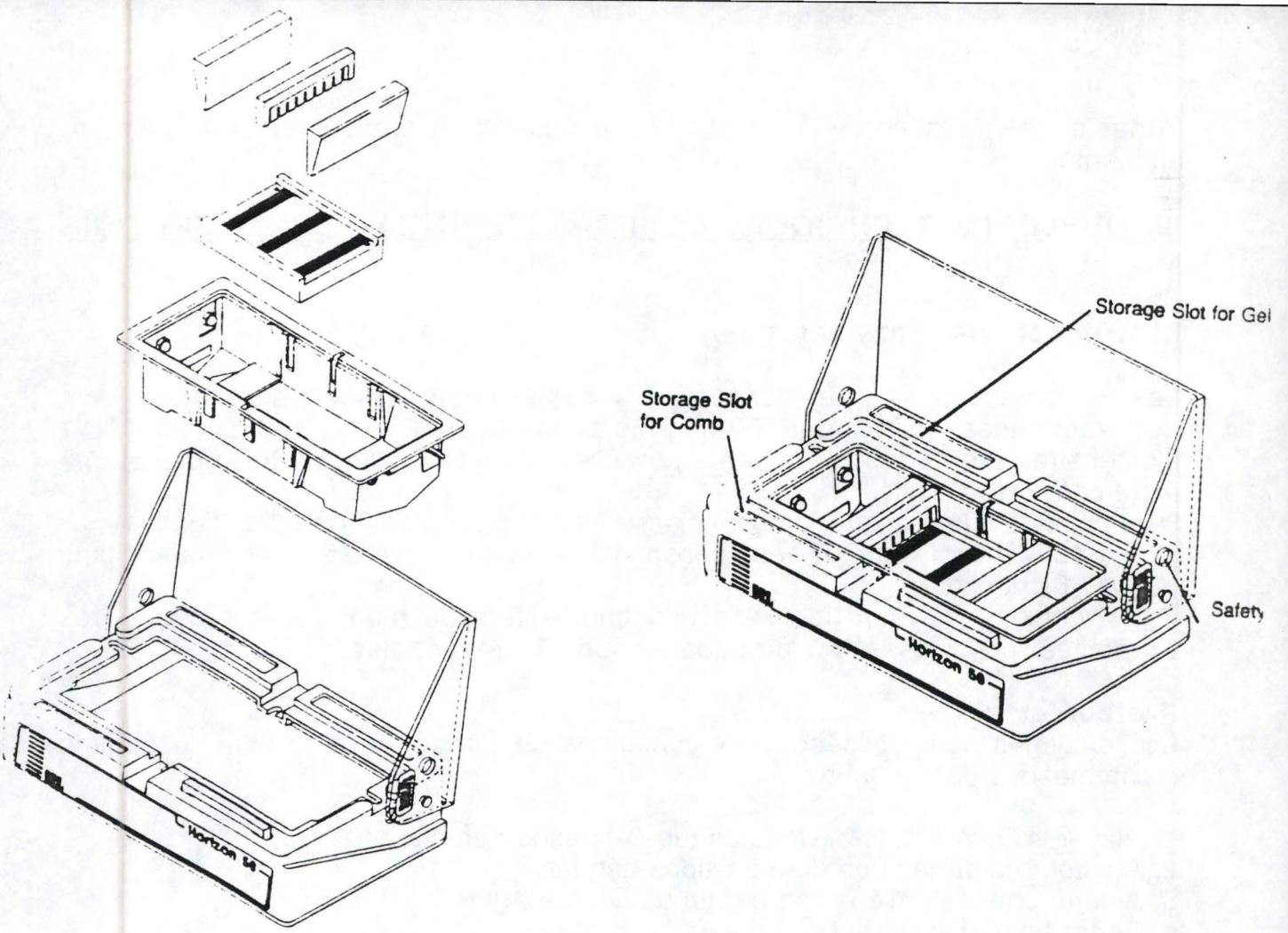


Fig.III.2. Montage d'un appareil d'électrophorèse en gel d'agarose.

Visualisation du DNA : on utilise un colorant fluorescent, le bromure d'éthidium, qui s'intercale entre les bases du DNA. Une fois associé au DNA, il possède une fluorescence accrue, qui peut être mise en évidence par illumination sous UV(302 nm).

Protocole :

1. Dissoudre l'agarose (0.8%, 1%, ou autre selon la taille des fragments à séparer) dans un volume adéquat de tampon d'électrophorèse (TBE ou TAE) par chauffage au four à micro-ondes.
2. Monter l'appareil d'électrophorèse(Horizon™ 58 BRL) comme représenté ci-contre (fig. III.2).
3. Lorsque la température du gel est revenue aux environs de 55°C, ajouter le bromure d'éthidium à concentration finale de 0.3 µg/ml, mélanger et couler le gel sur le support en plexiglas. Placer le peigne et laisser solidifier le gel.
4. Pendant ce temps, préparer les échantillons : pour cela, ajouter un sixième de volume de gel loading buffer. Cette solution contient un colorant (bleu de bromophénol) permettant de suivre le front de migration, et un alourdisseur (Ficoll) augmentant la densité des échantillons et entraînant ceux-ci au fond des puits.
5. Enlever le peigne du gel de manière à créer les puits, déposer les échantillons dans les puits et couvrir le tout de tampon d'électrophorèse.
6. Connecter l'appareil à la source de tension et choisir le voltage désiré. Laisser migrer un laps de temps adéquat, en général 2 heures pour un minigel (10 cm de long).

Estimation de la taille d'un fragment : on fait migrer des fragments de DNA de taille et de concentration connue dans un puits voisin de ceux des échantillons .

Le marqueur le plus utilisé est le phage λ digéré par HindIII, permettant l'estimation de fragments de taille de 0.6 à 8 Kb.

Grâce aux marqueurs de taille, on peut tracer une courbe d'étalonnage donnant le logarithme du poids moléculaire en fonction de la distance de migration. A partir de cette courbe, et en connaissant la distance de migration des échantillons, on peut estimer leur taille.

Estimation de la concentration d'un échantillon :

La fluorescence émise par une bande est proportionnelle au nombre de molécules de bromure d'éthidium intercalées dans le DNA, et donc à la longueur et à la concentration de ce fragment de DNA. On peut ainsi estimer la concentration de l'échantillon en comparant sa fluorescence à celle des bandes du marqueur λ de concentration connue.

III.2.2. Electrophorèse préparative.

Cette technique permet de récupérer un fragment intéressant à partir d'un gel d'agarose.

A. "Geneclean".

Cette technique utilise un kit commercialisé par Geneclean (Bio 101 Inc.).

Principe : Le morceau d'agarose contenant le fragment d'intérêt est découpé et dissous. L'ADN est alors adsorbé sur des billes de verre dans des conditions de salinité élevée. Les billes sont récupérées, lavées et séchées et l'ADN est elué par

passage dans un solution de faible concentration saline.

Protocole :

1. Peser le morceau de gel contenant l'insert, le couper en petits cubes pour faciliter la dissolution .
2. Ajouter 3 volumes de NaI 6M et incuber à 50°C jusqu'à dissolution complète de l'agarose.
3. Ajouter 5 µl de Glassmilk pour 5 µg de DNA, mélanger et placer sur la glace pendant 5 minutes en agitant régulièrement.
 - Glassmilk : suspension de billes de silice dans l'eau, stockée à 4°C. Bien remettre en suspension avant l'emploi.

Si le volume est supérieur à 1,5 ml, laisser 15 minutes.

4. Centrifuger dans microfuge pendant 5 secondes, décanter.

5. Laver 3 fois le culot avec 700 ml de "New Wash Solution".

New Wash Solution :

- 7 ml de "New concentrate"
- 140 ml d'eau
- 155 ml éthanol absolu.

Mélanger et aliquoter par 50 ml dans des tubes falcon et stocker à - 20°C.

6. Après le 3ème lavage, décanter puis recentrifuger pour bien sécher le culot.

7. Resuspendre le culot dans 10 µl de TE, incuber 3 minutes à 50°C, centrifuger pendant 30 secondes, transvaser soigneusement le surnageant contenant le DNA élue.

Recommencer la même opération une seconde fois.

Pour récupérer des inserts par cette méthode, il est indispensable de travailler en présence de tampon acétate (TAE).

B. Méthode utilisant les membranes de DEAE.

Principe : Les fragments de DNA sont séparés sur gel. Le gel est alors coupé en avant du fragment intéressant de manière à pouvoir insérer une membrane de DEAE-cellulose dans l'encoche. L'électrophorèse est poursuivie jusqu'à ce que le DNA se soit fixé sur la membrane. La membrane est ensuite récupérée et lavée dans un milieu de force ionique élevée pour éluer le DNA.

Protocole :

Préparation des membranes de DEAE :

Couper les membranes aux dimensions adéquates. Placer la membrane dans une solution d'EDTA 10 mM pH8 pendant 5 minutes. Placer ensuite 5 minutes dans du NaOH 0.5N et rincer la membrane 6 fois dans de l'eau stérile. Conserver les membranes dans une solution d'EDTA 10 mM à 4°C et rincer dans le tampon d'électrophorèse avant l'emploi.

Récupération des fragments :

1. Faire migrer le DNA sur un gel agarose 1% TBE 1 x.
2. Repérer l'insert aux U.V. et placer la membrane de DEAE devant l'insert.
3. Remettre migrer pendant 10 minutes. Vérifier aux U.V. que l'insert est bien sur la membrane.
4. Mettre la membrane dans un tube eppendorf avec 200 µl de NaCl M, incuber pendant 30 minutes à 65° C.
5. Récupérer le liquide et recommencer une seconde fois avec 200 µl de NaCl.
6. Faire un phénol-chloroforme pour purifier l'insert.

III.3. Electrophorèse en gel de polyacrylamide.

Les gels de polyacrylamide permettent la séparation de fragments de plus petite taille (5-500 bp) que ceux séparés sur gels d'agarose(70-800000 bp).Leur pouvoir de résolution est très puissant et permet la séparation de fragments ne différent en taille que par une paire de base.

Leur préparation et leur manipulation est cependant plus délicate que celle des gels d'agarose.

Les techniques concernant les gels d'acrylamide sont décrites dans les paragraphes IX et XII.

III.4. Purification d'acides nucléiques: extraction par phénol-chlorophorme.

Principe : Cette technique permet d'éliminer les protéines d'une solution d'ADN. Le phénol est mélangé avec la préparation à purifier dans des conditions qui favorisent la dissociation des protéines du DNA. Après centrifugation, on obtient 2 phases : un phase aqueuse contenant les acides nucléiques et une phase organique contenant les protéines. Le chloroforme aide également à la dénaturation des protéines, facilite la séparation des 2 phases et permet l'élimination des traces de phénol. Le phénol doit être équilibré à pH8, le DNA passant dans la phase organique à pH acide.

Le DNA est ensuite récupéré par précipitation à l'éthanol en présence d'ions monovalents .

Protocole :

1. A l'eppendorf contenant la préparation à purifier, ajouter un volume égal de phénol. Mélanger. Ajouter un volume de CIAA. Mélanger.
2. Centrifuger 3 minutes dans la minifuge.
3. Récupérer la phase aqueuse supérieure.
4. Ajouter un volume égal de CIAA. Agiter.
5. Centrifuger 3 minutes à la minifuge.
6. Récupérer la phase aqueuse et ajouter un dixième de volume de NaAC 3M.
7. Remplir l'eppendorf d'éthanol absolu et placer une heure à -20°C.
8. Centrifuger 20 minutes à froid, décanter.
9. Rincer le culot à l'éthanol 70%, centrifuger à froid et décanter.
10. Resuspendre le culot dans un volume adéquat de TE ou d'eau distillée.

IV. EXTRACTION DE DNA GENOMIQUE A PARTIR DE TISSUS PROVENANT DE MAMMIFERES.

IV.1. Principe : Les tissus (après homogénéisation au Dounce) ou les cellules sanguines (après lyse) sont placés dans une solution contenant de la protéinase K et du SDS et incubés jusqu'à dégradation des protéines. Les protéines sont alors éliminées par extraction au phénol-chlorophorme, le DNA est récupéré par précipitation à l'éthanol, séché et resuspendu dans un tampon adéquat.

IV.2. Pour extraction à partir de tissus de souris ou de hamster.

Matériel : instruments flambés

tubes Falcon 50 ml stériles
petits Dounces stériles (1 par souris)
solution d'homogénéisation : - Tris 10 mM, pH 8
(10 ml/souris) - EDTA 10 mM (pH 8)
- SDS 1%
- protéinase K 100 µg/ml
RNAase 10mg/ml.

Mise en route : fin d'après-midi, demande 2 jours en suivant.

Protocole :

1. Les animaux doivent être à jeun depuis 24 h surtout si l'on veut utiliser le foie (présence de glycogène) comme source de DNA. Tuer la souris par dislocation cervicale,asperger généreusement la peau d'alcool dénaturé et prélever la rate et/ou le foie avec des instruments flambés. Placer immédiatement les organes sur la glace pour inhiber les DNAases.
 - N.B. - On peut également prélever les reins, les surrénales, le thymus si l'on a besoin de beaucoup de DNA.
 - Ces tissus peuvent être congelés à -70°C pour une extraction future.
2. Transférer le tissu dans un Dounce avec 1 ou 2 gouttes d'eau distillée et le réduire en pâte avec le piston.(Dounce refroidi dans de la glace). Les tissus doivent être bien homogénisés pour permettre une action efficace de la protéinase K et du SDS.
3. Ajouter 5 ml de solution d'homogénéisation et homogénéiser.
Transférer dans un Falcon de 50 ml. Répéter avec 5 ml pour rincer.
4. Incuber le Falcon avec les 10 ml ou 20 ml d'homogénat sur la roue tournante à l'étuve à 55°C toute la nuit.
5. Digérer le RNA par RNase, ajoutée à la concentration de 100 µg/ml, à 37°C pendant 1 heure, avec agitation occasionnelle.
6. Ajouter 10 ml de phénol et 10 ml de CIAA, envelopper de papier aluminium et agiter à température ambiante pendant 30 minutes.
7. Centrifuger 15' à 2.600 rpm à T° ambiante dans un rotor RC3B.
8. Récolter la phase aqueuse (supérieure) avec une pipette en verre de 10 ml, stérilisée, utilisée en position inversée. Il faut veiller à ne pas récolter l'interface, qui est constituée de contaminants (protéines dénaturées surtout).
9. Ajouter 2 volumes d'éthanol et récolter le DNA avec une baguette en verre ou une pipette pasteur bouchée. Rincer avec éthanol 70%, bien égoutter pour éliminer l'excès d'alcool, sécher environ 10' sous trompe à vide et resuspendre dans 1 ml TE pH8 sous agitation modérée (pas de vortex), pendant au moins 24 heures.
10. Estimer la concentration en DNA en lisant aux UV à 260 nm:
1 DO = 50 µg/ml.
La lecture A260 et A280 doit donner un rapport:
A260/A280 > 1.95.
Ajuster la concentration à 1 mg/ml avec TE 8 et resuspendre.
11. Faire un minigel à 0.6-0.7 % avec du DNA marqueur de poids moléculaire (lambda coupé par HindIII) et un dépôt de lambda non coupé. Le DNA bien préparé doit être de poids supérieur à lambda non coupé (50 kb) et doit contenir peu ou pas de RNA .
12. Aliquoter les DNA par 10 µg/10µL dans des tubes Eppendorf . Conserver à -20°C.

IV.3.Pour extraction de DNA à partir de cellules de sang humain.

Le protocole est similaire à celui utilisé pour l'extraction de DNA à partir de tissus. Seul le mode de lyse des cellules est différent.

Matériel supplémentaire : ELB(Erythrocyte Lysis Buffer) :

155 mM NH₄Cl.

10 mM KHCO₃ pH 7.4

0.1 mM EDTA.

Protocole :

1. Prélever 20 ml de sang.
2. Ajouter 40 ml de la solution ELB froide.
3. Laisser 15 minutes dans la glace en agitant de temps en temps.
4. Centrifuger 15 minutes, à 1000 rpm, à froid.
5. Eliminer le surnageant.
6. Reprendre le culot dans 10 ml de solution d'homogénéisation .

A partir de cette étape, le protocole est le même que celui suivi pour les extractions de DNA à partir de tissus.

V. EXTRACTION DE DNA PLASMIDIQUE .

Principe : Les extractions sont faites selon le mode de la "maxi-prep", permettant la préparation de grandes quantités de DNA. (1 à 2 mg sont couramment obtenus à partir de 200 ml de culture).

Après croissance et récupération des bactéries, celles-ci sont soumises à une lyse alcaline.(Lyse en présence de SDS , dans une solution à pH élevé). La solution est ensuite neutralisée, permettant une renaturation du DNA plasmidique, mais pas du DNA chromosomal qui précipite sous forme d'un complexe protéines-DNA-SDS. Le DNA plasmidique peut ensuite être récupéré.

Protocole :

1. Inoculer 200 ml de milieu LB auquel on aura ajouté l'antibiotique approprié. Incuber pendant 12 à 16 heures à 37°C en agitant vigoureusement.
2. Centrifuger les bactéries d'une culture à 5.000 rpm pendant 15 minutes à 4°C (rotor HS4). Jeter le surnageant.
3. Resuspendre le culot dans
 - 10 ml de TE additionné de RNAase (1/100, 200 µl RNAase +20 µl TE). Incuber 30 minutes à 37°C.
 - 10 ml de solution NaOH/SDS (0,2M NaOH - 1% SDS). Mélanger délicatement et attendre 5 minutes à température ambiante.
 - 10 ml de solution KAc/HAc (12 ml KAc 5M + 2,3 ml HA+ 5,7 ml H₂O), mélanger le contenu en renversant quelques fois la bouteille Un précipité floconneux blanc apparaît. Ce précipité est constitué de DNA chromosomal, de RNA de haut poids moléculaire et du complexe K/SDS/protéines/membranes.
4. Centrifuger le lysat de bactéries à 6.000 rpm pendant 15 minutes à 4°C dans une Sorvall, rotor HS 4.
5. Filtrer le surnageant à travers 4 couches de gaze dans une bouteille à centrifuger de 250 ml. Ajouter 0,6 volume d'isopropanol, bien mélanger et garder la bouteille pendant 10 minutes à température ambiante.
6. Récupérer les acides nucléiques par centrifugation à 5.000 rpm pendant 15 minutes à température ambiante dans une Sorvall, rotor HS 4 (le sel pourrait précipiter si on centrifugeait à 4°C.)

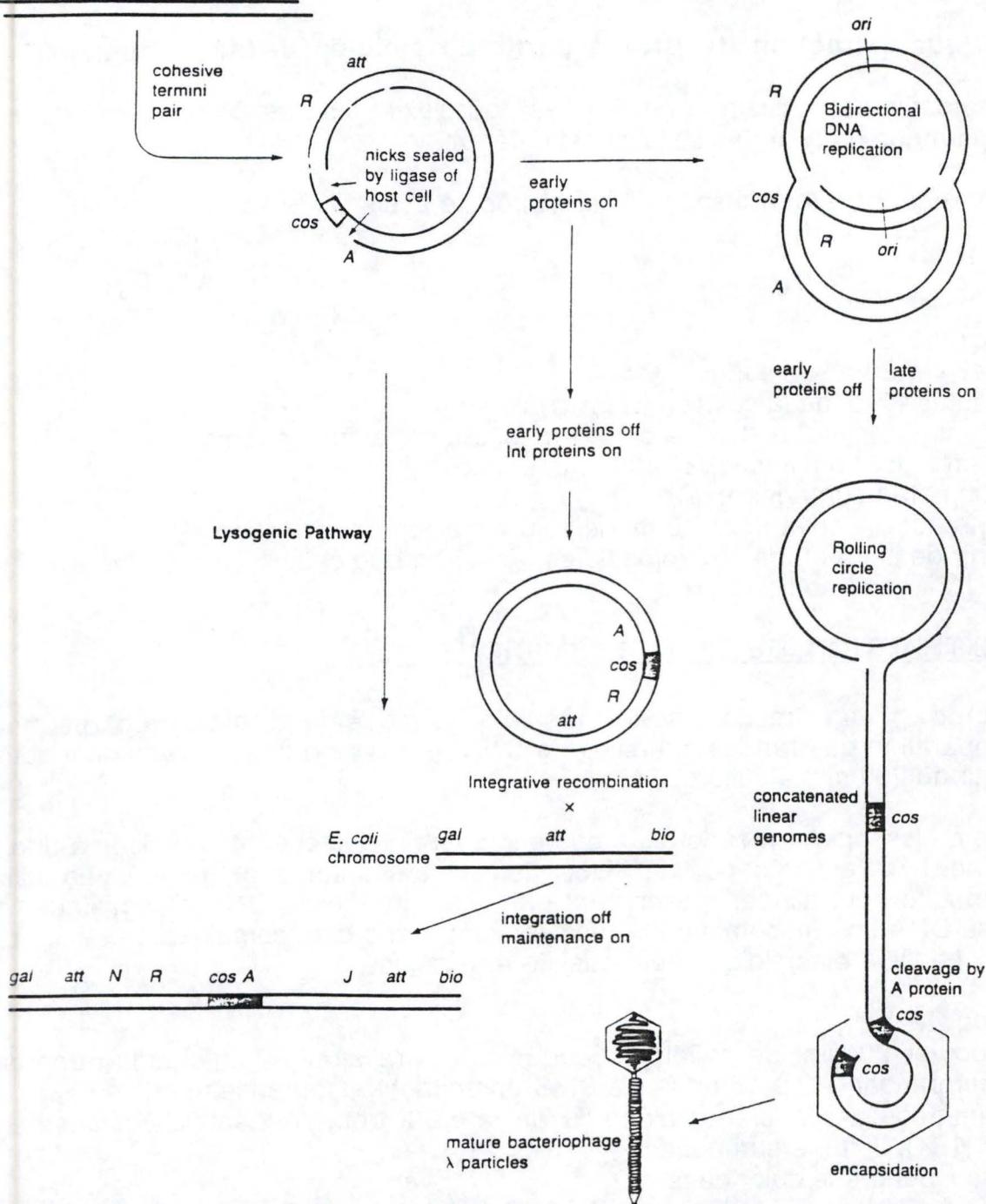


Fig VI.1. Biologie du bactériophage λ . Le génome du bactériophage λ est constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire d'environ 50 Kb. Chaque extrémité est composée d'un segment monocaténaire de 12 bp, complémentaire de l'autre extrémité et formant le site cos (cos pour cohésif). Au cours de l'infection, les phages s'adsorbent sur des récepteurs de la paroi de la bactérie cible. Ces récepteurs sont codés par le gène *lamb* d'*E.Coli*, et interviennent également pour le transport du maltose par la bactérie. Après pénétration dans la cellule cible, le DNA viral se recircule grâce aux extrémités cohésives. Les nicks sont comblés par une DNA ligase de l'hôte.

Le phage λ est un phage tempéré, c'est à dire qu'il peut suivre la voie lytique, conduisant à la destruction de la bactérie hôte, ou lysogénique conduisant à l'intégration du génome viral dans celui de la bactérie.

Après pénétration et circularisation dans la bactérie hôte, les gènes précoce immédiat et ensuite précoce retardé sont transcrits et traduits. L'activation des gènes lates conduit à la synthèse des protéines de la queue, de la tête et des protéines nécessaires à la lyse cellulaire.

La réPLICATION du DNA peut se faire de 2 manières différentes : de manière bidirectionnelle au début de l'infection, et ensuite selon le mode des rolling circles, donnant naissance à de longs concatémères (Génomes complets joints bout à bout, formant une longue molécule linéaire bicaténaire). Pour être encapsidé, le DNA doit contenir au moins 2 sites cos complets dans la même orientation, et séparés de 38 à 52 Kb. Les concatémères provenant de la réPLICATION par rolling circles peuvent être encapsidés directement. Les molécules de DNA provenant d'une réPLICATION bidirectionnelle devront subir une recombinaison homologue pour former des multimères circulaires avant d'être encapsidés.

Pour l'encapsidation, les sites cos droits et gauches sont mis en contact l'un avec l'autre à l'entrée de la tête du phage et sont clivés par la protéine A pour régénérer les extrémités cohésives monocaténaires. Pour terminer, la tête s'associe aux éléments de la queue, assemblés selon une voie séparée. La membrane, ainsi que la paroi bactérienne sont ensuite détruites, permettant la libération des nouvelles particules virales.

7. Décanter soigneusement le surnageant, retourner la bouteille pour éliminer les dernières gouttes. Rincer le culot et les bords de la bouteille avec de l'éthanol à 70% à température ambiante. Sécher le culot sous vide.
8. Reprendre le culot dans 500 µl de NaCl 0,5M dans du TE.
9. Faire un phénol-chloroforme.
 - Ajouter 500 µl de phénol et 500 µl de CIAA, mélanger et centrifuger pendant 3 minutes.
 - Récolter la phase aqueuse, ajouter 2 à 3 volumes d'alcool et placer 30 minutes à -20°C.
 - Centrifuger pendant 15' à 4°C, décanter et sécher le culot sous vide.
 - Resuspendre le culot dans 1 ml TE.
10. Mesurer la densité optique à 260 nm pour évaluer la concentration. 1 DO = 50 µg/ml. Le rapport entre la densité optique à 260 nm et la densité optique à 280 nm doit être aux environs de 2.

VI. TECHNIQUES DE SCREENING DE BANQUES GENOMIQUES: HYBRIDATION SUR PLAQUES ET HYBRIDATION SUR COLONIES.

Une banque génomique consiste en une population de clones(bactéries, phages,...) contenant des fragments représentatifs de l'ensemble du génome. Le terme banque sous-entend donc l'existence d'un très grand nombre de clones différents, parmi lesquels il faudra retrouver(screener) ceux d'intérêt.

Deux types de vecteurs sont en général utilisés pour construire des banques génomiques : bactériophages λ et cosmides.

Les méthodes de screening utilisées dans le cadre de ce mémoire sont basées sur l'hybridation in situ de sondes nucléiques sur des filtres répliques. On parle d'hybridation sur plaques si les répliques sont réalisées à partir de plaques de lyse(pour les bactériophages λ) et d'hybridation sur colonies si les répliques sont réalisées à partir d'une culture bactérienne(pour les cosmides).

VI.1. Screening d'une banque de phages λ spécifique du chromosome 7 humain : hybridation sur plaques.

Le principe de base est le suivant : des plaques de lyse sont réalisées à partir de la banque génomique, formant le matériel de départ ou master plate. Chaque plaque de lyse contient des particules phagiques entières, mais également du DNA libre, qui n'a pas été encapsidé. On réalise ensuite des filtres répliques en plaçant une membrane de nylon sur les plaques originales. Les particules phagiques, ainsi que le DNA libre, vont s'absorber par capillarité sur la membrane. Ce DNA phagique sera ensuite dénaturé en milieu alcalin et fixé in situ de manière covalente. Il pourra par la suite être hybride à une sonde particulière.

Puisque la configuration du DNA sur les filtres répliques correspond à celle des phages sur la master plate, on pourra récupérer les clones de la master plate donnant un signal positif sur les filtres répliques.

VI.1.1. Biologie du bactériophage λ .

Voir figure VI.1.

VI.1.2. Les bactériophages λ comme vecteur de clonage.

De nombreux vecteurs dérivés de λ ont été construits en plaçant les sites de restriction à des endroits appropriés du génome du phage et en introduisant des

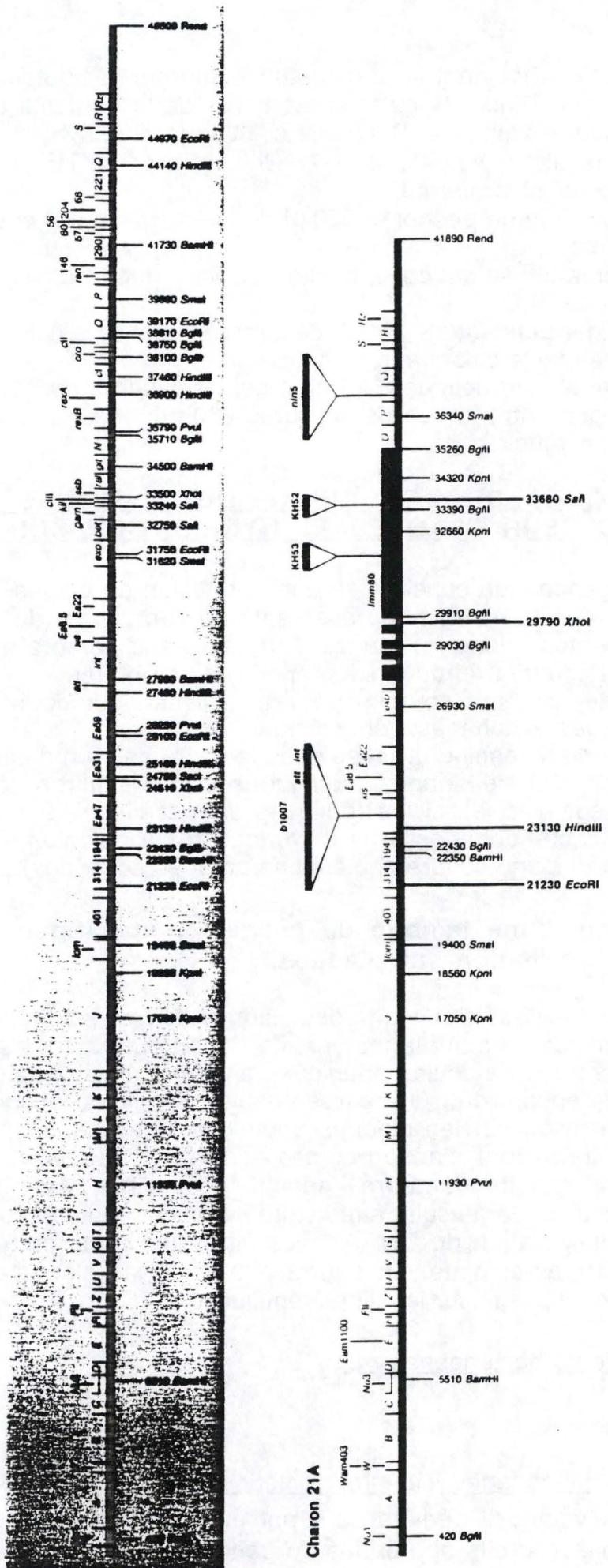


Fig VI.2. Génome du bactériophage λ sauvage (partie supérieure du schéma) et du vecteur Charon A21 (partie inférieure du schéma).

marqueurs de sélection adéquats.

La capacité de clonage des bactériophages λ est fonction de la taille du DNA qui peut être encapsidé. Cette capacité varie entre 38 et 52 Kb , la viabilité des phages décroissant de manière importante lorsque la taille du génome devient <78% ou >105% par rapport à la taille du type sauvage.

Les bactériophages λ peuvent être utilisés soit comme vecteurs d'insertion, soit comme vecteurs de remplacement. Les vecteurs d'insertion possèdent un seul site de clonage dans lequel le fragment d'intérêt(de maximum 10 Kb) peut être introduit. Les vecteurs de remplacement possèdent 2 sites bordant une région non essentielle pour la survie du phage, appelée "stuffer". Cette région représente le tiers central du génome du phage, et peut être éliminée et remplacée par du DNA exogène(de maximum 20Kb).

La sélection des phages recombinants peut se faire selon 2 principes :

- soit en utilisant le fait que seul des génomes de taille adéquate pourront être encapsidés(donc obligation d'avoir incorporé un insert pour les vecteurs de remplacement)
- soit en utilisant des marqueurs génétiques.

VI.1.3. Construction et description de la banque spécifique du chromosome 7 humain dans CharonA21.

A. Le vecteur CharonA21 (fig. VI.2.).

Le vecteur CharonA21 est un dérivé de λ utilisé pour construire de nombreuses librairies chromosomiques. Il est principalement utilisé comme vecteur d'insertion et permet de cloner des fragments de maximum 9 KB.

La souche hôte doit porter les gènes supE ou supF , les gènes W et E du phage étant porteurs de mutations amber.

Après digestion par HindIII, on obtient 2 bras de 23.1 et 18.8 Kb.

B. Construction de la banque.

Du DNA correspondant au chromosome 7 humain a été isolé à partir d'une lignée cellulaire hybride homme-hamster(lignée lymphoblastique GM131). Le DNA purifié a alors été digéré complètement par HindIII. Une ligation a été réalisée avec les bras du vecteur charon A21 déphosphorylé, et les molécules recombinantes ont été encapsidées in vitro pour reformer des particules virales complètes.

Ces particules ont ensuite été utilisées pour infecter, sur boîte d'agar, la souche LE 392 d'E.Coli. Les plaques de lyse ont été élues et les débris cellulaires éliminés par centrifugation. Le surnageant, environ 300 ml, contenait de l'ordre de 10^{11} particules recombinantes et a constitué la librairie finale.(Librairie LL0 NS01, disponible à l'ATCC).

Les inserts ont une taille moyenne de 4.0Kb.

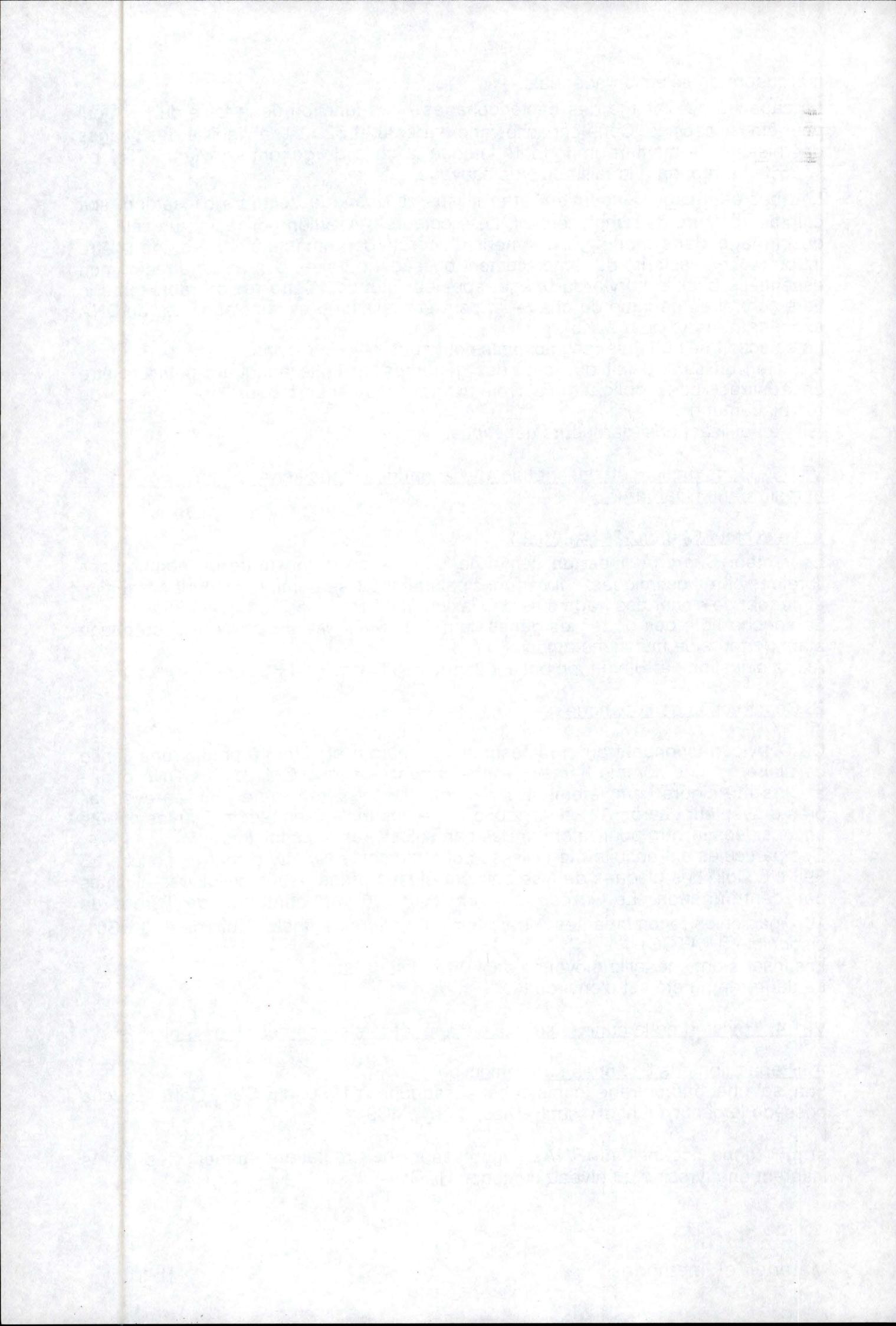
Le degré de pureté est d'environ 88%.

VI.1.4. Transfert de la banque sur boîte d'agar et réalisation des filtres répliques.

A. Préparation des bactéries pour l'infection.

La souche bactérienne choisie est la souche Y1090 d'E.Coli. Cette souche possède le génotype hsdR, supF, Dlac, Dlon, pMC9

supF : gène codant des tRNAs suppresseurs des mutations amber. Ces tRNAs insèrent une tyrosine au niveau du codon UAG.



hsdR : gène codant pour une sous unité de l'enzyme de restriction EcoK. Les souches hsdR méthylent le DNA mais ne le coupent pas .

lon : Gène codant pour une protéase ATP-dépendante.

pMC9 : plasmide contenant le gène lacI^q.

Préparation de la souche bactérienne :

1. Inoculer 200 ml de LB+0.2% maltose avec une colonie isolée d'E.Coli dans un flacon stérile de 1 litre.(Le maltose induit le gène lamB, codant pour le récepteur du bactériophage λ . Ce récepteur intervient également pour le transport du maltose par la bactérie.)
2. Incuber une nuit à 37°C sous agitation modérée (250 rpm/minute).
3. Le lendemain, centrifuger les cellules à 4000g pendant 10 minutes à température ambiante.
4. Décanter le surnageant et resuspendre le culot dans une solution de MgSO₄ 0.01M(l'adsorption du phage sur la bactérie est facilitée par la présence d'ions magnésium). Pour obtenir de bons résultats, les cellules resuspendues doivent avoir une DO légèrement supérieure à 2 après lecture à 600 nm.
5. Conserver la suspension à 4°C. Les cellules conservent leur viabilité pendant au moins 3 semaines, même si il est préférable d'utiliser des cellules fraîches.

B. Transfert de la banque de Charon A21 sur boîte d'agar : réalisation de plaques de lyse.

Une plaque de lyse provient de l'infection d'une bactérie par une particule virale unique. Cette première bactérie infectée "contamine" ses voisines. Si la culture se fait en milieu semi-solide, tel qu'un milieu à base d'agar, la diffusion des particules phagiques est limitée, et la plaque de lyse se présente comme un cercle translucide dans l'agar, là où les bactéries ont été lysées. Une plaque de lyse contient de 10⁶ à 10⁷ particules phagiques.

Protocole :

1. Préparer dans du SM des dilutions de 10 en 10 du stocks de bactériophages.
2. Pour des boîtes de pétri de 15 cm de diamètre, déposer un ml de chaque dilution dans des tubes en propylènes stériles.
3. Ajouter un volume égal des cellules bactériennes préparées comme ci-dessus.
Remarque : les quantités de phages à déposer sont à adapter en fonction du titre du matériel utilisé .
4. Agiter légèrement et incuber 20 minutes à 37°C pour permettre l'absorption des phages sur les bactéries.
5. Prendre 400 µl de chaque dilution(ou un autre volume adéquat), et ajouter au premier tube 10 ml de top agar, préalablement liquéfié au four à micro-ondes, et préincubé à 55°C.
6. Agiter légèrement et immédiatement verser le contenu du tube sur une boîte LB. Bouger la boîte pour étendre le top agar, en évitant de créer des bulles.
Répéter les mêmes opérations sur de nouvelles boîtes LB avec les autres dilutions. Les boîtes LB doivent être bien sèches et réchauffées 2 heures à température ambiante avant utilisation.
7. Laisser durcir environ 5 minutes à température ambiante et incuber les boîtes, inversées, une nuit à 37°C.
8. Conserver à 4°C en position inversée.

C. Transfert des particules virales sur membrane de nylon en vue de l'hybridation sur plaques.

Protocole :

Remarque : 1. ne pas réaliser les répliques sur des plaques de lyse fraîches; le top agar risquerait de peler. Il est préférable de laisser les plaques quelques heures à 4°C pour permettre au top agar de durcir.

2. Tout le matériel utilisé doit être stérile.

1. Par réplique, déposer un disque de papier Whatman dans 2 boîtes de pétri, et saturer chaque disque soit avec la solution de dénaturation, soit avec la solution de neutralisation.

Solution de dénaturation : NaOH 0.2N

NaCL 1.5M

Solution de neutralisation : Tris, pH 7.6, 0.4M

SSC 2X

2. Marquer une membrane de nylon de manière asymétrique, par exemple au crayon, pour permettre l'orientation ultérieure de la membrane par rapport à la master plate.

3. Déposer délicatement la membrane sur la master plate. Une fois en contact avec le top agar , le filtre s'humidifie et le transfert s'effectue rapidement. Il ne faut donc plus bouger la membrane une fois qu'elle est entrée en contact avec les plaques de lyse.

Ne pas oublier de tracer sur la boîte des remarques complémentaires à celles du filtre.

4. Après une minute, retirer délicatement la membrane à l'aide des pinces stériles , et la laisser sécher 10 minutes à température ambiante, les phages vers le haut.

5. Transférer la membrane sur la solution de dénaturation, toujours phages vers le haut, et laisser agir 10 minutes.

6. Transférer sur la solution de neutralisation et laisser agir 5 minutes.

7. Rincer la membrane dans une solution de SSC 2X, la laisser sécher à température ambiante, et terminer le séchage en plaçant la membrane à l'étuve, entre 2 feuilles de papier Whatman.

8. Conserver à 4°C, jusqu'au moment de l'hybridation.

Plusieurs filtres répliques peuvent être réalisés à partir de la même master plate. Il suffit d'augmenter légèrement le temps de contact de la membrane avec les plaques de lyse pour chaque nouvelle réplique.(Par exemple, 1', 1'30", 2',...).

9. Hybridation des répliques avec une sonde appropriée : voir paragraphe VIII.

10. Récupération des clones positifs :

Préparer une solution de SM+chloroforme (1 goutte par ml de SM).

A l'aide d'une micropipette munie d'un tips à extrémité coupée, prélever la plaque intéressante ainsi que l'agar sous-jacent. Placer la plaque dans un tube eppendorf contenant 500 µl de la solution de SM . Conserver à 4°C.

VI.2. SCREENING D'UNE BANQUE DE COSMIDES SPECIFIQUE DU CHROMOSOME 7 HUMAIN.

Les principes de base sont toujours les mêmes : après la culture originale, sur filtre dans le cas des cosmides, les clones sont transférés sur des filtres répliques. Ces filtres seront alors hybridés avec une sonde particulière afin de repérer et d'isoler les clones intéressants.

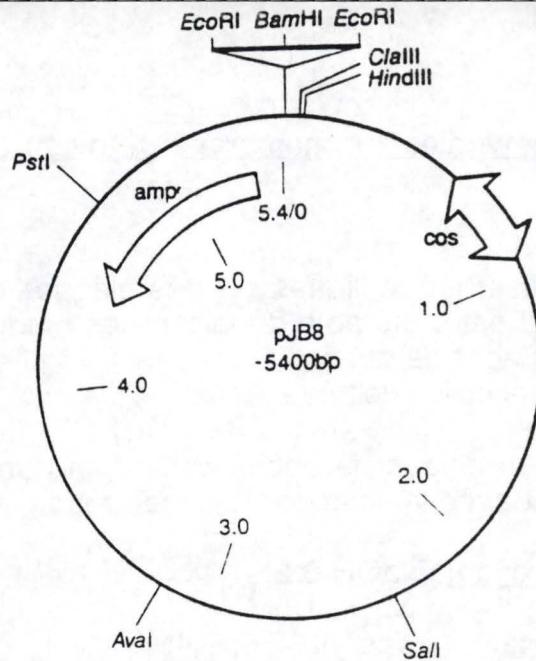


Fig. VI.3. Exemple de cosmide. Le cosmide pJB8 contient un site cos, un marqueur de résistance à l'ampicilline, une origine de réplication et différents sites de clonage.

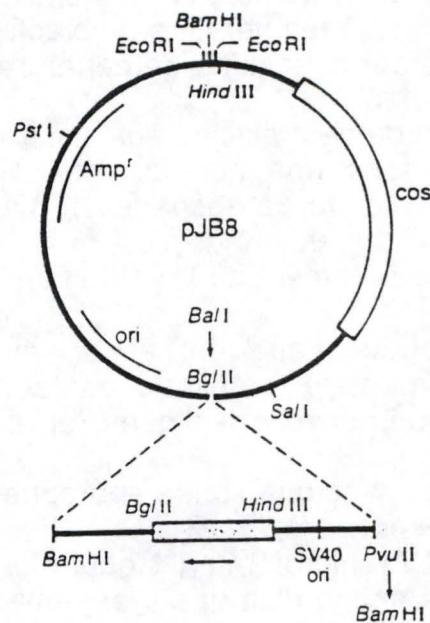


Fig VI.4. Le cosmide pCV108 a été construit par insertion du gène de résistance à la néomycine au niveau du site Bal I du cosmide pJB8.

VI.2.1. Les cosmides : des vecteur possédant à la fois des caractéristiques de plasmides et de bactériophages.

Les cosmides ont été développés, fin des années 70 ,dans le but de cloner des fragments d'ADN de taille relativement importante , et ce en comparaison des possibilités de clonage des vecteurs classiques(plasmides et bactériophages).

Les cosmides sont des plasmides modifiés dans lesquels les sites *cos* du phage lambda ont été insérés (fig. VI.3.). Grâce à l'existence de ces sites ,l'ADN du plasmide ainsi modifié peut être encapsidé *in vitro* dans la tête du phage lambda . Par la suite, le cosmid peut être introduit dans un hôte bactérien , en réalisant une infection identique à celle se déroulant lors d'une attaque par un véritable bactériophage. Ceci permet d'introduire du DNA exogène de manière très efficace dans un hôte bactérien.

Les cosmides possèdent également une origine de réPLICATION pour l'hôte(par exemple E.Coli) ,et un marqueur de résistance à un antibiotique(le plus souvent à l'ampicilline). Une fois introduits dans la bactérie hôte, les cosmides se circularisent grâce aux extrémités *cos*, et peuvent se propager et être manipulés comme de véritables plasmides .

VI.2.2. Clonage dans des vecteurs de type cosmid.

La capacité de clonage des cosmides est fonction de :

1. la taille du DNA que peut recevoir la tête du bactériophage .
2. la taille du vecteur qui va recevoir l'insert.

La tête du bactériophage lambda a une capacité minimale de 38 Kb et maximale de 52 Kb. Les vecteurs utilisés ayant une taille de plus ou moins 5 Kb, les tailles minimales et maximales des fragments d'ADN que l'on pourra cloner dans des vecteurs de type cosmid seront respectivement de 33 et 47 Kb.

Les banques de cosmides peuvent être conservées sous la forme d'une population bactérienne ou d'un stock de bactériophages.

VI.2.3. Construction et description de la banque de cosmides spécifique du chromosome 7 humain.(Melmer et al. 1990).

Il s'agit d'une banque développée dans le vecteur cosmidique pCV108.

Ce cosmid a été construit en insérant des marqueurs de résistance eucaryotiques dans un cosmid de base : pJB8.

Ce vecteur de base contient un marqueur de résistance à l'ampicilline, une origine de réPLICATION pour E.Coli, et 4 sites de restriction (BamHI, EcoRI, Clal, HindIII) qui peuvent être utilisés pour le clonage (fig. VI.4.).

Le cosmid pJB8 a une taille de 5.4 Kb et peut donc accepter des inserts de 33 à 47 Kb.

Pour construire le cosmid pCV108, un gène de résistance à la néomycine, ainsi qu'une origine de réPLICATION pour SV-40 ont été introduit au niveau du site Ball de pJB8.

De l'ADN de haut poids moléculaire a été préparé à partir de cellules hybrides hamster-homme contenant comme seule source d'ADN humain le chromosome 7. Ce DNA a été partiellement digéré par Sau3A dans des conditions permettant l'obtention de fragments de 35 à 45 Kb. Une ligation (par la T4 DNA ligase), fut réalisée en utilisant ce DNA et le vecteur pCV108 digéré par BamHI(compatible avec Sau3A) et déphosphorylé. La ligation a été réalisée dans des conditions permettant la formation de concatémères, condition nécessaire à l'encapsidation.

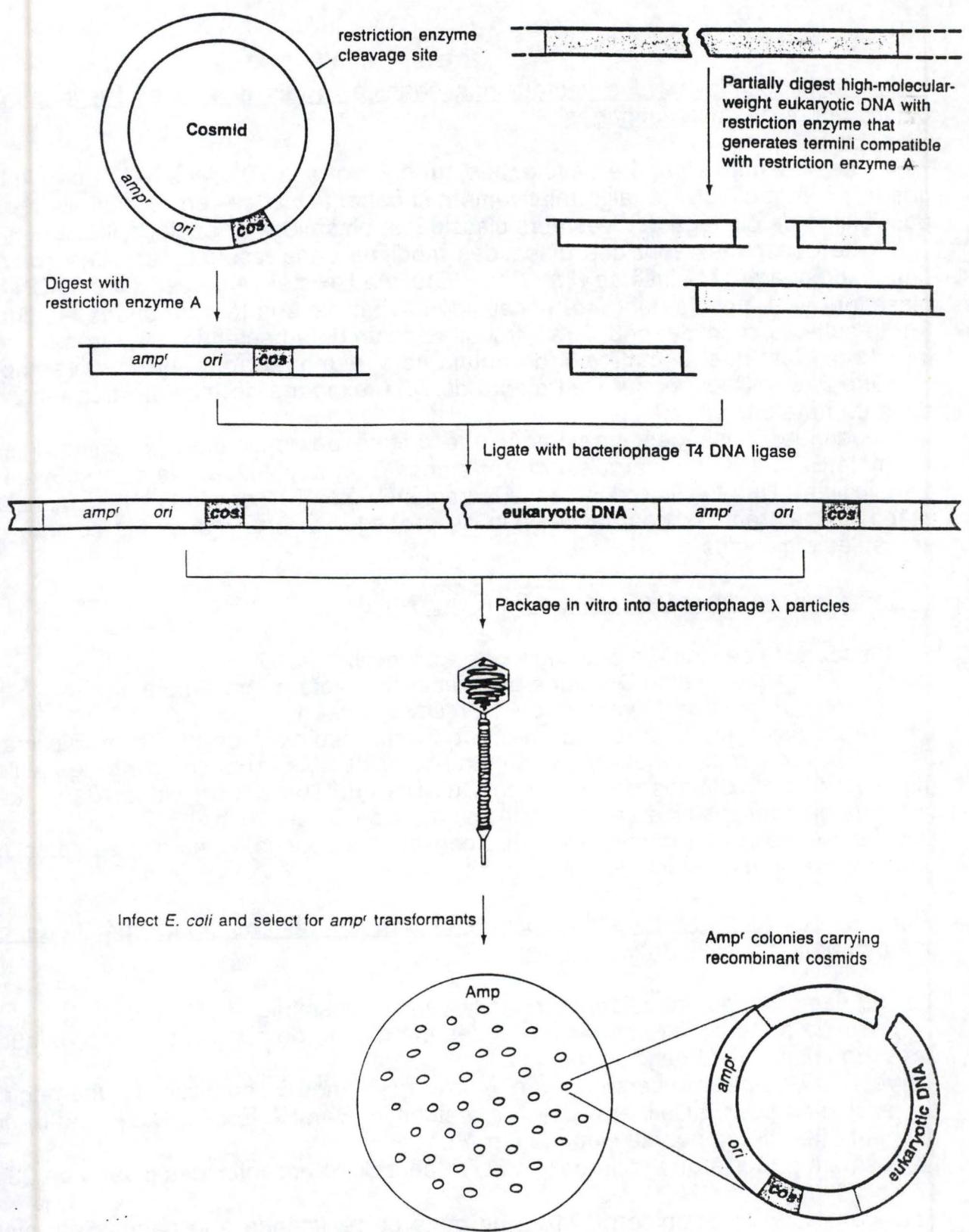


Fig VI.5. Clonage dans un vecteur de type cosmide .

Après ligation, une encapsidation in vitro a été réalisée. Les particules virales ainsi reconstituées ont alors servi à infecter la souche DK-1 d'E.Coli . Une fois introduit dans la bactérie, le cosmid se comporte comme un plasmide, et confère la résistance à l'ampicilline à l'hôte. Ceci permet la sélection des bactéries ayant incorporé un cosmid recombinant.(Principe du clonage : voir fig.VI.5).

Plus de 3 millions de clones recombinants indépendants ont été obtenus. La librairie a été transférée sur filtre, incubée 12 heures à 37°C. Les colonies ont ensuite été lavées avec un milieu LB + ampicilline . Des aliquots sont conservés à - 70°C en présence de 15 % de glycérol, constituant ainsi la librairie.

VI.2.4. Transfert d'une librairie de cosmid sur filtre et réalisation de répliques.

Principe : une dilution de la librairie est aspirée au travers d'une membrane poreuse, de telle sorte que les bactéries se déposent sur cette membrane.

La membrane est ensuite transférée, bactéries vers le haut, sur un milieu nutritif pour permettre la croissance des colonies. Cette membrane servira de base pour la réalisation de répliques qui pourront, par exemple, être utilisées pour hybridation.

Protocoles :

A. Transfert de la librairie sur le filtre original : réalisation de la master plate.

Tout le matériel utilisé doit être stérile.

1. Déterminer le titre de la librairie de cosmides. Pour cela, réaliser des dilutions, par exemple de 10 en 10 , dans un milieu LB . Etendre un aliquot de chaque dilution sur des boites LB + antibiotique et incuber un nuit à 37 °C.
2. Préparer dans 5 ml(filtre de 10 cm) ou dans 15 ml de LB(pour des filtres de 15 cm de diamètre), une dilution contenant une quantité adéquate de bactéries à étendre. Une dilution contenant 30 000 bactéries semble adéquate pour étendre sur une filtre de 15 cm de diamètre (15 000 pour un filtre de 10 cm).
3. Déposer sur un buchner 3 ou 4 disques de papier Whatman (le tout stérile). Saturer le papier avec 10 à 20 ml de LB.
4. Marquer une membrane de nylon (par exemple au crayon), et déposer cette membrane sur une boite LB + antibiotique , afin de permettre une bonne humidification du filtre.
5. Après humidification, placer ce filtre sur le montage buchner + papier Whatman saturé de LB .

Attention , tout le montage doit être parfaitement nivelé de manière à permettre un dépôt homogène des bactéries sur le filtre.

6. Déposer sur le montage les 5 ou 10 ml de la dilution contenant la librairie de cosmides. Laisser un bord libre de 4 ou 5 mm de manière à pouvoir manipuler le filtre par la suite .

Appliquer une légère aspiration jusqu'à écoulement total du liquide au travers du buchner. Vérifier que le passage au travers du filtre et que la répartition des bactéries se fait de manière bien homogène.

Remarque : on peut également laisser s'écouler le liquide par simple gravité et s'assurer d'un écoulement homogène à l'aide d'un râteau en verre .

7. Retirer le filtre du montage et le placer , bactéries vers le haut, sur la boite qui a servi à l'humidification.

8. Incuber la boite, le filtre placé vers le bas, une nuit à 37°C. (Laisser croître les colonies jusqu'à une taille d'environ 1 mm de diamètre.)

Conserver la master plate à 4°C jusqu'à réalisation des filtres répliques.

B . Préparation des filtres répliques à partir de la master plate.

- 1 . Marquer une nouvelle membrane de nylon et l'humidifier sur une boite LB + antibiotique.
2. Prélever le filtre de la master plate et le placer délicatement , bactéries vers le haut, sur 3 ou 4 feuilles de papier Whatman.
3. Placer le nouveau filtre humidifié sur le filtre original, en décalant légèrement les 2 membranes.(Ceci permet de pouvoir séparer les 2 filtres plus facilement par la suite .)
4. Placer quelques feuilles de papier Whatman sur les filtres , et couvrir le tout de la plaque de verre . A l'aide de la paume des mains, appuyer sur la plaque de verre de manière à assurer le transfert des bactéries depuis le filtre de la master plate sur le filtre réplique .
5. Retirer la plaque de verre ainsi que les feuilles de papier Whatman couvrant les filtres. A l'aide de l'aiguille, percer les 2 filtres de manière à établir des repères pour orienter les 2 membranes par la suite et pouvoir retrouver les clones intéressants . (Plus simplement, on peut tracer des repères au crayon sur les filtres).
6. Séparer les 2 membranes avec précaution et les placer, bactéries vers le haut, sur leur boite LB + antibiotique respective.
7. Incuber les colonies une nuit à 37°C, en s'assurant que les clones de la master plate n'atteignent pas une taille trop importante si d'autres répliques doivent être réalisées. Conserver les boites à 4°C jusqu'à leur utilisation.

De nombreuses répliques peuvent être réalisée à partir de la master plate originale, si l'on permet une nouvelle croissance des colonies entre chaque réplique.

C. Préparation des filtres répliques pour l'hybridation.

1. Placer le filtre réplique sur du papier Whatman saturé avec une solution de NaOH 0,5 M, pendant 5 minutes.
2. Transférer sur du papier Whatman saturé avec une solution 1 M de Tris- HCl pH 7.5 et laisser neutraliser pendant 5 minutes.
3. Transférer sur du papier Whatman saturé avec une solution 0,5 M de Tris -HCl, pH 7.5 / 1.25 M NaCl. Laisser agir 5 minutes.
4. Transférer le filtre entre 2 feuilles de papier Whatman, sécher environ 30 minutes à l'étuve et conserver à 4°C jusqu'à utilisation.
5. Hybridation des filtres avec une sonde particulière : voir paragraphe VIII.
6. Récupération des clones positifs :

Prélever les clones intéressants et les incuber une nuit à 37°C dans 3 ml de LB+ampicilline.

Préparer une solution de 0.15 volume glycérol, 0.85 volume LB. Stériliser cette solution par passage sur filtre millipore.

Pour chaque clone, placer dans un tube eppendorf : 500 µl de culture + 500 µl de solution LB.

Congeler à - 20°C.

VII. SOUTHERN BLOTTING ALCALIN.

Les techniques de southern permettent de localiser des séquences particulières sur du DNA génomique, conduisant par exemple à la mise en évidence d'un polymorphisme de restriction. Pour cela ,du DNA génomique est digéré avec un ou plusieurs enzymes de restriction , et les fragments qui résultent de cette digestion sont séparés sur un gel d'agarose. Le DNA est alors dénaturé in situ, et transféré sur un support solide (membrane de nitrocellulose ou de nylon) à partir du gel d'agarose.La position des fragments de DNA est conservée au cours du transfert sur membrane. Le DNA fixé sur la membrane peut ensuite être hybridé à une sonde particulière(Voir chapitre concernant les techniques d'hybridation). Après autoradiographie, on peut localiser la position des bandes complémentaires de la sonde.

VII.1. Séparation des fragments de restriction de DNA génomique par électrophorèse sur gel d'agarose.

1. Digérer une quantité appropriée de DNA génomique. Pour 2 minigels, 10 µg de DNA sont suffisants. Utiliser l'enzyme à une concentration de 1 U/µg de DNA et digérer environ 3 heures à température adéquate (en général 37°C).(On s'arrange pour que le volume de la digestion soit de 20 µl).
2. Après digestion, ajouter 4 µl de bleu et déposer 12 µl du produit de digestion par puits de 15 µl, sur un gel d'agarose 0.8%, TBE 1X contenant du bromure d'éthidium(0.3 µg/ml). Ne pas oublier de déposer un marqueur de taille, par exemple λ coupé par HindIII.
3. Laisser migrer 2 heures à 80 mV.
4. Lorsque l'électrophorèse est terminée, photographier le gel si nécessaire.

VII.2. Transfert du DNA sur membrane de nylon : Southern blotting alcalin.

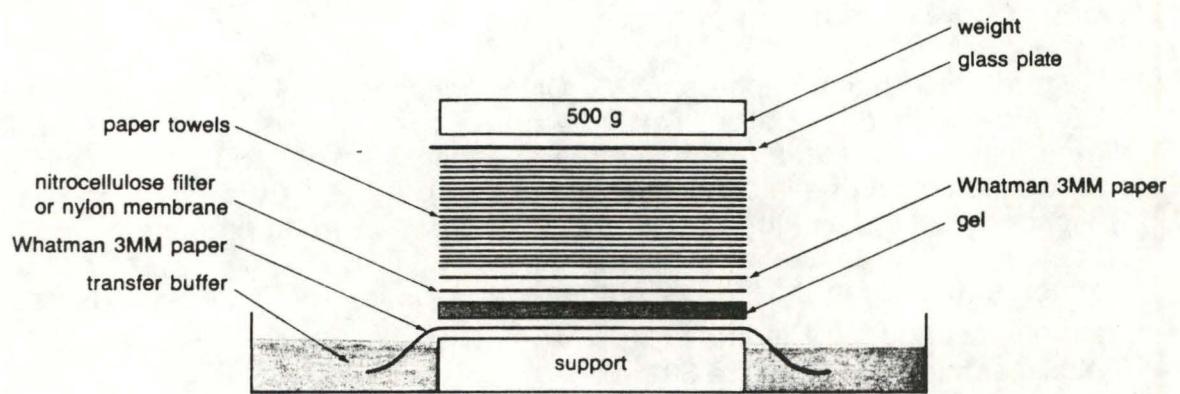
Principe : Il s'agit d'un transfert par capillarité, les fragments de DNA étant transportés depuis le gel jusqu'à la membrane par un flux de liquide.

Ce phénomène de capillarité est assuré par le dépôt, sur le gel, d'un montage de papiers secs .

Avant le transfert, le gel est traité par une solution d'acide faible (HCl dilué) conduisant à une dépurination partielle. Le transfert se fait ensuite en milieu alcalin conduisant à l'hydrolyse des liens phosphodiesters au niveau des sites de dépurination. Les fragments de DNA, ayant alors une taille d'environ 1 Kb, sont transférés rapidement et efficacement vers la membrane. Le transfert en milieu alcalin permet une liaison covalente du DNA sur le support. De plus, le milieu alcalin assure que tout le DNA est parfaitement dénaturé lorsqu'il se fixe sur la membrane, donnant ainsi une quantité maximale de DNA disponible pour l'hybridation.

Protocole :

1. Découper la zone intéressante du gel, couper un coin pour l'orientation ultérieure du gel, et mesurer le gel.
2. Découper 10 papiers Whatman 3MM aux dimensions du gel.
3. Découper 3 papiers Whatman de même largeur que le gel, mais plus longs, pour faire le pont lors du transfert.
4. Découper une membrane de nylon (Hybond-N+, Amersham) de même dimension que le gel, avec le repère.
5. Traiter le gel avec 2 ou 3 volumes de HCl 0.25M, pendant environ 10 minutes.(Jusqu'à ce que le bleu devienne jaune).



FigVII.1. Réalisation du montage pour transfert par Southern blotting alcalin.

6. Mettre en place la boite de transfert comme représenté ci contre (fig. VII.1.). Placer les papiers Whatman longs et bien saturer le tout en NaOH 0.4 N. Chasser toutes les bulles.
7. Placer le gel sur le papier Whatman , en évitant les bulles. Le couvrir largement de NaOH 0.4N.
8. Saturer la membrane avec le NaOH 0.4N, la placer sur le gel en chassant les bulles .
9. Placer 2 papiers Whatman aux dimensions du gel, saturés en NaOH 0.4 N, sur le gel, toujours en évitant les bulles.
10. Placer les 8 autres papiers secs sur le tout.
11. Mettre un paquet complet de Kleenex coupés aux dimensions du gel, sur le montage, en vérifiant qu'aucun papier ne touche la solution de NaOH.
Il faut absolument éviter qu'un court-circuit ne se crée entre la solution de transfert et les papiers.
12. Mettre un couvercle et un poids de 500 g sur le montage pour faciliter le contact du gel avec la membrane.
13. Le transfert est généralement complet après 2 heures. Par sécurité, vérifier aux UV que le gel ne contient plus de DNA.
14. Rincer la membrane dans du SSC 2X.
15. Sécher la membrane à l'étuve entre 2 feuilles de papier Whatman et la stocker ensuite à 4°C, entre le papier Whatman, dans un sac multigrip.

VIII. TECHNIQUES D'HYBRIDATION A L'AIDE DE SONDES RADIOACTIVES.

Les protocoles d'hybridation décrits ci-dessous sont utilisés aussi bien dans le cas de marquage de southern, que dans le cas de marquage des filtres répliques pour les techniques d'hybridation sur colonies ou sur plaques.

VIII.1. Principe

Les filtres,sont hybridés avec une sonde radioactive. L'excès de sonde, ainsi que les sondes mal appariées, sont éliminés par lavage des membranes dans des conditions appropriées.

Les membranes sont alors autoradiographiées afin de mettre en évidence les résultats du marquage .

VIII.2. Aspects théoriques .

Toutes les méthodes d'hybridation font appel à la capacité du DNA dénaturé de se réassocier à une séquence complémentaire , lorsque les conditions de température sont telles que l'on se trouve en dessous de la valeur de Tm .

Les réactions d'hybridation peuvent se réaliser en solution ou sur filtre. Les expériences réalisées ici font appel aux techniques d'hybridation sur filtre.

Cette technique met en jeu du DNA fixé et dénaturé sur une membrane (southern ou filtre réplique), et une sonde simple brin marquée radioactive.

Au cours de l'hybridation de la sonde avec l'ADN fixé sur la membrane, différents types de réaction peuvent se produire :

1. Hybridation correcte de la sonde avec la séquence cible fixée sur la membrane.
2. Mauvais appariement (mismatch) de la sonde avec des séquences proches de la séquence cible.
3. Fixation non spécifique de la sonde sur la membrane de

nylon donnant lieu à du bruit de fond(background).

Les conditions d'hybridation devront être telles que seul le premier type de signal se manifeste. Ceci peut être contrôlé en jouant sur les conditions d'hybridation elles-mêmes, ou sur les conditions des lavages qui sont réalisés après l'hybridation.

Pour pouvoir adapter les conditions de réaction, il est important de connaître les paramètres influençant le mécanisme de l'hybridation.

Deux facteurs sont déterminants :

1. La température à laquelle l'hybridation est réalisée.

2. La force ionique du milieu dans lequel l'hybridation est réalisée.

Ces deux facteurs influencent la stabilité des hybrides formés et déterminent ainsi la "stringence" de la réaction. Des conditions de "stringence" élevées sont des conditions telles que des brins parfaitement complémentaires resteront appariés, les brins complémentaires de manière imparfaite se dissociant soit parce que la température est trop élevée, soit parce que la force ionique du milieu est trop faible. Ces conditions sont résumées par l'équation suivante :

$$T_m = 81.5 \text{ } ^\circ\text{C} + 16.6 \log (\text{Na}^+) + 0.41 (\% \text{ G+C}) - 500/\text{L}$$

T_m : Température à laquelle 50 % des duplex sont dissociés sous forme monocaténaire.

L : Longueur de l'hybride.

De cette équation ,il ressort que :

1. La valeur du T_m dépend de la proportion de base G+C, avec une augmentation de 4°C pour une élévation de 1 % en G+C. Ainsi, pour un génome de mammifère contenant en moyenne 42 % de G+C, la valeur du T_m est d'environ 90°C dans des conditions normales.

2. La force ionique a un effet important sur la valeur du T_m : cette valeur augmente de 16.6°C si l'on multiplie les conditions de salinité par 10.

4. Plus la sonde utilisée est longue, plus le duplex formé est stable.

Il est également évident que plus le degrés d'homologie entre les 2 brins qui vont former le duplex est élevé, c'est à dire plus le nombre de ponts hydrogène qui se forment entre chaque brin pour stabiliser la double hélice est élevé, plus la valeur de T_m est importante.

(Le T_m diminue de 1.5°C pour une diminution de 1% dans le degré d'homologie entre les 2 brins).

Connaissant les facteurs influençant la stabilité des hybrides formés, on peut alors déterminer des conditions expérimentales telles que seuls les hybrides sondé-séquence d'ADN cible subsistent, les autres hybrides étant dissociés .

En pratique, on réalise l'hybridation dans des conditions de stringence assez douces. Ces conditions de stringence sont alors modifiées au cours des lavages réalisés après l'hybridation. Au cours de chaque lavage successif, des conditions de stringence de plus en plus fortes sont appliquées, soit en diminuant la concentration saline entre chaque étape, soit en modifiant la température.

VIII.3. Préparation des sondes radioactives : Multiprime DNA labelling system.

Principe : une mixture contenant un mélange d'hexanucléotides synthétisés au hasard est mise en présence du DNA à marquer dénaturé.

Cette mixture contient toutes les séquences possibles, permettant ainsi une

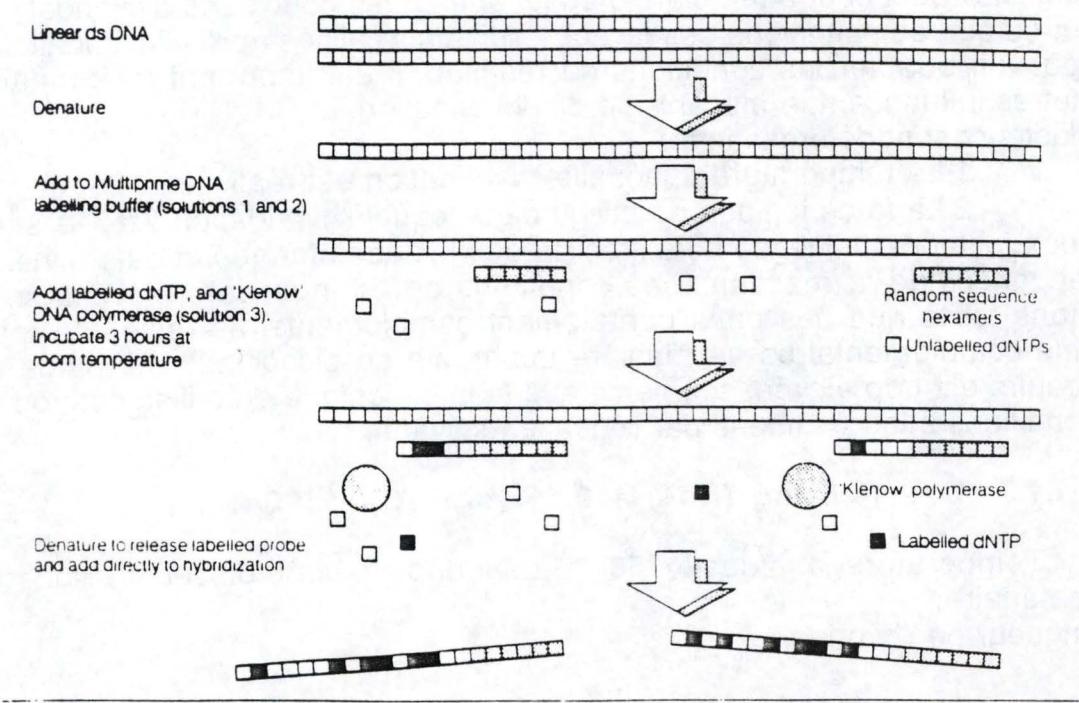


Fig.VIII.1.Préparation de sondes radioactives par le Multiprime DNA labelling system.

hybridation des primers tout le long du brin template , en fonction de leur séquence. Un brin complémentaire est synthétisé par le fragment Klenow de la DNA polymérase d'E.Coli, à partir de l'extrémité 3'OH libre des primers hybridés à une séquence complémentaire du template (fig. VIII.1.).

Cette synthèse est réalisée en utilisant un dNTP marqué α -[P-32] dCTP et les 3 autres dNTPs non marqués.

Les sondes ainsi obtenues ont des activités spécifiques très importantes.(C'est à dire que la quantité d'éléments radioactifs incorporés au cours de la réaction / μ g de DNA synthétisé est élevée).

La longueur de la sonde obtenue est fonction de :

1. la concentration en dNTPs
2. la quantité d'ADN template
3. l'isotope choisi.

Matériel :

Tous les éléments nécessaires au marquage se trouvent dans le kit commercialisé par Amersham(RPN 1601).

L'isotope est du α -[P-32] dCTP (3000Ci/mmol fournit par Amersham).

Protocole :

1. Dans un tube Ependorf placé sur la glace, ajouter dans l'ordre :

1. De 25 à 40 ng du DNA en solution dans du TE ou de l'eau . Le DNA doit être dénaturé par incubation 3 minutes dans un bain d'eau bouillante. Après dénaturation, placer immédiatement sur glace pour empêcher la renaturation.
2. 3 μ l du mélange de dNTPs non marqués.(1 μ l de chaque).
3. 2 μ l de primer.
4. Un volume adéquat d'eau pour arriver, après ajoute de tous les éléments, à un volume final de 20 μ l.
5. 1 μ l d'enzyme sorti au moment même.

2. Passer un bref instant dans la minifuge pour déposer tous les éléments dans le fond du tube.

3. Derrière un écran de plexiglass, ajouter 5 μ l de dCTP*.

4. Laisser incuber la réaction de 3 à 5 heures à température ambiante.

5. Eliminer les nucléotides non incorporés par passage sur colonne.(Spin colonne). Pour cela :

1. Placer dans un tube falcon de 15 ml tube eppendorf dont on a coupé le bouchon.
2. Déposer dans cet eppendorf une seringue de 1 ml , sans le piston, et boucher l'extrémité inférieure de la seringue au moyen d'ouate de verre stérile et siliconée.
3. Remplir la seringue de résine A54(A54, IBF n° 230181). Cette résine est préparée en solution dans du STE (Tris 10 mM pH8-EDTA 1 mM-NaCl 0.1 M), avec ajouté d'une pointe de spatule d'azide.
4. Centrifuger 5 minutes à 1200 rpm.
5. Recommencer la même opération de manière à remplir la colonne jusqu'à environ 0.9 ml.
6. Jeter le tube eppendorf et le remplacer par un nouveau tube propre marqué au nom de la sonde que l'on désire récupérer.
7. Déposer la sonde à la surface de la résine. Ajouter 30 μ l de TE de manière à avoir un volume de 50 μ l.
8. Centrifuger dans les mêmes conditions que précédemment pour récupérer la sonde.

Après centrifugation, vérifier que l'activité est plus importante pour la sonde

récupérée que pour la colonne. Si ce n'est pas le cas, redéposer 50 µl de TE sur la colonne et recentrifuger, toujours dans les mêmes conditions.

VIII.4. Préhybridation des membranes.

Cette étape a pour but d'éviter l'absorption non spécifique de la sonde sur la membrane. Pour cela, la membrane est bloquée, c'est à dire qu'elle est saturée de manière à empêcher la fixation de l'ADN sur les sites d'adhésion non spécifiques. Une solution efficace et bon marché est composée de poudre de lait écrémé : BLOTTO (Bovine Lacto Transfert Technique Optimizer) dont les protéines vont saturer la membrane de nylon et ainsi empêcher la fixation du DNA sur des endroits non spécifiques. Cet agent bloquant est en général utilisé en conjonction avec du DNA non-homologue fragmenté et dénaturé. (DNA carrier préparé à partir d'ADN de sperme de saumon.)

En pratique :

Préparer un volume adéquat de la solution de préhybridation suivante :

Pour 10 ml : 7.75 ml eau distillée

0.75 ml SSPE 20 x	1.5x SSPE
0.5 ml SDS 20 %	1 % SDS
0.5 ml BLOTTO 10 %	BLOTTO 0.5 %
0.5 ml DNA sperme de hareng(10 mg/ml) *	DNA carrier 0.5 mg/ml

*Le DNA carrier doit être dénaturé immédiatement avant son addition à la solution de préhybridation en le chauffant 3 minutes dans un bain d'eau bouillante. Placer ensuite immédiatement dans la solution ou déposer sur glace pour éviter la renaturation.

1. Placer la membrane à bloquer dans une boite de pétri 12x12 cm (ou autre suivant le format de la membrane).
2. Couvrir généreusement la membrane de la solution de préhybridation préalablement incubée à 65°C.
3. Laisser préhybrider au moins 30 minutes, dans un bain à 65°C, sous agitation modérée.

VIII.5. Hybridation des membranes.

1. Dénaturer la sonde avant l'emploi par incubation de 3 minutes dans un bain d'eau bouillante.
2. Déposer la sonde sur les membranes après avoir éliminé l'excès de solution de préhybridation.
3. Incuber une nuit à 65°C sous agitation modérée.

VIII.6. Lavage des membranes.

Cette étape permet d'éliminer l'excès de sonde ainsi que les sondes appariées de manière incorrecte. Le degrés de stringence appliqué au cours des lavages est déterminé par l'expérimentateur. Les conditions de stringence doivent par exemple être plus douces si l'on réalise des marquages hétérologues, (par exemple marquer du DNA de souris avec une sonde de hamster).

En suivant l'évolution de la radioactivité au cours des lavages , et en fonction du comportement plus ou moins attendu en théorie, on peut décider d'arrêter un lavage à un degré de stringence donné.



Fig.IX.1. Synthétiseur automatique modèle 381A d'Applied Biosystems.

Phosphoramidite Chemistry

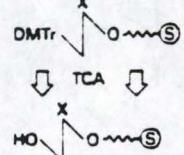
DETRITYLATION

1 The dimethoxy trityl group which protects the 5'-OH is removed by treatment with trichloroacetic acid (TCA). This frees the 5'-OH for reaction.

START:
Support-bound
Nucleoside

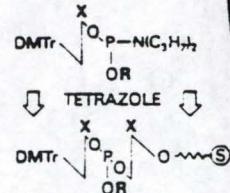
Cycles
2 through x

Last Cycle



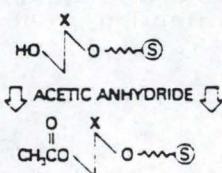
ADDITION

2 Tetrazole and the phosphoramidite are mixed as they enter the reaction chamber. These form a highly reactive species which rapidly reacts with the 5'-OH.



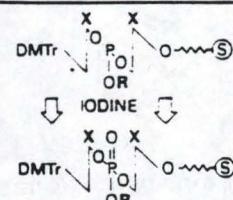
CAPPING

3 Acetic anhydride and dimethyl amino pyridine are mixed and form a powerful acetylating species which terminates or "caps" any chains which did not react in the addition step.



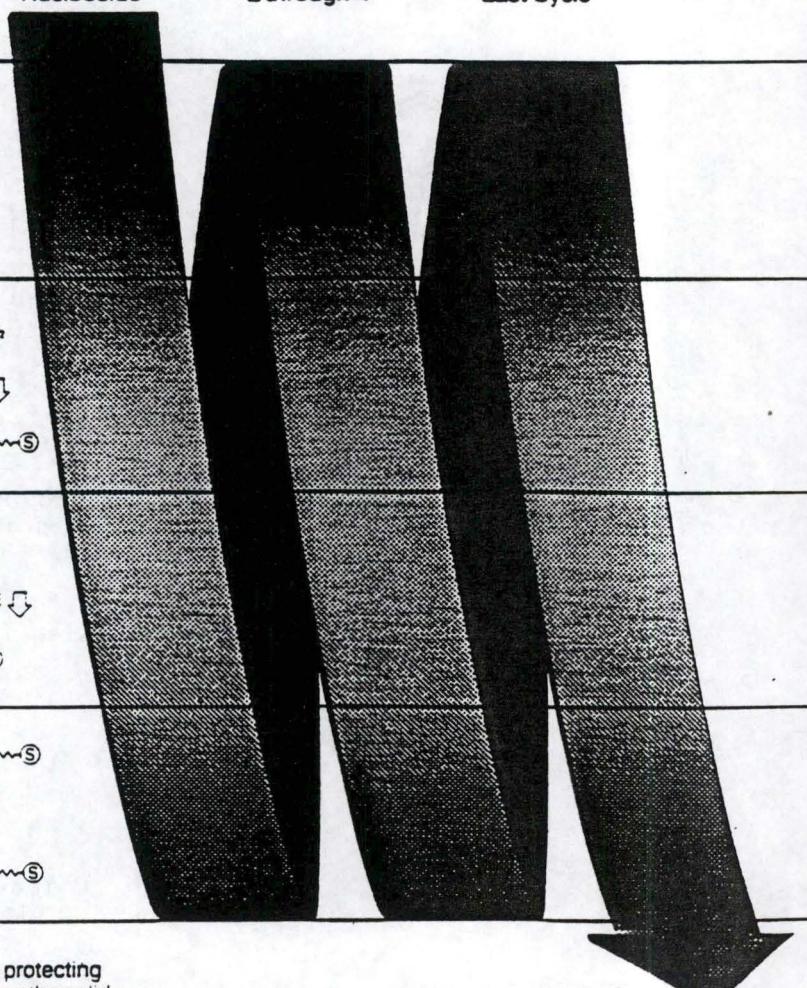
OXIDATION

4 The labile trivalent phosphorous linkage formed in the addition step is converted to the stable, pentavalent phosphorous linkage of biologically active DNA.



DEPROTECTION

5 After chain assembly is complete, the phosphate protecting groups are removed, the chains are separated from the solid support, and the base protecting groups are removed.



OLIGONUCLEOTIDE

Fig.IX.2. Résumé de la stratégie de synthèse des oligonucléotides.

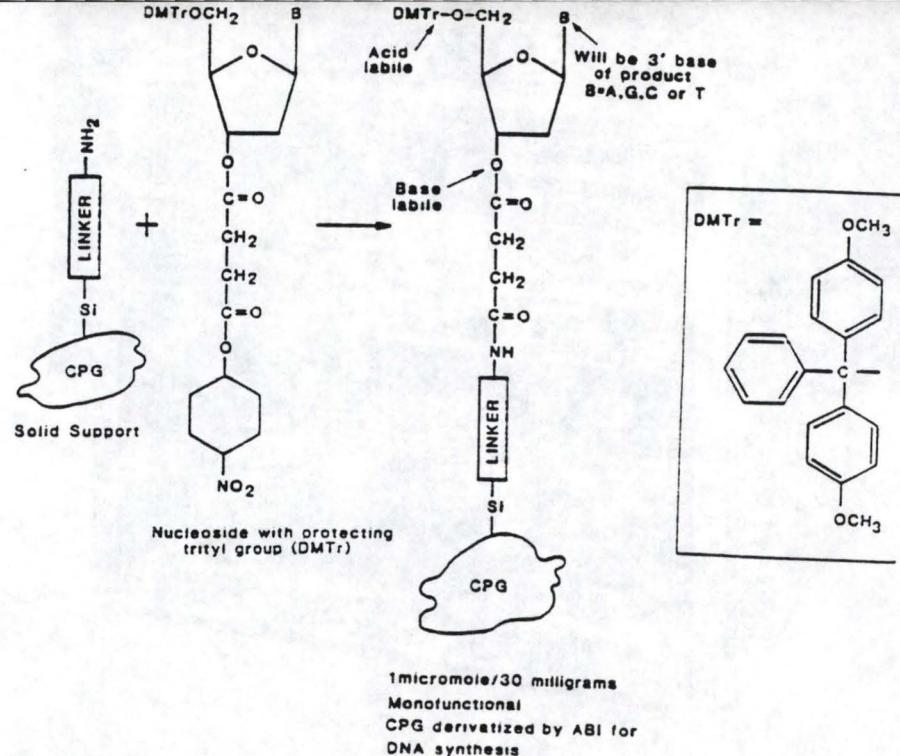


Fig.IX.3. The trityl (DMTr: inset) protected nucleoside is attached to the controlled pore glass (CPG) support.

PROTECTION OF BASE AMINO GROUPS

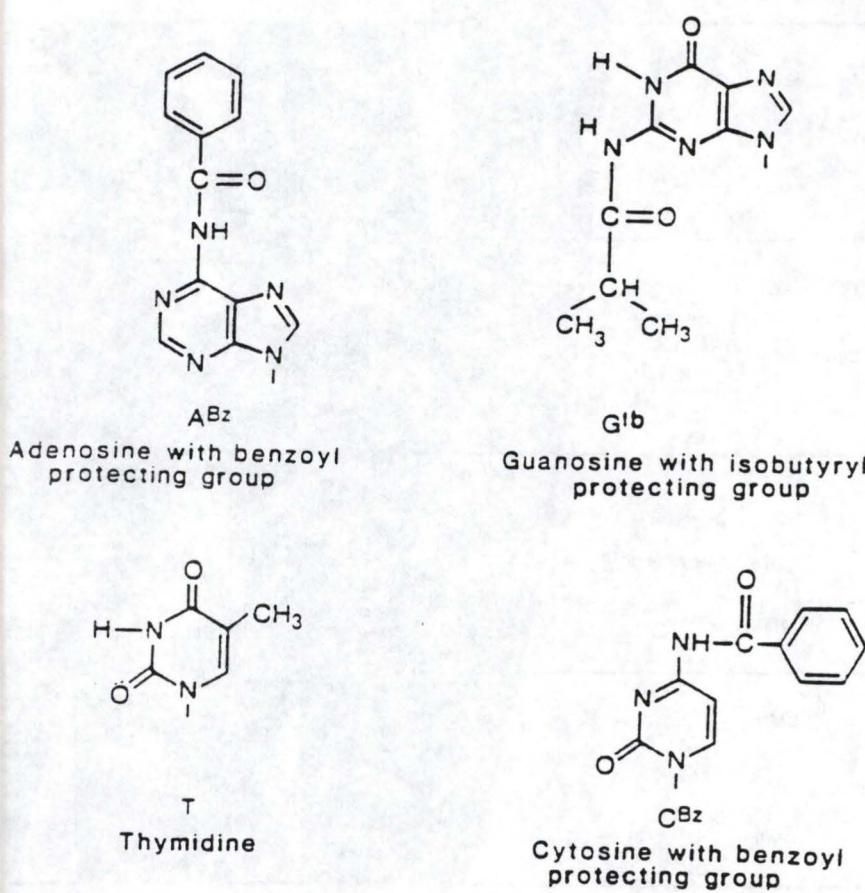


Fig.IX.4. Protected exocyclic base amines. Adenosine (A) and cytosine (C) are protected by a benzoyl group (Bz), and guanosine (G) by an isobutyryl group (Ib). Thymidine (T) is unreactive and does not need a protecting group.

En pratique :

Les lavages sont réalisés en plaçant les membranes dans des milieux de force ionique de plus en plus faible.

Pour cela, préparer les solutions suivantes :

1. SSPE 2X , SDS 0.1 %
2. SSPE 1X , SDS 0.1 %
3. SSPE 0.3X , SDS 0.1 %
4. SSPE 0.1X , SDS 0.1 %

Préincuber les solutions à 65 °C avant leur utilisation.

1. Aspirer la solution de blocage couvrant les membranes .
2. Recouvrir la membrane de SSPE 2X, SDS 0.1% et incuber 15 minutes à 65°C sous agitation.
3. Après 15 minutes, éliminer la solution de lavage.
4. Contrôler la radioactivité au compteur Geiger.
5. Couvrir de la seconde solution de lavage et incuber à nouveau 15 minutes.
6. Recommencer les opérations précédentes , et ce jusqu'au degré de stringence choisi.

VIII.7. Autoradiographie des membranes.

1. Après lavage, essorer (sans les sécher) les membranes entre 2 feuilles de papier Whatman 3MM.
2. Placer dans une cassette pour autoradiographie une feuille de papier saran .
3. Placer la membrane sur le papier saran, et replier celui-ci de manière à recouvrir entièrement la membrane.
4. Placer un film (Kodack X-Omat AR) sur la membrane .
5. Placer à - 20°C un nombre d'heures adéquat (par exemple 2 jours pour un Southern) jusqu'au développement.

Pour enlever la radioactivité d'une membrane Hybond-N+.

Recouvrir la membrane d'une solution bouillante de SDS 0.5%.

Laisser refroidir, rincer dans de l'eau distillée stérile, puis dans une solution de SSC 2X.

Sécher la membrane entre 2 feuilles de papier Whatman 3MM, et la placer dans une étuve à 50°C.

Lorsque la membrane est bien sèche, la stocker à 4°C dans un sac multigrip, entre 2 feuilles de Whatman.

IX. SYNTHESE DES OLIGONUCLEOTIDES

Les synthèses ont été réalisée sur un synthétiseur automatique modèle 381A d'Applied Biosystems (fig. IX.1.).

Il s'agit d'une synthèse en phase solide, faisant appel à la chimie des phosphoramidites.

Les synthèses sont réalisées dans le sens 3'-5', le premier nucléoside incorporé correspondant à l'extrémité 3'OH libre de l'oligonucléotide (fig. IX.2.).

IX.1. Matériel de départ : premier nucléoside fixé sur support solide et phosphoramidites (fig. IX.3.).

Le matériel de départ est une colonne constituée de billes de verre poreuses(

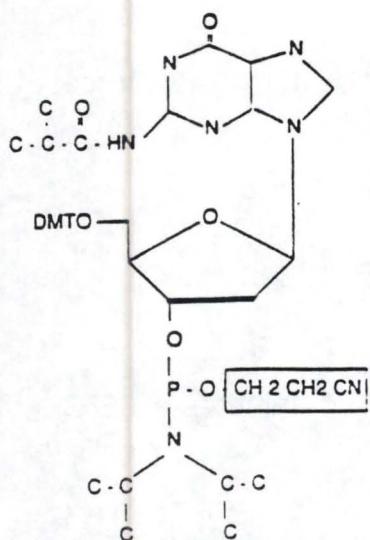


Fig.IX.5. Structure of guanosine
β-cyanoethyl phosphoramidite

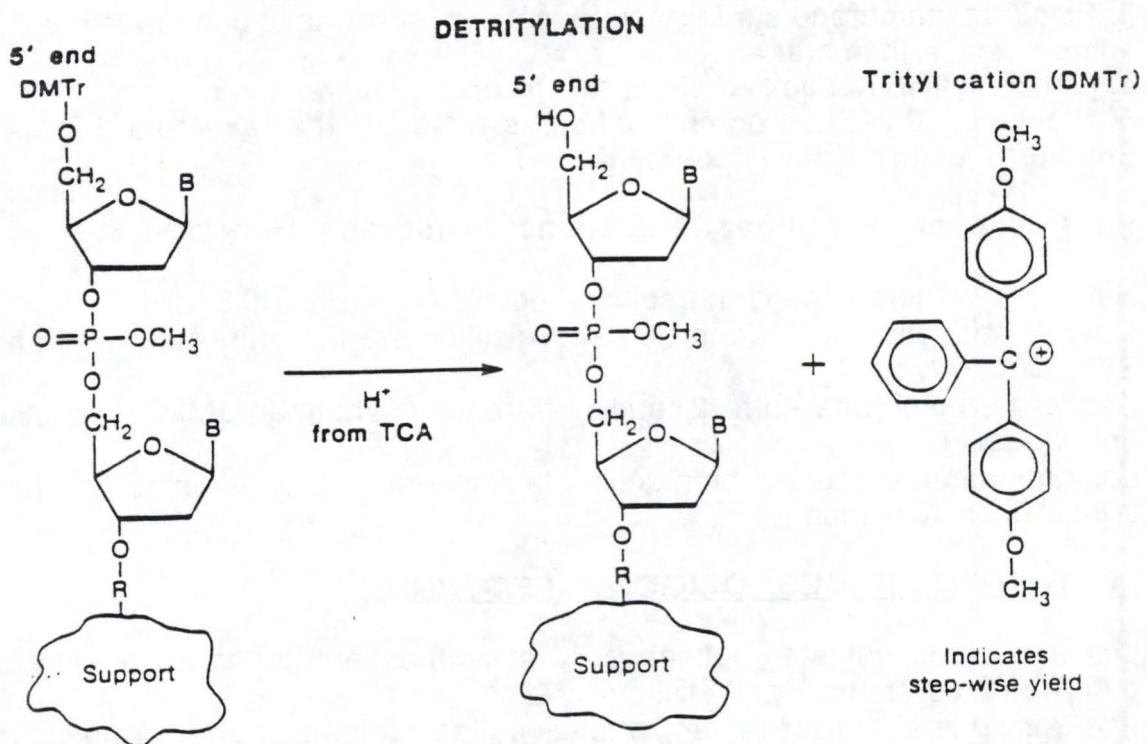


Fig.IX.6 Detriylation. TCA is used to remove the trityl group (DMTr) from the 5'end. This leaves a 5' hydroxyl to react with the incoming phosphoramidite in the coupling step. Quantitating the released trityl cation (inset) indicates the step-wise yield and can be used to monitor the instrument's performance.

Controlled Pore Glass : CPG) sur lesquelles un des 4 nucléosides (A, C, G, T) est fixé de manière covalente , via un linker.

Il s'agit d'un lien ester entre le 3'OH du ribose et le linker, lien qui pourra être facilement rompu par la suite pour libérer l'oligonucléotide synthétisé.Les groupes réactionnels de ces nucléosides de départ sont protégés pour éviter toute réaction des chaînes latérales.

De même, pour que seule la réaction désirée se déroule, c'est à dire l'elongation du premier nucléoside dans le sens 3'-5' OH, les précurseurs sont fournis sous forme de phosphoramidites.

Les phosphoramidites sont des nucléotides modifiés (fig. IX.4. et IX.5.). Ils possèdent, de même que les nucléosides fixés sur la colonne :

1. Un groupe protecteur dimethoxytrityl (DMT) sur le 5'OH du ribose. Ce groupe est éliminé par traitement avec un acide faible au début de chaque étape de couplage.

2. Un groupe protecteur benzoyl sur les groupements aminés des bases A et C. Un groupe protecteur isobutyryl sur les groupements amines de la guanine. Ces groupements évitent toute réaction des chaînes latérales et seront clivés après la synthèse. La thymidiné ne contient pas d'amine exocyclique et ne doit pas être protégée.

Les phosphoramidites possèdent en plus des groupements protecteurs des 3' phosphates.

1. Un groupe diisopropylamine.

2. Un groupe β -cyanoéthyl. Ce groupement évite les réactions indésirées des groupements phosphates et aide à la solubilité des phosphoramidites dans des solvants organiques. Il peut également être éliminé après synthèse.

IX.2. Synthèse d'un oligonucléotide.

Un cycle de synthèse est constitué de 4 étapes :

1. Détritylation.
2. Addition(coupling).
3. Capping.
4. Oxydation.

IX.2.1.Première étape : la détritylation (fig. IX.6).

Au cours de la première étape de la synthèse , le support solide est traité avec l'acide trichloracétique (TCA) pour éliminer le groupement protecteur DMT placé sur le 5' OH du ribose.

Cette étape libère une extrémité 5' OH qui pourra réagir avec le phosphoramidite suivant au cours de l'étape de couplage.

La colonne est ensuite rincée avec un flux d'acétonitrile pour éviter une déprotection des phosphoramidites arrivant pour l'étape de couplage.

Enfin, un flux d'argon est passé au travers de la colonne pour éliminer toute trace d'acétonitrile .

Le groupement trityl, en solution acide , donne un coloré orange qui peut être dosé par spectrophotométrie avec une absorbance maximale à 498 nm. Ceci permettra obtenir une idée du rendement de chaque étape de couplage et ainsi de pouvoir vérifier l'efficacité de la synthèse.

IX.2.2. Deuxième étape : addition (coupling)(fig. IX.7).

Avant de commencer l'étape de couplage, la colonne est rendue anhydre et les substances nucléophiles sont éliminées par passage d'un flux d'acétonitrile. La

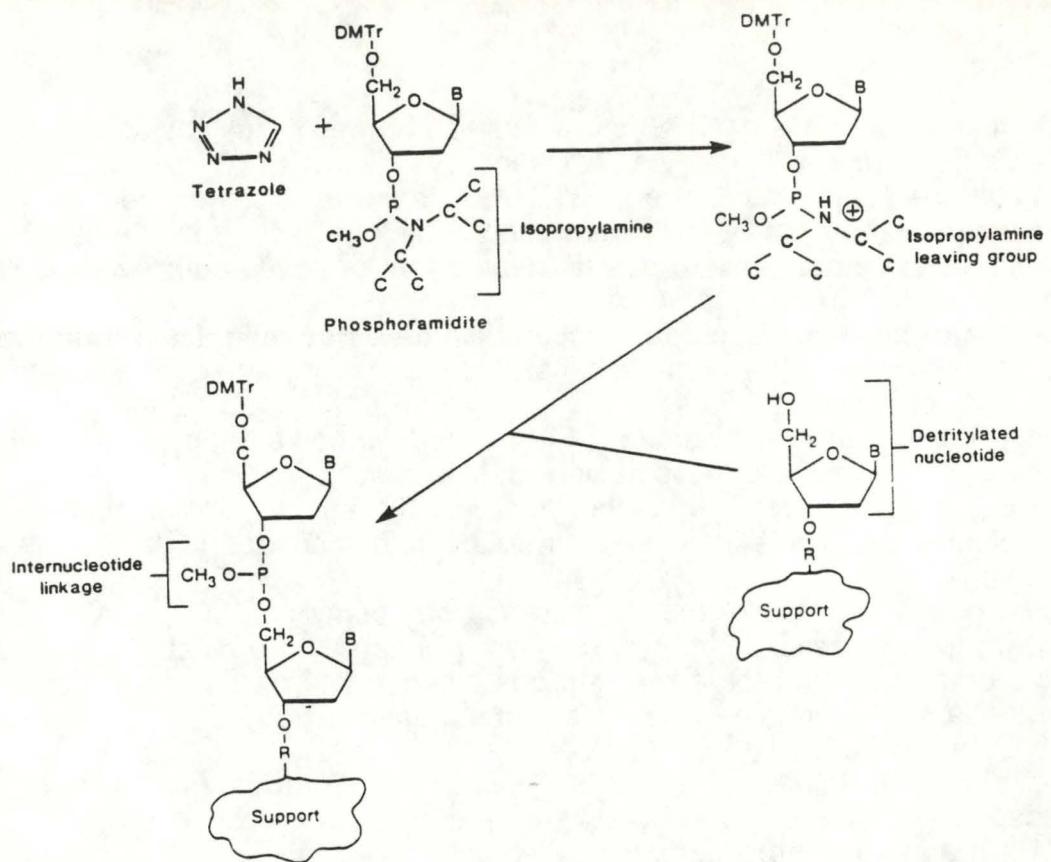


Fig.IX.7. The coupling step. Phosphoramidites and tetrazole are delivered to the column which contains the support-bound nucleotide. The diisopropylamine is displaced and a 5' to 3' internucleotide linkage is created through the trivalent phosphorous of the phosphoramidite.

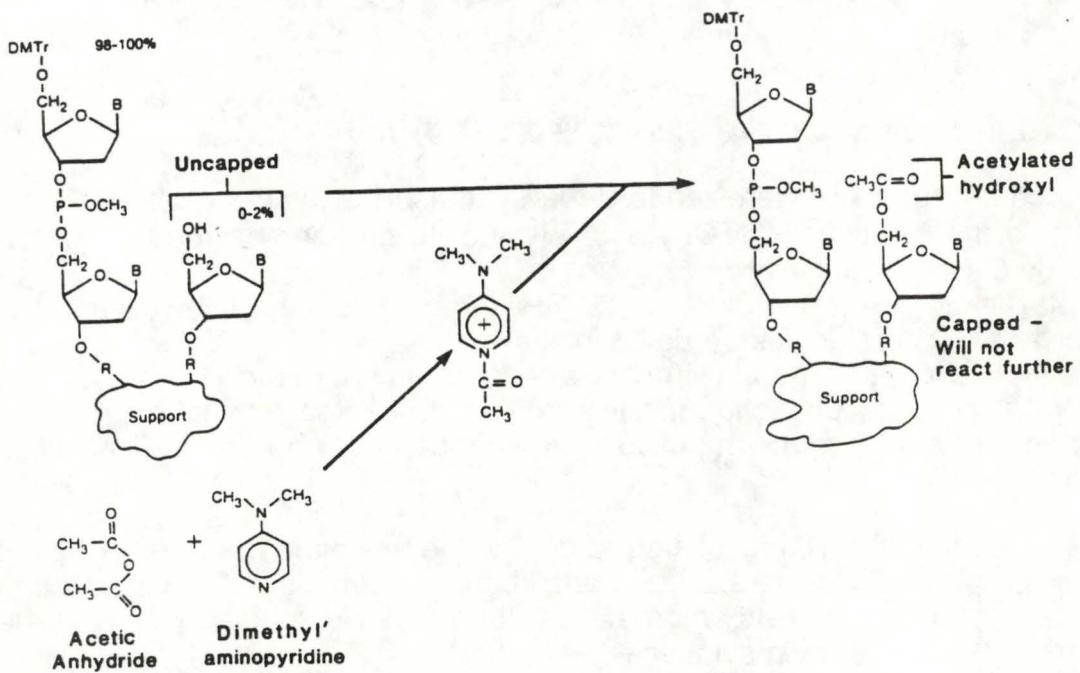


Fig.IX.8. Capping of unreacted chains. The capping reagents, acetic anhydride and dimethylaminopyridine (DMAP), are used to terminate unreacted chains by acetylating the 5' hydroxyl groups.

colonne est ensuite séchée sous flux d'argon.

Le phosphoramidite suivant est injecté simultanément avec le tétrazole, un acide faible. Le tétrazole va transférer un proton sur l'azote du groupe diisopropyl protecteur du phosphate, créant un bon groupe partant pour une attaque nucléophile par le 5' OH du nucléotide précédent.

A la fin de l'attaque nucléophile, on a ainsi additionné un nouveau nucléotide. Le lien internucléotidique créé se fait via un phosphate trivalent, très instable.

IX.2.3. Troisième étape : Capping (fig. IX.8).

L'étape de couplage n'étant pas efficace à 100 %, un certain pourcentage des nucléotides fixés sur le support n'ont pas réagi avec le nucléotide suivant. Ces nucléotides possèdent un groupement 5'OH libre et pourront réagir au cours des étapes d'addition suivantes, donnant lieu à la formation d'oligonucléotides possédant un nombre de bases incorrect. L'étape de capping a pour but d'empêcher toute réaction ultérieure des nucléotides n'ayant pas subit l'étape de couplage.

Elle limite ainsi la taille des impuretés et facilite la purification ultérieure.

Pour cela, des quantités identiques d'anhydre acétique et de diméthylaminopyridine (DMAP), sont envoyées simultanément vers la colonne. Ces deux composés, une fois mélangés, créent un agent acétylant très puissant qui va réagir avec le groupe 5' OH libre des nucléotides n'ayant pas fixé un nouveau phosphoramidite.

Une fois acétylés, ces groupements hydroxyls ne pourront plus réagir. Les réactifs sont alors éliminés par un rinçage à l'acetonitrile et la colonne est séchée sous flux d'argon.

IX.2.4. Quatrième étape : Oxydation (fig. IX.9).

Le lien internucléotidique formé au cours de l'étape de couplage est un lien phosphite (trivalent) instable.

Immédiatement après l'étape de capping, ce lien instable va être oxydé en une liaison phosphate (pentavalente) plus stable.

(L'étape d'oxydation a lieu après l'étape de capping de manière à éviter que des traces d'eau provenant de l'oxydation ne transforme l'anhydre acétique utilisé pour le capping en acide acétique. Cet acide serait néfaste pour les oligonucléotides et rendrait également le capping moins efficace).

L'agent oxydant utilisé est l'iode, le donneur d'oxygène étant l'eau.

En pratique, un mélange contenant l'iode, de l'eau, de la lutidine et du THF (Tétrahydrofurane) est envoyé vers la colonne. Un complexe iode-lutidine se forme et s'ajoute au phosphate trivalent. Ce complexe est ensuite déplacé par l'eau, conduisant à l'oxydation du phosphate en un phosphate pentavalent.

La solution d'iode est néfaste pour les étapes suivantes et est donc éliminée par un flux d'argon et plusieurs lavages à l'acetonitrile, chacun suivi d'un flux d'argon.

Après l'étape d'oxydation, un cycle de synthèse est terminé. Le dernier phosphoramidite fixé possède un groupe 5'DMT. La synthèse se poursuit en clivant ce groupe et en répétant les étapes précédentes.

A la fin de la synthèse de l'oligonucléotide, le dernier phosphoramidite ajouté possède toujours un groupe DMT sur le 5'OH du ribose. Ce groupe peut être conservé ou éliminé, donnant respectivement une synthèse en trityl on ou en trityl

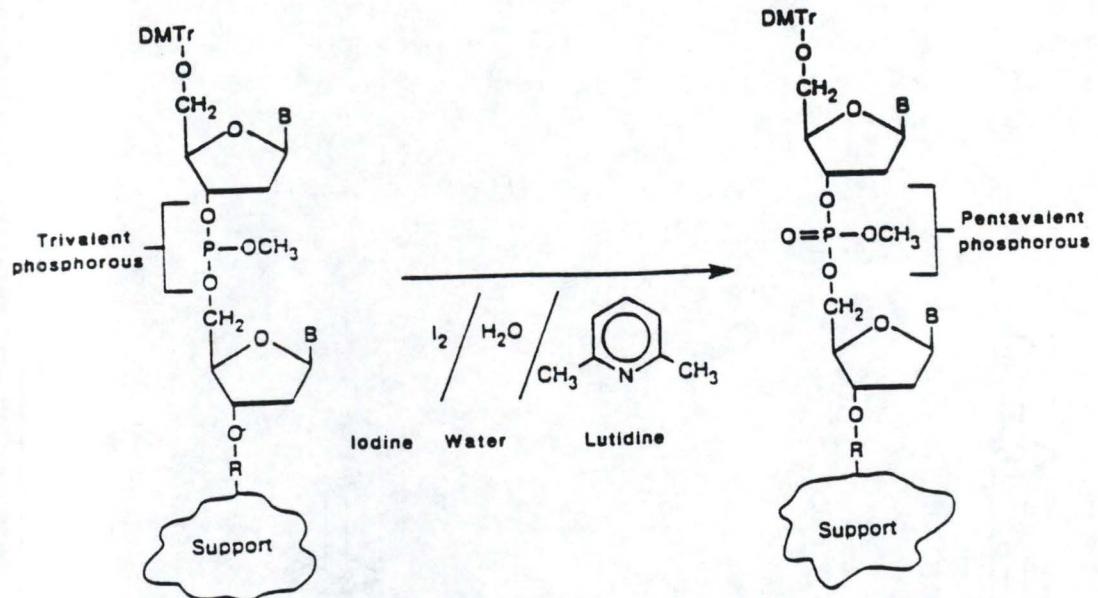


Fig.IX.9. Oxidation of trivalent phosphorous. the unstable trivalent phosphorous of the newly formed internucleotide linkage is oxidized to a stable pentavalent phosphorous.

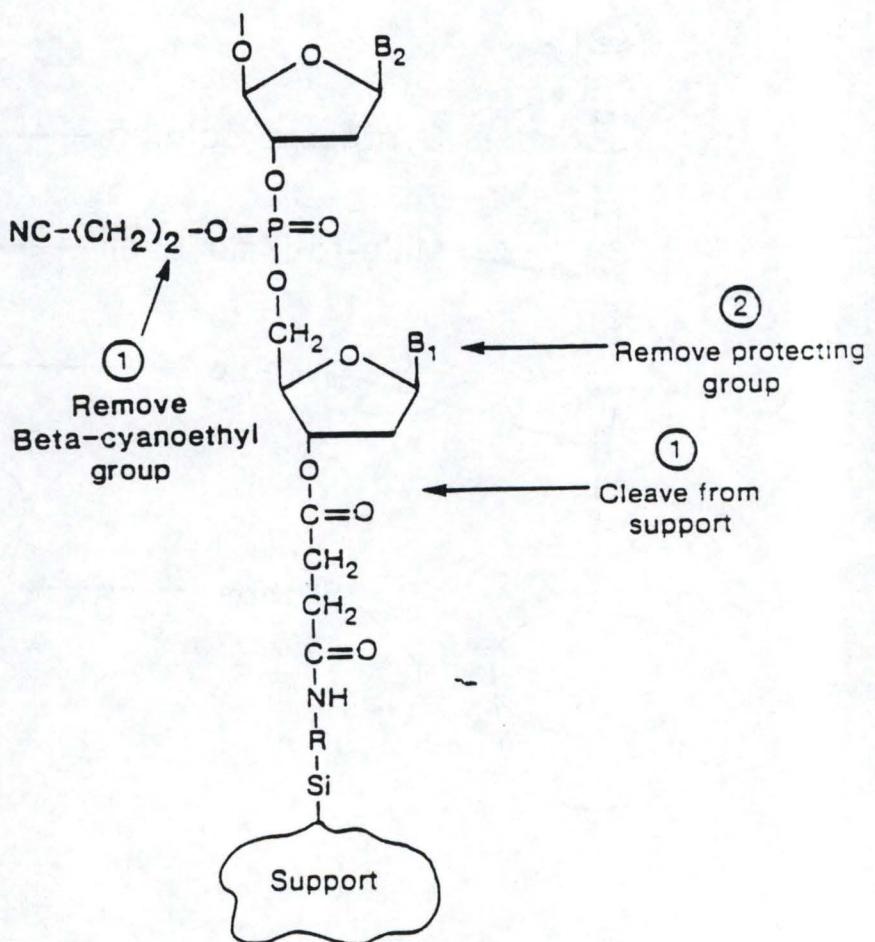


Fig.IX.10. Deprotection and cleavage of β -cyanoethyl protected oligonucleotides. Treatment with concentrated ammonium hydroxide removes the β -cyanoethyl protecting groups and cleaves the oligonucleotides from the support (1). The benzoyl and isobutyryl base protecting groups are removed by heating at 55°C in ammonia for 8 to 15 hours (2).

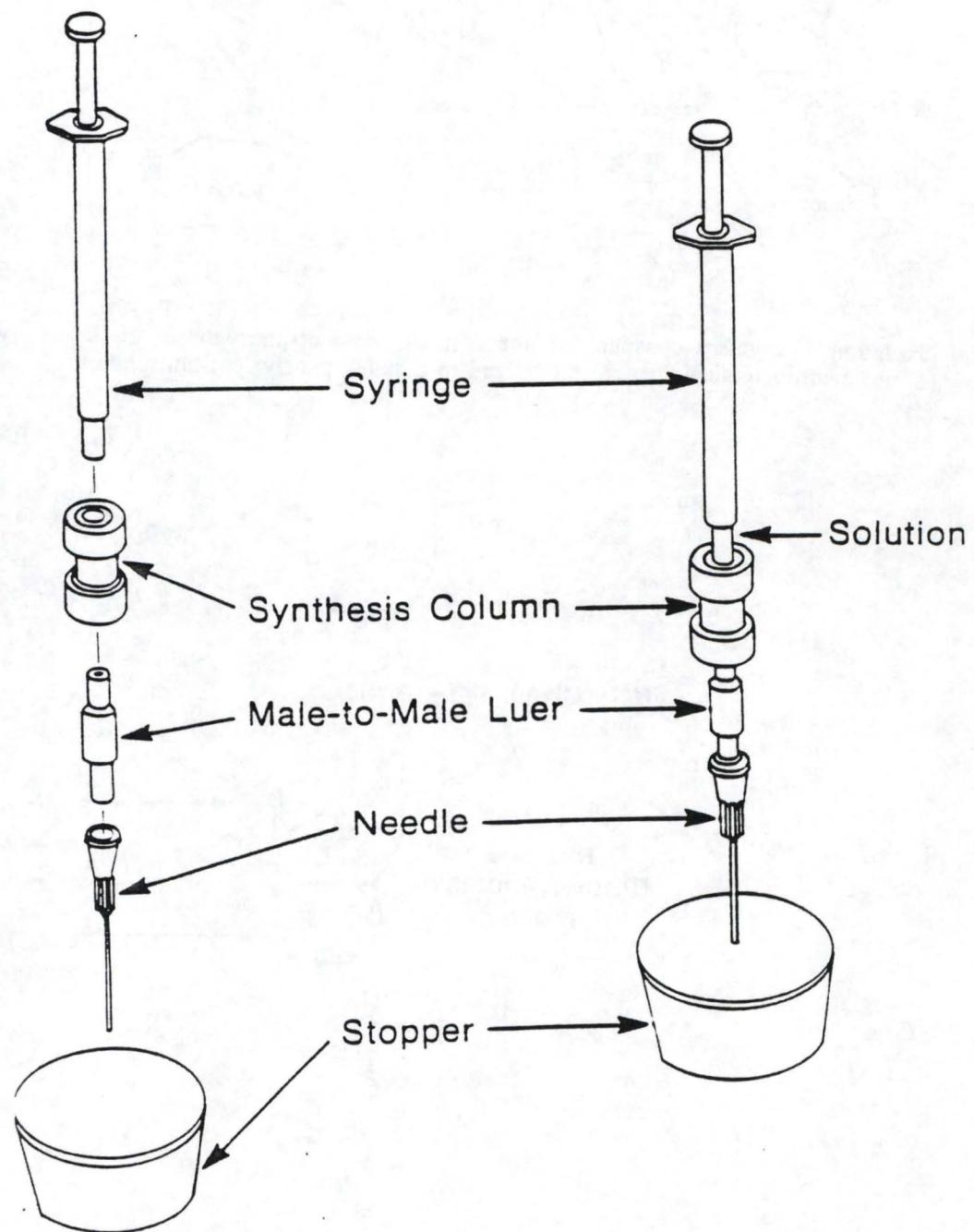


Fig.IX.11. Montage à réaliser pour la déprotection manuelle des oligonucléotides.

off.

IX.2.5. Déprotection manuelle et clivage (fig. IX.10).

Lorsque la synthèse est terminée, l'oligonucléotide est toujours fixé sur la colonne, les groupements phosphates ainsi que les bases sont toujours protégés. L'oligonucléotide doit donc être clivé du support solide et déprotégé pour donner de l'ADN biologiquement actif.

Les oligonucléotides synthétisés en utilisant des β -cyanoéthyl phosphoramidites sont simultanément décyanoéthylés et clivés du support par traitement à l'ammoniaque concentré.

Les groupes protecteurs des bases sont éliminés par traitement à l'ammoniaque concentré une nuit à 55°C.

Matériel :

- MATERIEL :**

 1. Seringues de 1 ml.
 2. Bouchons caoutchouc.
 3. Un adaptateur permettant de connecter la colonne et l'aiguille.
 4. Ammoniaque à 29% minimum (Aldrisc ACS) stocké à 4°C et porté à température ambiante pour utilisation.
 5. Flacons et capsules avec joint de téflon.

Protocole :

1. Lorsque la synthèse est terminée, enlever la colonne du support et réaliser le montage représenté figure IX.11..
 2. Plonger l'aiguille dans l'ammoniaque et aspirer jusqu'à ce que la solution soit visible dans la seringue.
 3. Piquer l'aiguille sur le bouchon et attendre 30 minutes.
 4. Expulser l'ammoniaque dans le flacon.
 5. Recommencer 3 fois les mêmes opérations.
 6. Refermer le flacon par une capsule.
 7. Pour la déprotection des bases, placer le flacon dans un tube en propylène de 15 ml dans le fond duquel un peu d'huile minérale a été déposée.
 8. Incuber une nuit à 55°C.

IX.2.6. Purification des oligos par PAGE.(Polyacrylamide gel electrophoresis).

Matériel.

Tampon formamide : pour 10 ml : 1 ml de TBE 10X.

9 ml de formamide désionisée.

Gel dénaturant PAGE :

Pour l'appareil Protéan® de Biorad, avec spacer de 1.5 mm, préparer 60 ml de solution comme suit : 6 ml de TBE 10X

25.2 a urée.

acrylamide stock à 40% : 25 ml pour un gel de 15 %.

Ajouter de l'eau distillée jusqu'à 60 ml.

Agiter pour dissoudre l'urée et chauffer légèrement si nécessaire.

Ajouter 200 ml de persulfate d'ammonium 10%.

Ajouter 30 ml de temed.

Couler le gel et placer le peigne.

Après polymérisation, remplir la cuve d'électrophorèse de TBE 1x et rincer les puits avec du TBE 1X avant de déposer les échantillons.

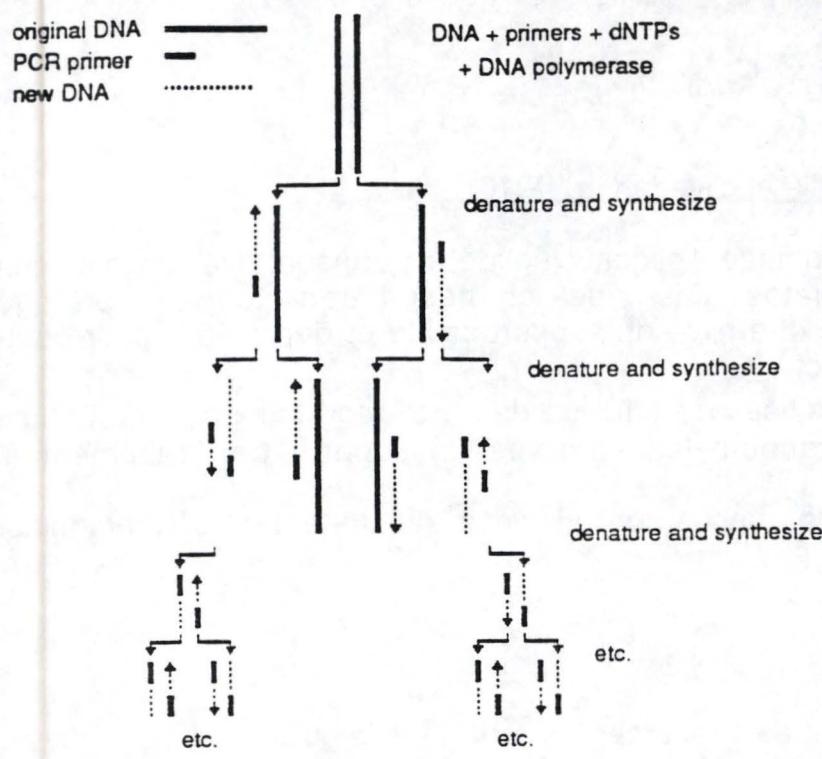


Fig. X.1. Principe de la PCR : Le DNA à amplifier est dénaturé par chauffage à 95°C.

Deux oligonucléotides complémentaires d'une courte séquence située aux extrémités 3'OH du DNA cible sont mis à hybrider avec ce fragment d'ADN. Les extrémités 3'OH des oligonucléotides servent d'amorce pour une DNA polymérase. Chaque brin sert alors de matrice pour l'enzyme qui synthétise 1 brin complémentaire. Les produits de ce premier cycle sont dénaturés par la chaleur , et les primers sont remis à hybrider avec les brins d'ADN provenant du premier cycle d'amplification, chaque servant de à l'ADN polymérase. Et ainsi de suite jusqu'à ce que l'ensemble des cycles soient terminés.

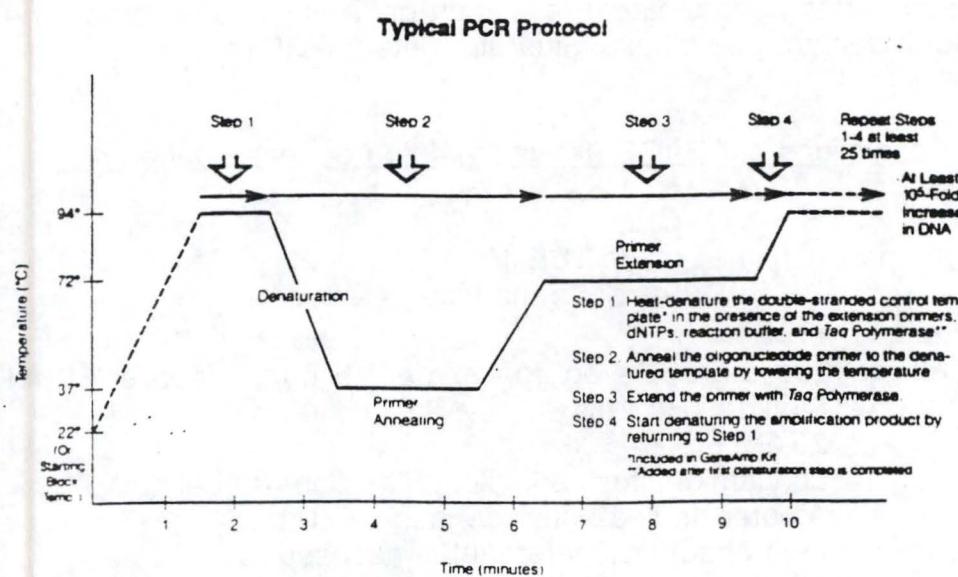


Fig.X.2. Principe de la PCR : représentation donnant les conditions de température au cours de chaque étape d'un cycle.

Préparation des échantillons pour la purification et dépôt sur le gel.

Le lendemain, après avoir laissé refroidir le flacon, la solution contenant les oligos est évaporée à sec à la SpeedVac pour éliminer l'ammoniaque.

Le produit d'une petite synthèse (colonne de 0.2 µmoles) est repris dans 200 µl d'eau distillée .

Un même volume de tampon formamide est alors ajouté.

Avec l'appareil Protéan®, la taille des encoches du gel est de 10x1.5 mm, soit 15 mm². A peu près 25 % d'une petite synthèse(c'est-à-dire 100 µl d'échantillon préparé) peuvent être déposés dans 2 puits, soit un volume de 50 µl par puits.

Déposer du bleu/formamide dans un puits à coté et lancer le gel, par exemple toute une nuit à 40 V.

Récupération des oligos.

1.Démouler prudemment le gel, l'emballer dans du papier glad et regarder la bande sur une plaque TLC avec indicateur 254 nm, en éclairant à la lampe UV short Wavelenght. Noter au marqueur, sur le papier glad, la position de la bande intéressante.

2.Découper ensuite cette bande avec une lame flambée et transférer l'acrylamide dans un tube Eppendorf.

3.Ajouter 0.5 ml de NaAc M pour 2 puits et éluer toute la nuit sous agitation.

4.Ajouter un volume de chloroforme, centrifuger 3 minutes à la minifuge et récupérer la phase aqueuse.

5. Ajouter un volume de CIAA .Recentrifuger 3 minutes à la minifuge.

6.Récupérer la phase supérieure, remplir d'éthanol absolu et placer 1 heure à - 20°C.

7.Centrifuger 20 minutes à froid.

8.Décanter et sécher à la SpeedVac.

9.Resuspendre le culot dans 50µl de TE et lire un aliquot à 260 nm pour estimer la concentration.

Une absorbance de 1 DO correspond à une concentration de 40 µg/ml.

Conserver les oligos à - 20°C.

X. TECHNIQUES DE PCR.

X.1. Principe.

L'amplification par polymérisation en chaîne (PCR : polymérase chain réaction) est une technique rapide permettant, in vitro, l'amplification par voie enzymatique, d'un fragment d'ADN donné, que cet ADN cible soit sous forme purifiée ou dans un mélange complexe.

La technique de PCR est assez simple d'un point de vue technique.

Elle nécessite : 1. La présence, purifié ou dans un mélange complexe , de la séquence cible à amplifier, sous forme bicaténaire.

2. Deux oligonucléotides capables de s'hybrider chacun à l'un des 2 brins du DNA template, délimitant ainsi la séquence à amplifier.

3. Une DNA polymérase (de préférence thermostable telle que la Taq polymérase).

4. Des désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP et dTTP).

5. Un tampon adéquat.

Cette technique met en jeu la répétition (souvent de 20 à 50 fois) d'un cycle de 3

Inhibitor Effects on *Taq* Pol I Activity

Inhibitor	Concentration	Activity*
Ethanol	≤3%	100%
	10%	110%
Urea	≤0.5 M	100%
	1.0 M	118%
	1.5 M	107%
	2.0 M	82%
DMSO	≤1%	100%
	10%	53%
	20%	11%
DMF	≤ 5%	100%
	10%	82%
	20%	17%
Formamide	≤10%	100%
	15%	86%
	20%	39%
SDS	.001%	105%
	.01%	10%
	.1%	<.1%

*dNTP incorp. activity at 70° with Salmon Sperm DNA/10 min

Fig.X.3. Agents affectant l'activité de la *Taq* DNA polymérase.

étapes. (Voir fig X.1. et X.2.).

Ces étapes sont : 1. Dénaturation du DNA cible par chauffage à 95°C.

2. Etape d'annealing : au cours de cette étape, chaque primer s'hybride au brin complémentaire de la séquence cible.

3. Etape d'extension : la DNA polymérase va, à partir de l'extrémité 3' libre de chaque primer, synthétiser un nouveau brin complémentaire du template

La quantité de matériel produit double donc au cours de chaque cycle, conduisant à une accumulation exponentielle du produit cible .

X.2. Mise en œuvre d'une PCR.

X.2.1. DNA polymérase.

L'introduction d'une DNA polymérase thermostable, la Taq polymérase, isolée à partir de la souche bactérienne thermophile *Thermus Aquaticus* a grandement facilité l'utilisation de la PCR, permettant le développement de cycleurs automatiques.

Cet enzyme possède un optimum de température se situant aux environ de 72°C. Ceci a permis de réaliser les étapes d'hybridation et d'elongation à des températures plus élevées, augmentant ainsi la spécificité des réactions et résolvant les problèmes de structure secondaire. De plus , le rendement est supérieur à celui de la Klenow utilisée pour les premières PCR, et les fragments amplifiés peuvent être de taille plus importantes (jusqu'à 10 Kb).

L'enzyme nécessite la présence d'ions magnésium dans le milieu , et est inhibée par des concentrations trop élevées en DMSO(10%) ou enSDS (0.01%). L'urée et l'éthanol semblent avoir un effet activateur (fig. X.3.).

La fidélité de l'enzyme a largement été étudiée, celle-ci ne possédant pas d'activité proof-reading 3'-5' exonucléase.Les derniers résultats donnent un taux de mutation moyen de 5×10^{-6} nucléotides mal incorporés par cycle.(Environ une mutation pour 15 000 nucléotides, en considérant 30 cycles) .Ce taux d'erreur ne pose cependant aucun problème pour la plupart des applications.

Lors de réactions d'amplification de séquences complexes, telles que du DNA génomique, la concentration en enzyme est en général de 2.5 U/100 µl de réaction. Augmenter la concentration au delà de cette valeur conduirait non pas à une augmentation du rendement, mais à une accumulation plus importante de produits non spécifiques.

X.2.2. Choix des primers.

Il n'existe aucune règle permettant de choisir des primers qui seront efficaces à coup sûr. Pourtant, ce sont les primers, plus que tout autre élément, qui déterminent le succès ou l'échec d'une PCR .

Les primers typiques ont de 15 à 30 nucléotides de longueur, et une composition de 50 à 60% en G+C.

Quelques règles peuvent cependant être observées lors du choix d'un primer :

- 1.Eviter les séquences contenant des régions de polypurines ou pyrimidines.
- 2.Eviter les séquences donnant lieu à des structures secondaires, surtout à l'extrémité 3' du primer.
- 3.Vérifier que les 2 primers choisis ne sont pas complémentaires l'un de l'autre au niveau de leur extrémité 3'. Ceci conduirait à la synthèse d'artéfacts appelés

Top View
(1.5 ML Block Shown)

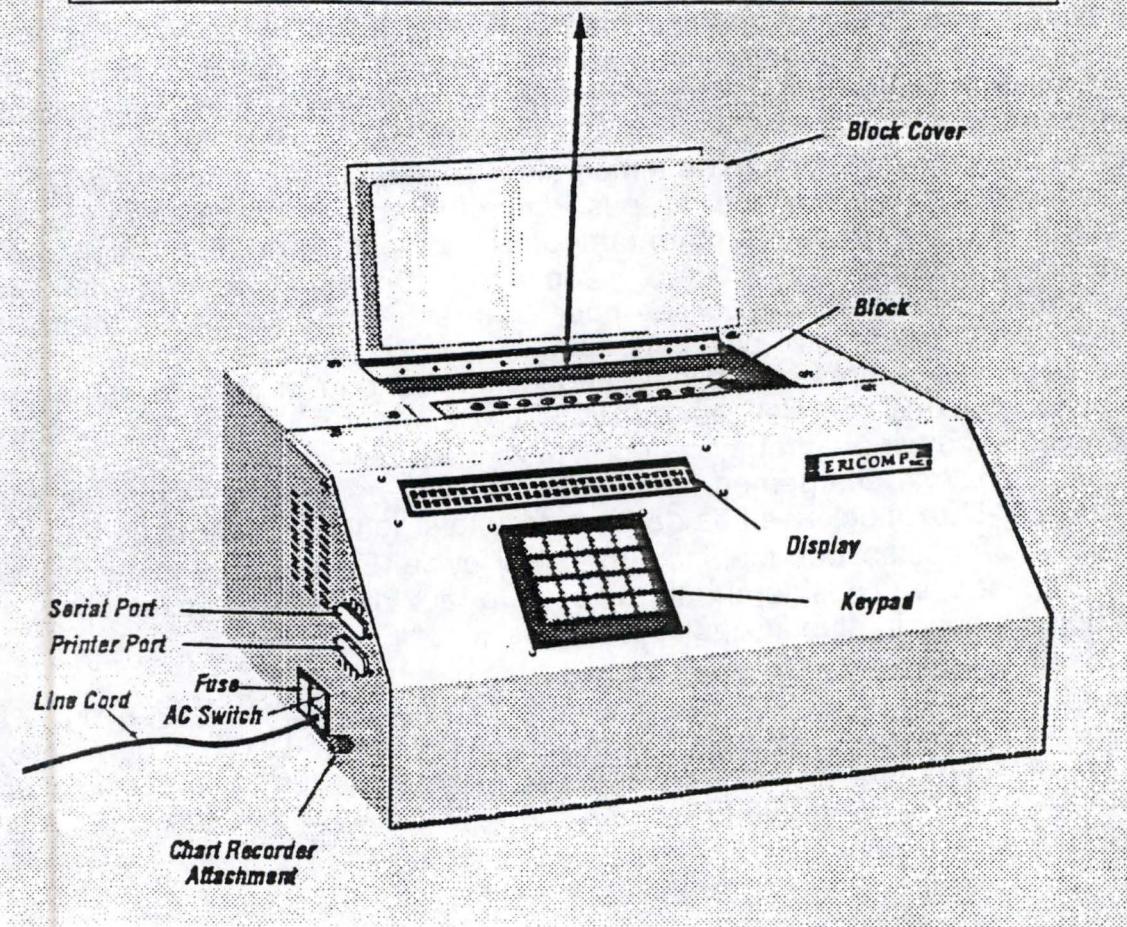
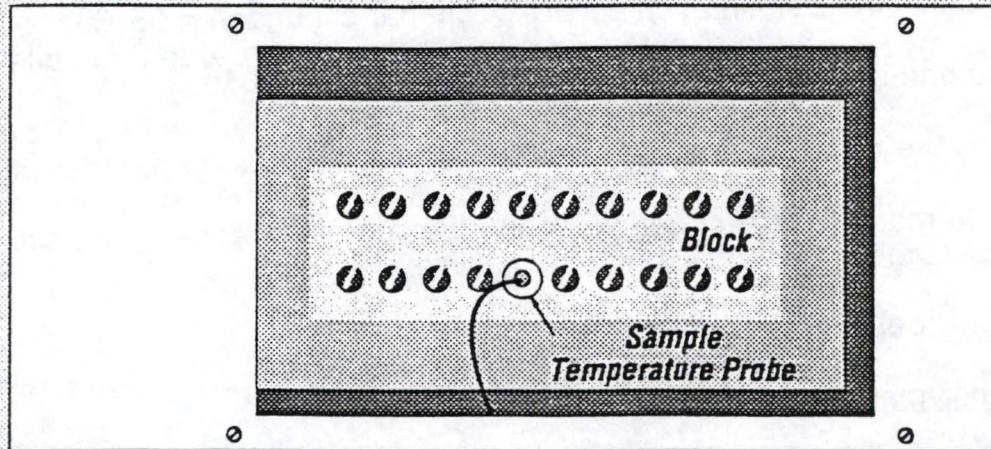


Fig.X.4.Cycleur automatique Ericomp.

"primer-dimer", diminuant gravement le rendement du produit cible.

La température d'hybridation d'un couple de primers donnés est à adapter en fonction de la composition en bases.

On peut prendre comme point de départ la règle suivante : additionner 2°C par base A ou T et 4°C par base G ou C.

En général, les concentrations en primers utilisées lors d'une réaction de PCR varient de 0.05 µM à 1 µM.

X.2.3.Le tampon de PCR.

La concentration en magnésium a un effet important sur la spécificité et le rendement de la réaction. Des concentrations de 1.5 mM sont en général adéquates pour une concentration en dNTPs de 200 µM. Un excès de magnésium conduit à une accumulation de produits non spécifiques, alors qu'une concentration trop faible diminue le rendement de la réaction.

Il faut éviter d'utiliser une concentration en dNTPs supérieure à 200µM. Cette concentration est suffisante pour synthétiser 12.5 µg d'ADN avec incorporation de 50 % des dNTPs. Une concentration trop importante risquerait d'augmenter le taux d'erreur de l'enzyme. De plus , les dNTPs captent les ions magnésium, diminuant ainsi la quantité de Mg²⁺ réellement disponible pour l'enzyme.

Les 4 dNTPs doivent être utilisés à concentration égale pour éviter les erreurs d'incorporation. De plus, il semble que des concentrations faibles en dNTPs diminuent le risque de mismatch primer-séquence cible, et diminue le risque d'elongation à partir d'un nucléotide mal incorporé.

X.2.4. Les conditions du cycle.

La PCR est réalisée en soumettant les échantillons à 3 températures successives différentes correspondant aux 3 étapes du cycle : dénaturation, annealing et extension.

Les réactions sont réalisées dans un cycleur automatique (Ericomp) (fig. X.4.).

1.Dénaturation.

Il est très important qu'une séparation complète des 2 brins soit réalisée au cours de cette étape. Pour cela, une incubation d'1 minute à 95°C est suffisante.

On peut également commencer la réaction de PCR par incubation 5 à 10 minutes à 95°C pour assurer que tout le matériel est parfaitement dénaturé pour l'étape d'hybridation des primers.

2.Annealing.

Il est important que les primers s'hybrident de manière stable au template. La température d'annealing doit donc être déterminée en fonction de la composition en base des primers. En général, 55°C est une bonne température pour un primer de 20 bases, avec 50% de G+C.

Des températures plus basses peuvent être nécessaires, avec alors le risque de voir s'accumuler des produits non spécifiques.

Les primers étant ajoutés en très large excès, l'hybridation se fait de manière quasi instantanée. Ceci veut dire que 30 secondes à 1 minute sont largement suffisant pour l'étape d'annealing.

3.Extension.

L'extension se fait à une température de 72°C, proche de l'optimum de température la Taq DNA polymérase.

Le temps d'extension dépend principalement de la longueur de la séquence cible. On compte en général 1 minute pour 2000 bp, ce laps de temps étant largement suffisant.

Pour des séquences très longues, on peut augmenter le temps d'élongation jusqu'à 15 minutes.

Au cours des derniers cycles de PCR, la quantité de Taq DNA polymérase peut devenir limitante. Il est donc conseillé de terminer une réaction de PCR par une incubation supplémentaire de 10 minutes à 72°C de manière à assurer la terminaison de toutes les séquences commencées.

X.2.5.Le nombre de cycles.

Le nombre de cycles dépend de la concentration initiale de la séquence à amplifier. Il faut remarquer qu'un nombre de cycles trop important ne peut conduire qu'à une accumulation supplémentaire de produits non spécifiques.

En fonction de la quantité de séquences cibles, on pourra appliquer le nombre de cycles suivant :

3×10^6 molécules cibles	25 à 30 cycles.
1.5×10^4	30 à 35 cycles.
1×10^3	35 à 40 cycles.
50	40 à 45 cycles.

A titre d'indication, 1 µg de DNA génomique contient environ 3×10^5 molécules d'une séquence cible unique.

X.2.6.Facteurs affectant la spécificité.

Des températures d'annealing et d'extension élevées, ainsi que des concentrations plus faibles en dNTPs, semblent diminuer le nombre de primers mal appariés ainsi que l'extension de ces mismatchs.

On peut aussi réduire les temps d'annealing et d'extension, limitant ainsi la formation de mismatchs et leur extension.

La réduction des concentrations de primers et d'enzyme limite également le risque de formation de produits non spécifiques.

X.3. Protocole standard d'une PCR.

Il n'existe malheureusement pas un protocole unique pouvant être appliqué pour toutes les réactions de PCR. On peut cependant donner un schéma de départ, qui pourra être adapté en fonction des caractéristiques de la séquence à amplifier (concentration, longueur, complexité, ...).

Remarques préliminaires : étant donné l'énorme possibilité d'amplification des techniques PCR, toutes les mesures doivent être prises pour éviter les contaminations. Pour cela, travailler dans un local isolé des endroits où l'on manipule habituellement du DNA, et réservé du matériel uniquement pour les réactions de PCR.

Matériel :

La Taq DNA polymérase (Proméga) est fournie dans un tampon contenant des agents stabilisants pour les hautes températures. (Solution de stockage : 50 % glycérol, 50 mM Tris-HCl pH8, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 200 µg/ml

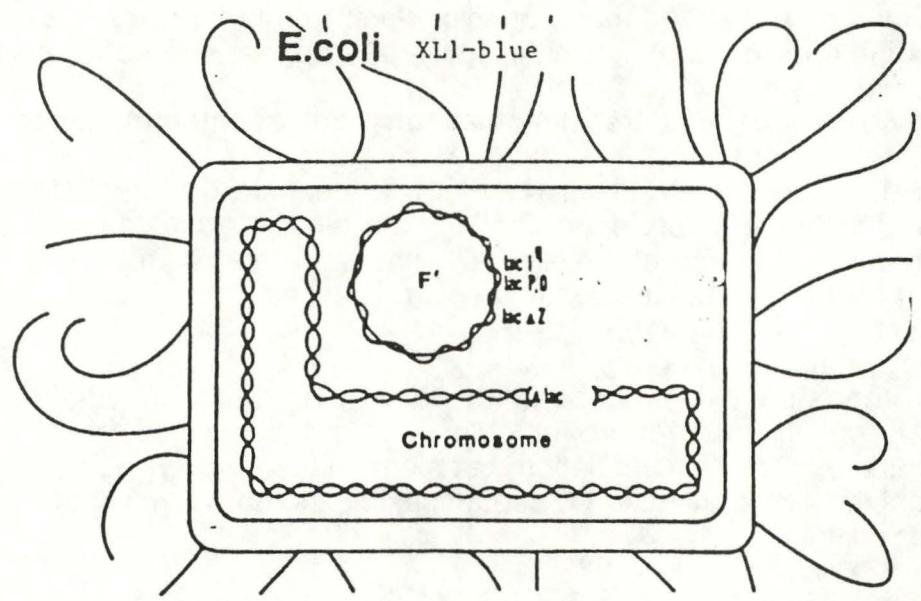


Fig.XI.1. Souche bactérienne XL1 blue.

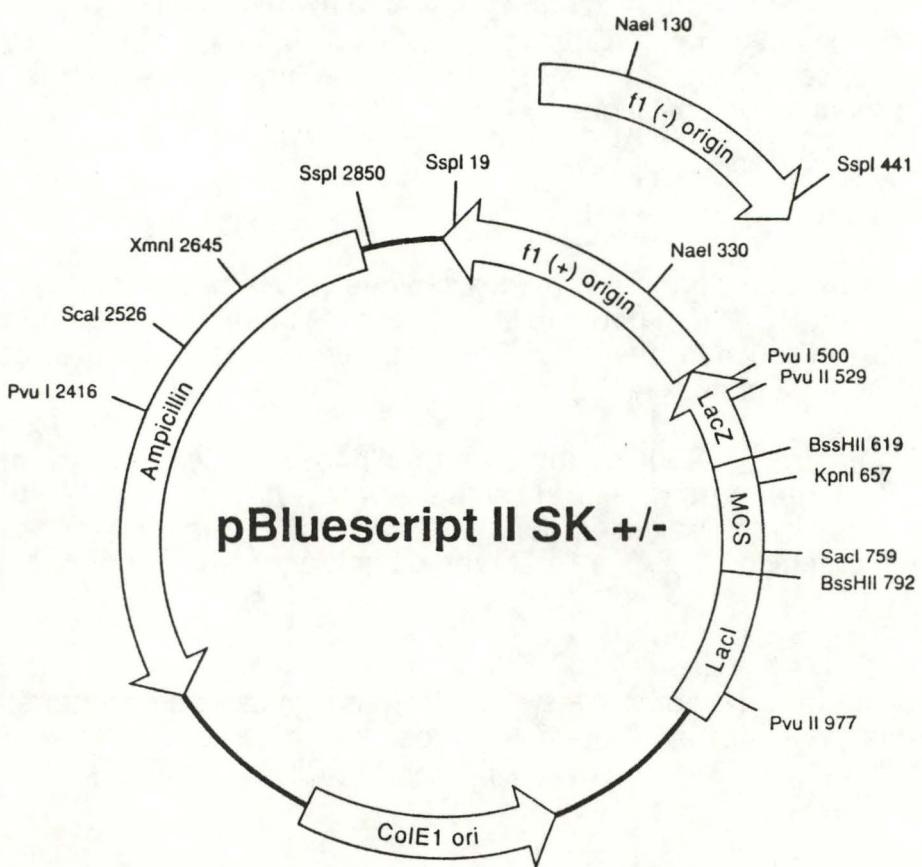


Fig.XI.2. Plasmide *pBluescript SK⁺*.

gélatine, 1.0 % Triton X-100).

La firme fournit également le tampon 10X (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH9, 15 mM MgCl₂, 0.1 % gélatine, 1 % Triton X-100).

Les dNTPs (Amersham), sont dilués à une concentration stocks de 10 mM. Le DNA, ainsi que les primers, ont été préparés ou synthétisés au laboratoire.

Protocole:

1. Dans un tube eppendorf en propylène de 1.5 ml, préparer la solution suivante (Pour 100 µl de réaction) :

- 10 µl de tampon 10 X.
- 200 µM de chaque dNTP.
- 100 picomoles de chaque primer dilué à concentration adéquate dans de l'eau distillée.
- 10⁵ à 10⁶ molécules de DNA cible(par exemple 1 µg de DNA génomique si la séquence à amplifier correspond à un gène unique).
- 2.5 U de Taq DNA polymérase diluée dans de l'eau distillée stérile.
- porter à 100 µl avec de l'eau distillée stérile.

2. Ajouter dans chaque tube quelques gouttes d'huile minérale ,afin d'éviter l'évaporation de la solution de réaction.

3. Placer 1 goutte d'huile dans les puits du cycleur automatique pour assurer un meilleur échange thermique, et placer les tubes dans les puits.

4. Programmer 30 cycles de réaction en suivant le profile suivant :

-Dénaturation : 4' à 95°C	1x.
-Dénaturation: 1' à 95°C	30x.
-Annealing : 1' à 55°C	30x.
-Extension : 2' à 72°C	30x.
-Extension:10' à 72°C	1x.

5. Après réaction, conserver les échantillons à 4°C jusqu'à analyse.

6. Pour vérifier les résultats de la PCR, déposer un dixième de la réaction sur un gel d'agarose 1 %, avec marqueur de poids moléculaire λ coupé par HindIII.

XI. TECHNIQUE DE DNA RECOMBINANT.

XI.1. Souche bactérienne.

La souche bactérienne utilisée est XL1 blue d'E.Coli (fig. XI.1.). Cette souche est rec A1, end A1, gyr A96, thi, hsd R17, rk⁻, mk⁺, sup E44, rel A1, λ⁻, lac⁻.

La souche possède l'épisome F' qui est pro AB, lac I^qZ ΔM15, Tn10(tetR).

Rec A1 réduit le taux de recombinaison entre le DNA endogène et le DNA introduit . End A1 diminue le taux d'endonucléase, préservant le DNA préparé à partir de cette souche.

La souche possède une délétion au niveau de l'opéron lactose (région lacZ), permettant la sélection blanc-bleu.(Voir ci-dessous).

L'épisome F' est responsable de la formation de pili sexuels chez la bactérie. Il porte un marqueur de résistance à la tétracycline, permettant la sélection des bactéries portant l'épisome. Il porte une partie du gène lac Z(ZΔM15) déletée sur le chromosome bactérien (l'extrémité COOH de la β-galactosidase, promoteur et opérateur). L'autre partie devra être fournie par du DNA exogène. Il possède également le gène lac I^q produisant 10 X plus de répresseur que le gène normal, empêchant la transcription de lac Z ,et évitant ainsi les risques de production de

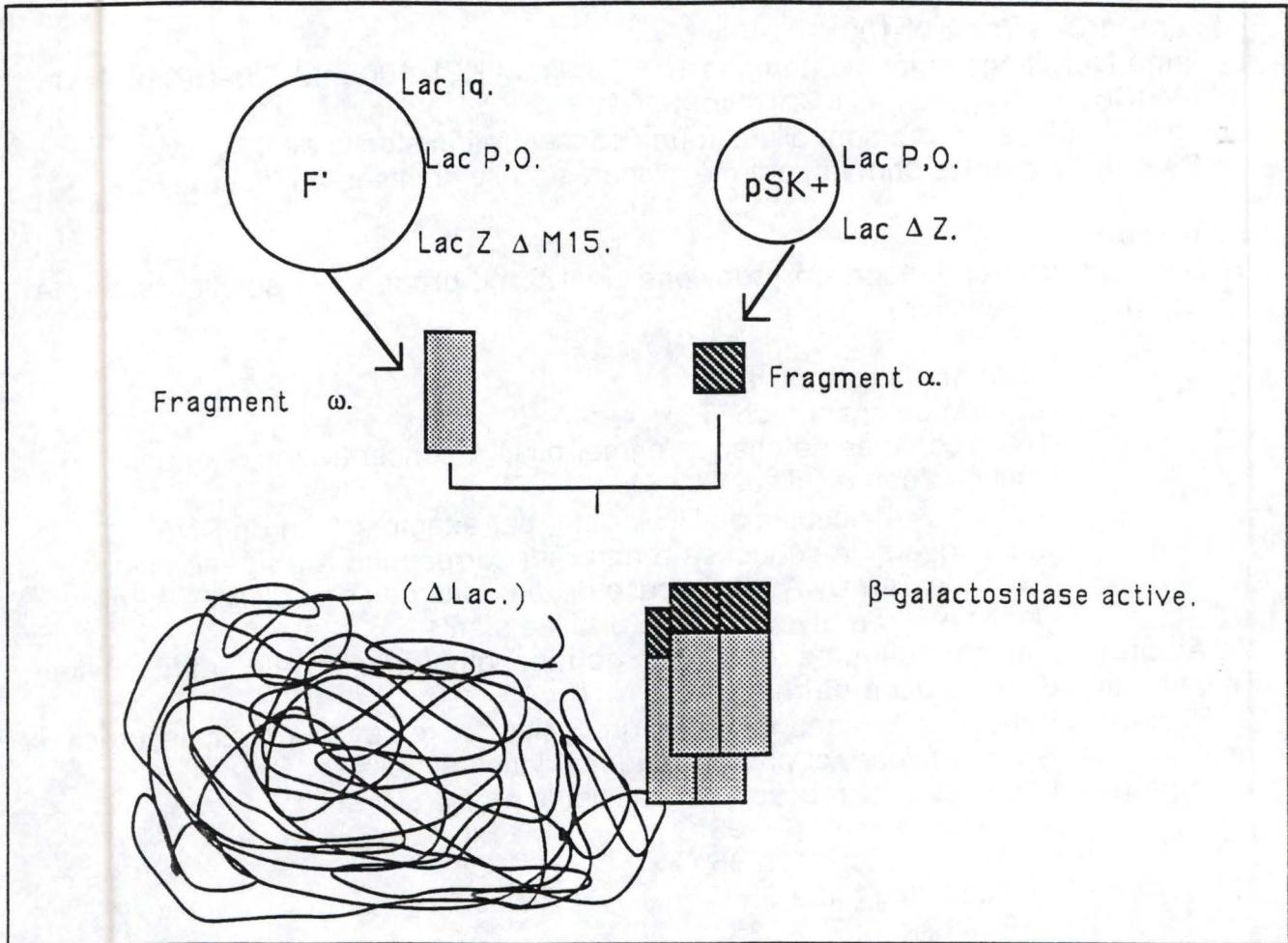


Fig.XI.3. Principe du test blanc-bleu : α - complémentation.

protéines de fusion toxiques lac Z-insert.(La répression peut s'exercer aussi bien sur F' que sur pSK).

XI.2. Le plasmide bactérien.

Le vecteur utilisé est pBluescript SK+ (Stratagene) (fig. XI.2.). Ce plasmide de 2964 bp possède une origine de réPLICATION pour E.Coli, un site multiple de clonage contenant 21 sites uniques, et un gène de résistance à l'ampicilline, permettant la sélection des bactéries ayant incorporé le plasmide.

Il porte également un fragment non opérationnel du gène répresseur lac I et la portion du gène lacZ codant pour l'extrémité NH₂ de la β-galactosidase (plus promoteur et opérateur). Le site multiple de clonage est inséré dans cette région et n'empêche pas la complémentation intragénique.

XI.3. Principe du test blanc-bleu. (fig XI.3.)

Ce test permet la sélection de bactéries ayant incorporé un plasmide recombinant. L'opéron lactose est constitué de 3 gènes (lac Z, lac Y et lac A) intervenant dans le métabolisme du lactose. Le gène lac Z code pour une β-galactosidase (enzyme qui transforme la lactose en glucose + galactose). Cette β-galactosidase est composée de 4 sous-unités peptidiques identiques, associées par interactions faibles pour donner la forme active.

Lorsque la cellule croît dans un milieu riche en glucose ou en l'absence de lactose, la transcription de l'opéron est bloquée par une protéine répresseur codée par le gène lac I q.

En condition naturelle, le lactose (jouant le rôle d'inducteur) se lie au répresseur codé par lac I, et l'inactive, permettant la transcription de l'opéron lactose. On utilise ici un inducteur non dégradable, l'IPTG.

Nous sommes en présence d'un système à 3 composantes :

1. La souche XL1 blue ne possédant pas la région lac Z.
3. Le plasmide pSK+ possédant la portion du gène de la β-galactosidase codant pour l'extrémité NH₂ terminale de la sous-unité peptidique (le fragment α).
3. L'épisome F' possédant la portion du gène de la β-galactosidase codant pour la partie COOH terminale de la sous-unité peptidique(fragment ω) ainsi que pour une partie non fonctionnelle du fragment α .

L'association des fragments α et ω permet la reconstitution d'une β-galactosidase active (α -complémentation, correspondant à une complémentation au sein d'un même gène).

L'activité de la β-galactosidase est mise en évidence par un test coloré. Pour cela, la culture des bactéries est réalisée en présence des composés X-gal et IPTG.

L'X-gal est décomposé par l'enzyme en galactose + un chromophore bleu. On obtient donc des colonies bleues si aucun insert n'a été incorporé dans le plasmide.

Lorsqu'un insert est introduit dans le site multiple de clonage de pSK+, la portion du gène lac Z présente sur ce vecteur est disruptée, ne permettant plus la synthèse d'une β-galactosidase active par complémentation intragénique puisque le fragment α n'est plus produit. On obtiendra donc des colonies blanches.

XI.4. Réaction de restriction.

Linéarisation du vecteur et préparation de l'insert : Voir paragraphe : II. Quelques techniques couramment utilisées en biologie moléculaire.

XI.5. Réaction de ligation.

Principe :

Cette réaction permet de réassocier 2 fragments d'ADN, par exemple un vecteur linéarisé et un insert.

L'enzyme utilisée est la T4 DNA ligase, catalisant la formation d'un lien phosphodiester entre le groupement 5'-phosphate et 3'-OH de 2 fragments adjacents d'ADN bicaténaire. La réaction de ligation peut être réalisée aussi bien sur des extrémités cohésives que sur des molécules à bouts francs. L'enzyme nécessite la présence d'ATP ou de magnésium pour être active.

Seules des réactions mettant en jeu des fragments d'ADN à bouts francs ont été réalisées ici.

Protocole :

Le rapport entre le nombre d'extrémités libres du vecteur (en picomoles) et le nombre d'extrémités libres de l'insert (en picomoles) doit être de 1:2.

1. Préparer le mélange de ligation suivant:

100 ng de vecteur linéarisé.

X ng d'insert pour obtenir un rapport insert: vecteur de 2:1.

2 µl de tampon de ligation 5X(250 mM Tris-HCl pH 7.6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25 % polyéthylène glycol-8000).

6 U de T4 DNA ligase(BRL).

eau distillée stérile jusqu'à 10 µl.

2. Incuber une nuit à température ambiante.

XI.6. Réaction de transformation.

Principe :

Cette réaction permet d'introduire du DNA exogène, par exemple un plasmide recombinant, dans un hôte (ici bactérien).

Pour cela, les bactéries doivent être rendues compétentes, c'est à dire que leur paroi doit être modifiée de manière à permettre la pénétration du DNA étranger.

Les souches d'E.Coli sont rendues compétentes par passage dans une solution hypotonique de chlorure de calcium. Les ions calcium vont déstabiliser la paroi et la membrane, entraînant le gonflement de la bactérie qui prend l'aspect d'un sphéroblaste. Un choc thermique permet la pénétration de l'ADN étranger dans la bactérie.

Les cellules transformées sont ensuite incubées à 37°C en milieu riche pour permettre la régénération de la paroi cellulaire. Les bactéries sont finalement étalées sur un milieu sélectif permettant la croissance des bactéries ayant incorporé le plasmide.

Protocole :

1. Préparation des cellules compétentes.

1. Inoculer 200 ml de milieu LB + tétracycline avec une colonie isolée de XL1 blue.

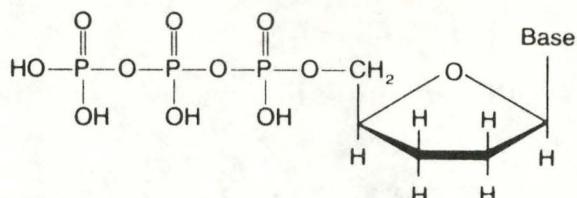
Incuber une nuit à 37°C sous agitation vigoureuse.

2. Ramener la température de la culture à 4°C par incubation sur glace.

3. Centrifuger 7 minutes à froid, à 3000 rpm. (Sorvall, rotor HS4).

4. Resuspendre le culot dans 10 ml de solution de CaCl₂ glacée.(60 mM CaCl₂, 15 % glycérol, 10 mM Tris pH7. Stériliser par passage sur filtre millipore 0,22 µm de diamètre.)

Structure

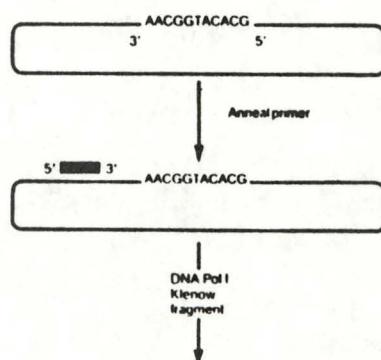


2',3'-Dideoxyribonucleoside 5'-triphosphates

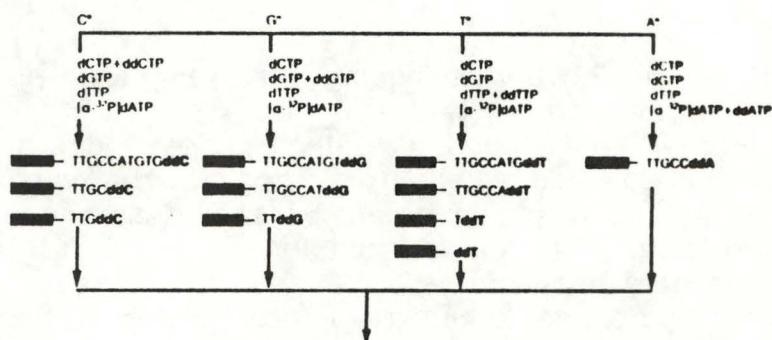
2',3'-Dideoxyadenosine 5'-triphosphate (ddATP)	base = adenine
2',3'-Dideoxycytidine 5'-triphosphate (ddCTP)	base = cytosine
2',3'-Dideoxyguanosine 5'-triphosphate (ddGTP)	base = guanine
2',3'-Dideoxythymidine 5'-triphosphate (ddTTP)	base = thymine

Fig.XII.1.Structure des didéoxyribonucléotides.

The annealing reaction



The sequencing reaction



Gel electrophoresis and autoradiography

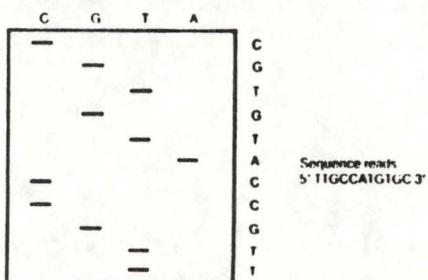


Fig.XII.2.Principe du séquençage par la méthode des didéoxyribonucléotides.(Sanger).

A. Etape d'hybridation : Un des 2 brins du DNA dénaturé (qui sert de matrice) est hybride à un oligonucléotide servant d'amorce pour une DNA polymérase.

B. Etape de polymérisation : La DNA polymérase commence à synthétiser un brin complémentaire au brin matrice à partir de l'amorce et en présence d'un mélange contenant les 4 dNTPs dont un est radioactif(dATP*,dCTP, dGTP, dTTP), et d'un des 4 ddNTPs. Lorsque l'ADN polymérase incorpore un ddNTP, la synthèse s'arrête.

C. Migration sur un gel de polyacrylamide et autoradiographie. Les réactions correspondant à chaque ddNTPs sont déposées sur gel. La lecture de la séquence est réalisée directement en suivant l'ordre d'apparition des bandes sur l'autoradiographie.

5. Laisser 30 minutes sur glace.
6. Centrifuger 5 minutes à 1500 rpm (Sorvall, rotor HS4).
7. Décanter et resuspendre le culot dans 8 ml de solution de CaCl_2 glacée.(2 ml pour 50 ml de la culture originale).
8. Laisser sur glace jusqu'à utilisation ou congeler immédiatement à -70°C pour stockage.

2. Réaction de transformation.

1. Ajouter 2 μl du mélange de ligation à 200 μl de cellules compétentes.
2. Incuber 45 minutes sur glace.
3. Réaliser un choc thermique pendant 3 minutes à 42°C.
4. Ajouter un ml de LB + glucose (4g/l). Agiter et incuber au moins 60 minutes à 37°C.
5. Etaler 100 μl sur boîte LB+ampicilline+tétracycline+IPTG+X-gal.

Contrôles:

- Viabilité des cellules compétentes : Etalement des cellules ayant subi les mêmes traitements que les cellules transformées sur milieu LB simple.
- Transformabilité des cellules compétentes : transformation de la souche bactérienne par le vecteur pSK natif et étalement sur milieu LB + IPTG + Xgal + ampicilline + tétracycline.

XII. SEQUENCAGE.

La technique de séquençage utilisée est basée sur la méthode des didésoxyribonucléotides développée par Sanger.

Les didésoxyribonucléotides diffèrent des désoxyribonucléotides classiques par l'absence de résidu OH en position 3' du désoxyribose (fig. XII.1.). Ces nucléotides, une fois incorporés, ne permettent plus l'ajoute du nucléotide suivant. La synthèse est alors avortée. (D'où le nom de méthode de terminaison de chaînes).

Principes (fig. XII.2.) :

1. Le DNA à séquencer est dénaturé.
2. Un des 2 brins, qui servira de "template" pour une DNA polymérase est hybridé , au niveau de son extrémité 3', à un primer particulier.
3. Le complexe template + primer est mis en présence d'un mélange contenant les quatres dNTPs, dont un est marqué radioactivement, et d'un des 4 ddNTPs. Une DNA polymérase est ensuite ajoutée au mélange. Cette polymérase utilise le primer comme amorce et incorpore au hasard soit un dNTP, permettant la poursuite de la synthèse, soit un ddNTP, conduisant à l'arrêt de la synthèse.
4. La proportion de ddNTPs et de dNTPs est telle que, statistiquement, on obtient l'arrêt de la synthèse d'au moins une molécule d'ADN pour chaque position de la base correspondant au ddNTP sur le brin template.
- On obtient donc, après l'elongation, et pour chaque ddNTP, une série de fragments radioactifs de tailles différentes .
5. Les fragments correspondant à chaque ddNTP sont ensuite séparés sur gel de polyacrylamide, et la séquence peut directement être lue après autoradiographie, comme représenté figure

Protocoles.

1.Réaction de séquençage .

Tous les éléments décrits ci-dessous se trouvent dans un kit de séquençage vendu

Component	G	A	T	C
	Nucleotide Mix	Nucleotide Mix	Nucleotide Mix	Nucleotide Mix
ddGTP	8μM	—	—	—
ddATP	—	6μM	—	—
ddTTP	—	—	9μM	—
ddCTP	—	—	—	8μM
dGTP	85μM	85μM	85μM	85μM
dATP	85μM	85μM	85μM	85μM
dTTP	85μM	85μM	85μM	85μM
dCTP	85μM	85μM	85μM	85μM

Fig.XII.3. Tableau donnant la composition du mélange de ddNTPs et dNTPs pour chaque réaction de terminaison.

par Proméga. Ce kit utilise la T7 DNA Polymérase, et fait appel à un protocole en 4 étapes développé par Tabor et Richardson.

A. Dénaturation.

1. Dans un eppendorf, ajouter 4 µg de DNA plasmidique.
2. Porter le volume à 8 µl avec de l'eau stérile.
3. Ajouter 2 µl de NaOH 2N.
4. Incuber 10 minutes à température ambiante.
5. Ajouter : 3 µl de NaAc 3M, pH 4.6.
 - 7 µl d'eau distillée stérile
 - 60 µl d'éthanol absolu froid.
6. Mélanger et incuber une heure à -20°C.
7. Centrifuger 15 minutes à 4°C à 12000 rpm. (Janetzky).
8. Décanter et rincer le culot à l'éthanol 70 %.
9. Sécher sous vide.

Le culot sec peut être conservé à -20°C si les étapes suivantes ne sont pas réalisées immédiatement.

B. Hybridation du template dénaturé et du primer.

Le rapport template-primer doit être d'environ 2:1 en picomoles.

1. Au sommet du tube eppendorf contenant le DNA dénaturé, ajouter :
 - 2 µl de 5X T7 sequencing buffer.(200 mM Tris-HCl, pH7.5; 50 mM MgCl₂; 250 mM NaCl).
 - 2 µl (20 ng) de primer.
 - 6 µl d'eau distillée stérile.
2. Passer à la minifuge pour déposer les réactifs dans le fond du tube.
3. Incuber 15 minutes à 37°C.
4. Pendant ce temps, préparer 4 tubes eppendorfs, les noter A,C,G,et T. Ajouter dans chaque tube 2.5 µl du mélange ddNTP+dNTPs correspondant .(Composition du ddNTPs mix : voir fig XII.3.).

C. Etape de marquage.

Cette étape va permettre le marquage du brin néoformé. Pour cela, les 4 dNTPs, dont un est marqué radioactivement, sont fournis en quantité limitante à la T7 DNA polymérase. Ceci permet la synthèse à partir du primer d'un court brin marqué de quelques dizaines de nucléotides.

1. A la fin des 15 minutes d'incubation, diluer la T7 DNA polymérase à une concentration de 1.5 U /µl dans du TE.
2. Diluer une quantité adéquate de 5X labeling mix dans de l'eau. 2 µl sont nécessaire par set de 4 réactions.(labeling mix : dCTP, dGTP, dTTP, 7.5 µM chaque).
3. Au sommet de chaque tube contenant le template et le primer hybridé, ajouter :
 - 1 µl de DTT(100mM)
 - 2 µl du labeling mix dilué
 - 1 µl de α-[S-35] dATP
 - 2 µl de T7 DNA polymérase diluée.
4. Minifuge pour déposer les réactifs dans le fond du tube.
5. Incuber 5 minutes à température ambiante . Pendant ce temps, préincuber les tubes ddNTPs mix à 37°C.

D. Etape de terminaison.

Au cours de cette étape, le template + le primer allongé* et la T7 DNA polymérase sont mis en présence de chaque ddNTP, dans 4 réactions de terminaison séparées.

1. Immédiatement à la fin des 5 minutes d'incubation de la réaction de marquage, ajouter au sommet de chaque tube ddNTP préchauffé, 3.5 µl du mélange de marquage.
2. Passer à la minifuge pour déposer les réactifs dans le fond du tube.
Bien placer le mélange de marquage au sommet du tube et centrifuger tous les tubes en même temps pour que les réactions démarrent simultanément pour chaque ddNTP.
3. Incuber 5 minutes à 37°C.
4. Ajouter 4 µl de stop solution(bleu de migration) pour arrêter les réactions.(Stop solution : 10 mM EDTA, 95% formamide, 0.1% bleu de bromophénol, 0.1% xylène cyanole).
5. Charger sur le gel ou stocker à -20°C.

2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide.

A. Préparation des plaques.

1. Laver 2 plaques de verre à l'eau de ville , puis eau distillée et ensuite éthanol.
2. Siliconer la face de la petite plaque qui sera en contact avec le gel avec 10 ml de Repelcote.
3. Placer les spacers entre les 2 plaques.
4. Sceller les plaques au ruban adhésif et maintenir le tout par des pinces.

B. Préparation du gel.

1. Dans un berlin, ajouter 50 g d'urée
15 ml d'acrylamide 40%
10 ml de TBE 10X modifié pour séquençage(121.1g/ l de Tris, 55 g/l d'acide borique, 7.4 g/l EDTA. Ajuster à pH8.3).
35 ml d'eau distillée.
2. Après dissolution de l'urée, filtrer la solution sur Buchner (filtre millipore SA 78 BUC).
3. Ajouter rapidement et dans l'ordre : 1 ml de persulfate d'ammonium 10 %.
20 µl de Temed.
4. Couler le gel incliné à 45° pour éviter la formation de bulles.
5. Insérer les peignes en position inversée, le bord plat en contact avec le gel
6. Laisser les plaques en position horizontale pour polymérisation(environ 1 heure)
7. Le gel peut être conservé à 4°C.

C. Migration et autoradiographie.

1. Après polymérisation du gel, enlever les pinces et l'adhésif. Retirer prudemment les peignes et rincer le sommet du gel avec du TBE 1X.
2. Placer le gel dans l'appareil d'electrophorèse(BRL , modèle S2), la petite plaque faisant face à l'appareil.
2. Remplir les cuves de TBE 1X.

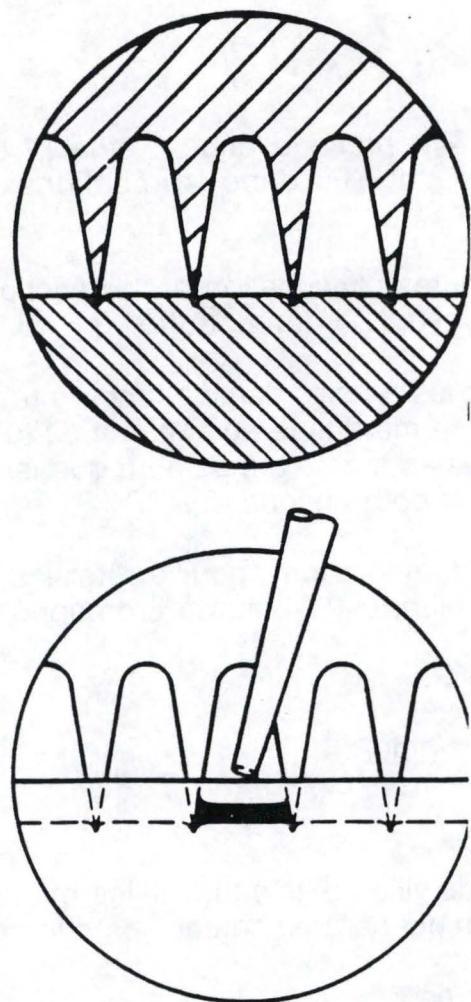


Fig.XII.4. Mise en place du peigne et dépôt des échantillons.

3. Rincer les peignes et les placer de telle manière qu'ils fassent contact avec le gel, sans en percer la surface (fig. XII.4.).
4. Préchauffer le gel 1 heure en le faisant migrer dans les mêmes conditions que celles qui seront appliquées lors de la migration des échantillons.(1700 V, 37 mA, 60 Watts).
- 5.Dénaturer les échantillons 3 minutes dans l'eau bouillante avant le dépôt, et placer immédiatement sur glace pour empêcher la renaturation.
6. Rincer les puits avec du TBE 1X , et déposer 2.5 μ l d'échantillon par puits dans un ordre standard A, C, G, T . Faire migrer.
7. Après migration, recueillir le gel sur la grande plaque et placer celle-ci dans un bain de fixateur(méthanol 10%, acide acétique 10 %), pendant 20 minutes.
- 8.Transférer le gel sur une feuille de papier Whatman 3MM, et couvrir le tout de papier glad.
- 9.Sécher le gel sous vide , à 80°C, pendant 1 heure.
- 10.Placer le gel absorbé sur le papier Whatman dans une cassette pour autoradiographie,et placer un film(Kodack X-Omat- AR) directement sur le papier.
11. Laisser une nuit , ou plus, à température ambiante, avant de développer.

Chapitre III.

RESULTS ET DISCUSSION.

I. MAPPING DU LOCUS DE LA SORCINE.

Le but de ces expériences consiste à localiser le gène codant pour la sorcine par rapport au locus *reeler*.

I.1. Mise en évidence d'un polymorphisme de restriction entre les lignées "B6" et "C" pour le locus de la sorcine.

Afin de pouvoir calculer la distance génétique *reeler-sorcine*, il est nécessaire de mettre en évidence un polymorphisme de restriction entre les lignées "B6" et "C" pour une sonde spécifique du locus de la sorcine. Nous avons utilisé la sonde pCP7, d'environ 500 nucléotides et clonée dans le plasmide pUC9 (Van der Bliek et al., 1986b), fournie par P.Borst et A.Vinken (Nederlands Kanker Instituut).

I.1.1. Récupération de l'insert pCP7.

La souche Y1090 d'*E.Coli* a été transformée par le vecteur pUC9, dans lequel la sonde pCP7 est clonée au niveau d'un site *Pst1*. Une maxiprep a été réalisée à partir de 200 ml de culture. L'insert est récupéré après digestion par *Pst1*, et purifié sur membrane de DEAE. La concentration de l'insert a été estimée sur minigel à 72 µg / µl , dans un volume de 20 µl. L'insert est conservé à -20°C.

I.1.2. Mise en évidence d'un polymorphisme de restriction.

10 µg de DNA de souris "B6", "C", C.B6-*rEd*, C-*rOrl* et B6-*rEd* sont digérés trois heures par l'enzyme *Msp1* à 37°C. Cette enzyme a été choisie parce que les 2 sondes mp2 et pCHP1 montraient déjà un polymorphisme de restriction après digestion par *Msp1*. Le produit de digestion est réparti en 2 minigels d'agarose 0.8%. Après électrophorèse, le DNA est transféré sur membrane de nylon Hybond-N+ par la technique du Southern blotting alcalin. 30 ng de l'insert pCP7 sont marqués au [P-32] par la technique du "multiprime DNA labelling system". Après préhybridation, les membranes sont incubées une nuit avec la sonde marquée, à 65°C, sous agitation modérée. Le lendemain, les lavages sont réalisés dans les conditions suivantes :

- SSPE 2 X, SDS 0.1 % : 15' à 65°C.
- SSPE 1 X, SDS 0.1 %: 15 ' à 65°C.
- SSPE 0.3 X, SDS 0.1 % : 15' à 65°C.
- SSPE 0.1 X, SDS 0.1 % : 15' à 65°C.

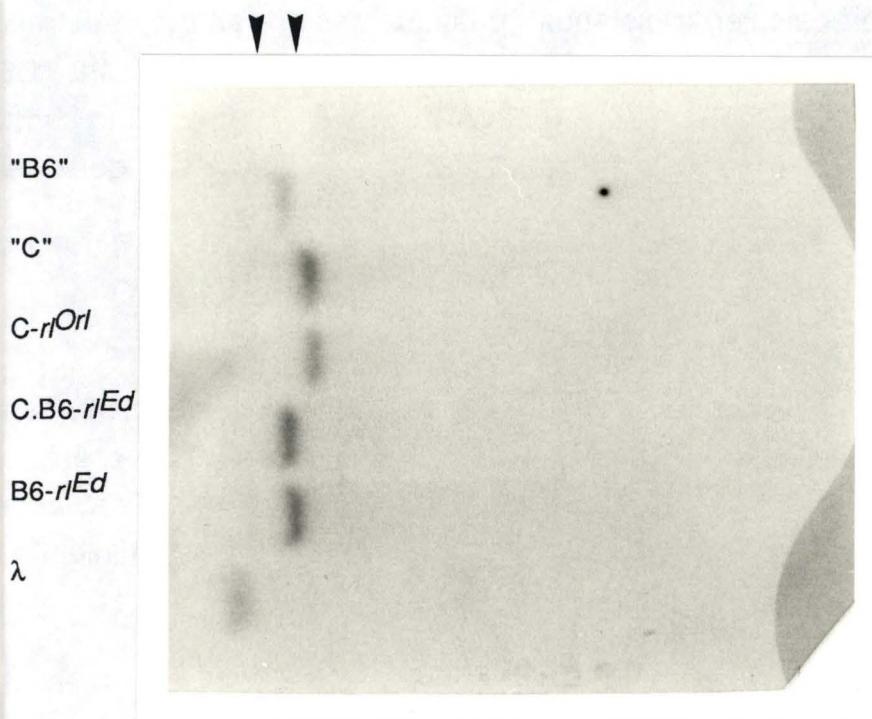


Figure I.1. Mise en évidence d'un polymorphisme de restriction entre les lignées "B6" et "C" pour la sonde pCP7, spécifique du locus de la sorcine. Une bande de ≈ 9.5 Kb est reconnue pour la lignée "B6" et une bande de ≈ 7.5 Kb est reconnue pour la lignée "C". La lignée congénique C.B6-*r1Ed* montre un polymorphisme identique à celui de la lignée "B6".

Le film d'autoradiographie est développé après 2 jours. Les résultats, présentés figure I.1, montrent que la sonde pCP7 donne également un polymorphisme de restriction entre les lignées "B6" et "C" après digestion par *MspI*. Une bande de ≈ 9.5 Kb est reconnue par la sonde pCP7 pour le DNA de souris "B6" et une bande de ≈ 7.5 Kb pour le DNA de souris "C". Ces résultats nous montrent également que le locus de la sorcine est assez proche de *reeler*, puisque le polymorphisme mis en évidence pour la lignée congénique C.B6-*r1Ed* correspond au polymorphisme de la lignée "B6". Ceci veut donc dire que le gène codant pour la sorcine est compris dans le fragment de 12 à 20 cM, provenant de la lignée "B6" et entourant le locus *reeler*.

I.2.Calcul de la distance génétique entre le locus de la sorcine et le locus *reeler*.

I.2.1. Croisements réalisés.

Des mâles "C" homozygotes *r1Orl/r1Orl* sont croisés avec des femelles "B6" $+/-$. Les descendants F1 sont de génotype *r1Orl/+*. Les femelles F1 sont "backcrossées" avec un mâle homozygote *r1Orl/r1Orl* pour donner les descendants N2. 127 animaux backcross ont été obtenus, pour lesquels le caractère *reeler* est déterminé par dissection du cerveau, et le DNA est extrait à partir du foie, de la rate, des reins et du thymus pour analyse en Southern.

I.2.2. Interprétation des backcross.

Les principes sont les mêmes que ceux exposés dans l'introduction pour le calcul de la distance *reeler- mdr-1* et *reeler-En-2*.

Les individus F1 peuvent fournir 4 types de gamètes (figure I.2.a. et 1.2.b.) :

Non recombinants :

Le locus de la sorcine de type "C" et un allèle *reeler Orléans*.

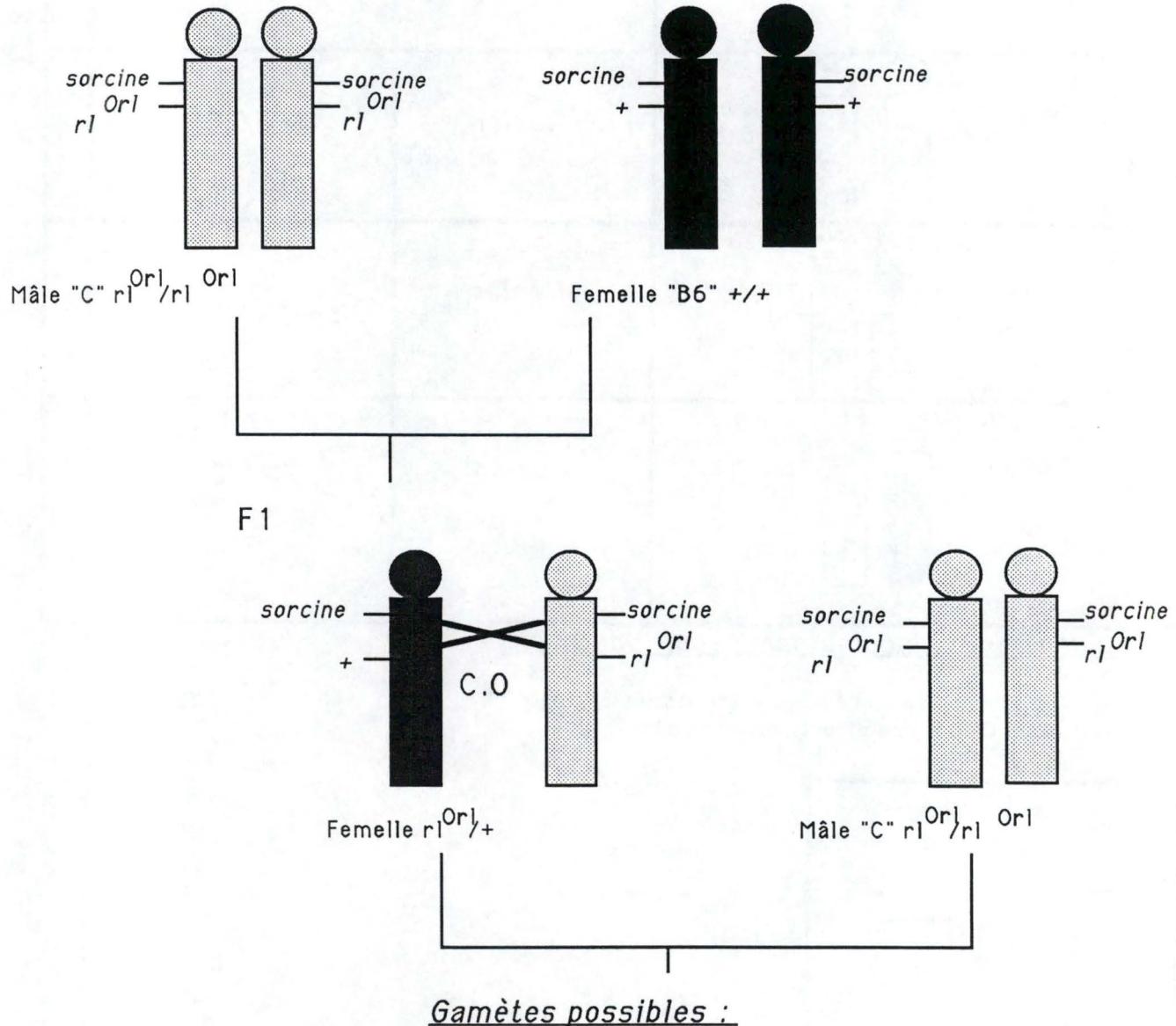
Le locus de la sorcine de type "B6" et un allèle *reeler* de type sauvage.

Recombinants :

Le locus de la sorcine de type "B6" et un allèle *reeler Orléans*.

Le locus de la sorcine de type "C" et un allèle *reeler* de type sauvage .

Application des backcross au calcul de la distance reeler - sorcine.



Gamètes possibles :

Mère :	Père :			
<u>Non recombinants.</u>	<u>Recombinants.</u>			

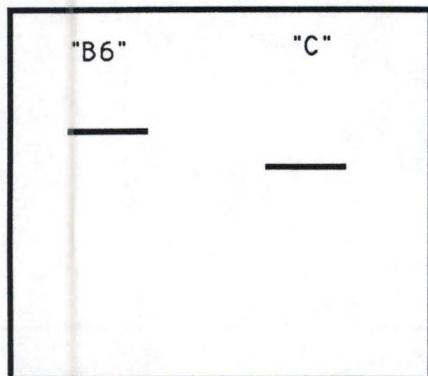
Figure I.2.a.: Détermination de la distance *reeler-sorcine* : croisements réalisés.

Individus backcross : génération N2.

	Génotype des backcross.	Phénotype.	Polymorphisme pCP7.
R E C O M B I N A N T S		Normal	"C"/"B6"
		Reeler	"C"/"C"
R E C O M B I N A N T S		Reeler	"C"/"B6"
		Normal	"C"/"C"

Mise en évidence des recombinants sur Southern.

Pour rappel : polymorphisme présenté entre les lignées "B6" et "C" pour la sonde pCP7 après digestion par msp1.



Individus non recombinants

Normal
"C"/"B6"

Reeler
"C"/"C"

Individus recombinants

Reeler
"C"/"B6"

Normal
"C"/"C"

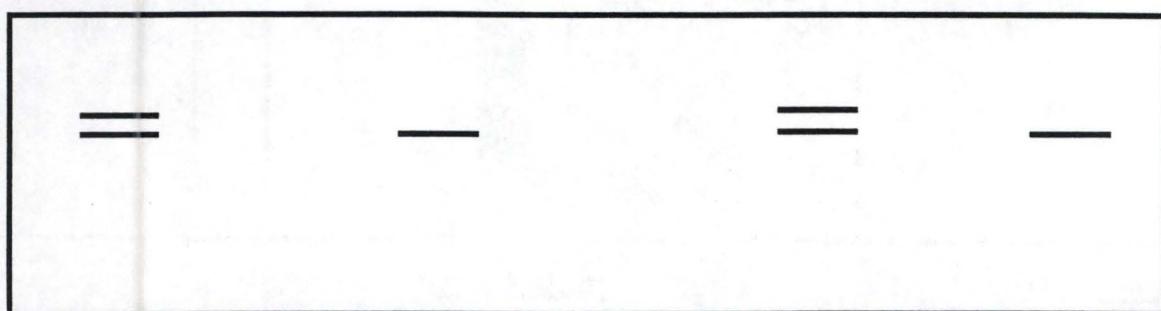


Figure 1.2.b.: Détermination de la distance *reeler-sorcine*. Mise en évidence des individus recombinants.

· Après croisement avec un mâle $r1Orl/r1Orl$ ("C"), les descendants N2 possibles sont :

Non recombinants :

1. Un allèle *reeler Orléans* et un allèle sauvage pour le gène *reeler*. Un allèle *sorcine* sur fond "C" et un allèle *sorcine* sur fond "B6". Le cerveau est normal à la dissection. Le polymorphisme de restriction pour la sonde pCP7 correspond au polymorphisme de la lignée "C" + le polymorphisme de la lignée "B6".
2. Deux allèles *reeler Orléans*. Les 2 allèles de la *sorcine* sur fond "C". Le cerveau est de phénotype *reeler*. Le polymorphisme pour la sonde pCP7 est identique à celui de la lignée "C".

Recombinants:

1. Deux allèles *reeler Orléans*. Un locus *sorcine* sur fond "C" et un locus *sorcine* sur fond "B6". Le cerveau présente un phénotype *reeler* à la dissection. Le polymorphisme pour la sonde pCP7 correspond au polymorphisme pour la lignée "C" + le polymorphisme pour la lignée "B6".
2. Un allèle *reeler Orléans* et un allèle sauvage du gène *reeler*. Les 2 allèles de la *sorcine* sur fond "C". Le cerveau est normal à la dissection. Le polymorphisme correspond à celui de la lignée "B6".

En résumé :

Non recombinants.	Recombinants.
Polymorphisme "C"/"C". Cerveau <i>reeler</i> .	Polymorphisme "C"/"C". Cerveau normal.
Polymorphisme "C"/"B6". Cerveau normal.	Polymorphisme "C"/"B6" Cerveau <i>reeler</i>

I.2.3. Résultats des backcross.

Un exemple de Southern est donné figure I.3. Les résultats correspondant aux 127 backcross sont présentés dans le tableau suivant :

Backcross n°

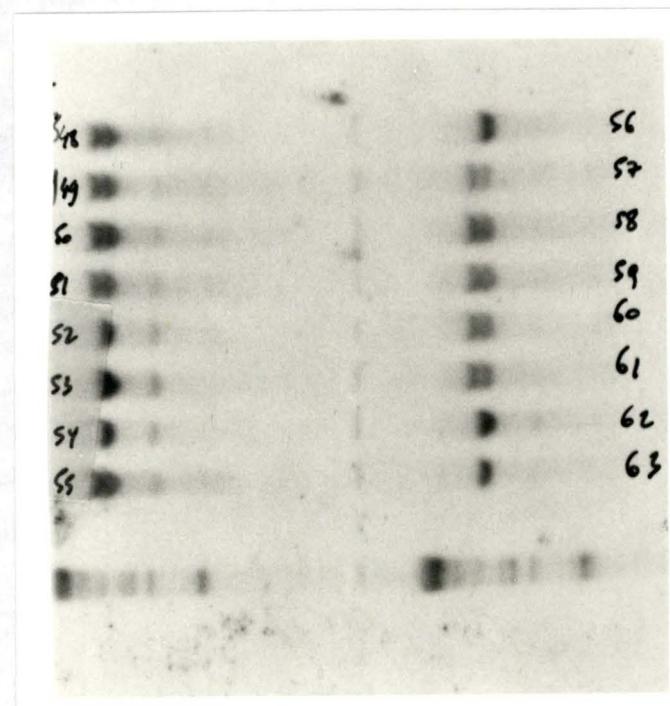


Figure I.3. Analyse en Southern des individus backcross.

Pour l'analyse: 5 µg de DNA sont digérés 3 heures par *MspI* pour chaque backcross. Après électrophorèse en gel d'agarose 0.8 %, le DNA est transféré sur membrane de nylon. Les marquages sont réalisés dans les mêmes conditions que pour la mise en évidence du polymorphisme de restriction. Tous les backcross sont non recombinants, sauf le n° 56.

BC.n°	Phénotype du cerveau.	Polymorphisme pCP7.	BC. n°.	Phénotype du cerveau.	Polymorphisme pCP7.	BC. n°.	Phénotype du cerveau.	Polymorphisme pCP7.
1	normal	"C"/"B6"	45	normal	"C"/"B6"	88	normal	"C"/"B6"
2	normal	"C"/"B6"	46	normal	"C"/"B6"	89	normal	"C"/"B6"
3	normal	"C"/"B6"	47	normal	"C"/"B6"	90	normal	"C"/"B6"
4	normal	"C"/"B6"	48	normal	"C"/"B6"	91	reeler	"C"/"C"
6	normal	"C"/"B6"	49	normal	"C"/"B6"	92	reeler	"C"/"C"
7	reeler	"C"/"C"	50	normal	"C"/"B6"	93	normal	"C"/"B6"
8	reeler	"C"/"C"	51	normal	"C"/"B6"	94	normal	"C"/"B6"
9	normal	"C"/"B6"	52	reeler	"C"/"C"	95	normal	"C"/"B6"
<u>10</u>	<u>normal</u>	<u>"C"/"C"</u>	53	reeler	"C"/"C"	96	normal	"C"/"B6"
11	reeler	"C"/"C"	54	reeler	"C"/"C"	97	normal	"C"/"B6"
<u>12</u>	<u>reeler</u>	<u>"C"/"B6"</u>	55	normal	"C"/"B6"	98	normal	"C"/"B6"
13	reeler	"C"/"C"	<u>56</u>	<u>normal</u>	<u>"C"/"C"</u>	99	reeler	"C"/"C"
14	reeler	"C"/"C"	57	normal	"C"/"B6"	100	reeler	"C"/"C"
15	reeler	"C"/"C"	58	normal	"C"/"B6"	101	reeler	"C"/"C"
16	reeler	"C"/"C"	59	normal	"C"/"B6"	102	reeler	"C"/"C"
17	normal	"C"/"B6"	60	normal	"C"/"B6"	103	normal	"C"/"B6"
18	normal	"C"/"B6"	61	normal	"C"/"B6"	104	normal	"C"/"B6"
19	normal	"C"/"B6"	62	reeler	"C"/"C"	<u>105</u>	<u>normal</u>	<u>"C"/"C"</u>
20	normal	"C"/"B6"	63	reeler	"C"/"C"	106	normal	"C"/"B6"
21	normal	"C"/"B6"	64	reeler	"C"/"C"	107	normal	"C"/"B6"
22	normal	"C"/"B6"	65	reeler	"C"/"C"	108	normal	"C"/"B6"
23	normal	"C"/"B6"	<u>66</u>	<u>reeler</u>	<u>"C"/"B6"</u>	109	reeler	"C"/"C"
24	normal	"C"/"B6"	67	normal	"C"/"B6"	110	reeler	"C"/"C"
25	normal	"C"/"B6"	68	normal	"C"/"B6"	111	reeler	"C"/"C"
26	normal	"C"/"B6"	<u>69</u>	<u>normal</u>	<u>"C"/"C"</u>	112	normal	"C"/"B6"
27	reeler	"C"/"C"	70	reeler	"C"/"C"	113	normal	"C"/"B6"
28	reeler	"C"/"C"	71	reeler	"C"/"C"	114	normal	"C"/"B6"
29	reeler	"C"/"C"	72	reeler	"C"/"C"	115	normal	"C"/"B6"
30	reeler	"C"/"C"	73	reeler	"C"/"C"	116	normal	"C"/"B6"
31	reeler	"C"/"C"	74	reeler	"C"/"C"	117	normal	"C"/"B6"
32	reeler	"C"/"C"	75	reeler	"C"/"C"	118	reeler	"C"/"C"
33	reeler	"C"/"C"	76	reeler	"C"/"C"	119	reeler	"C"/"C"
34	reeler	"C"/"C"	77	reeler	"C"/"C"	120	reeler	"C"/"C"
35	reeler	"C"/"C"	78	normal	"C"/"B6"	121	reeler	"C"/"C"
36	reeler	"C"/"C"	79	normal	"C"/"B6"	122	reeler	"C"/"C"
37	reeler	"C"/"C"	80	normal	"C"/"B6"	123	reeler	"C"/"C"
38	reeler	"C"/"C"	81	reeler	"C"/"C"	124	normal	"C"/"B6"
39	reeler	"C"/"C"	82	reeler	"C"/"C"	125	normal	"C"/"B6"
<u>40</u>	<u>reeler</u>	<u>"C"/"B6"</u>	<u>83</u>	<u>reeler</u>	<u>"C"/"B6"</u>	126	reeler	"C"/"C"
41	normal	"C"/"B6"	<u>84</u>	<u>reeler</u>	<u>"C"/"B6"</u>	127	reeler	"C"/"C"
42	normal	"C"/"B6"	85	reeler	"C"/"C"			
43	reeler	"C"/"C"	86	reeler	"C"/"C"			
44	normal	"C"/"B6"	87	reeler	"C"/"C"			

I.2.4. Estimation de la distance *reeler-sorcine* à partir des résultats des backcross.

Parmi les 127 descendants N2, 9 individus recombinants ont été obtenus (voir tableau ci-dessus).

Le pourcentage de recombinaison, ainsi que l'erreur standard, sont calculés selon Green (1981) :

$$r = \frac{f_2 + f_3}{n} \quad SE_r = \left(\frac{r(1-r)}{n} \right)^{1/2}$$

Avec r : pourcentage de recombinaison.

f₂ et f₃ : nombre de descendants pour chaque type de recombinant.

n : nombre d'animaux N2.

SE_r : erreur standard.

Ici : f₂ (recombinants "C"/"C"-normal) : 4 recombinants.

f₃ (recombinants "C"/"B6"-*reeler*) : 5 recombinants.

n : 127.

$$\text{Donc : } r = \frac{4+5}{127} = 0.0708 = 7.1\% \quad SE_r = \left[\frac{0.0708(1-0.0708)}{127} \right]^{1/2} = 0.0227 = 2.3\%$$

Ceci nous donne une distance estimée entre le locus *reeler* et le locus de la sorcine de **7.1 ± 2.3 cM**.

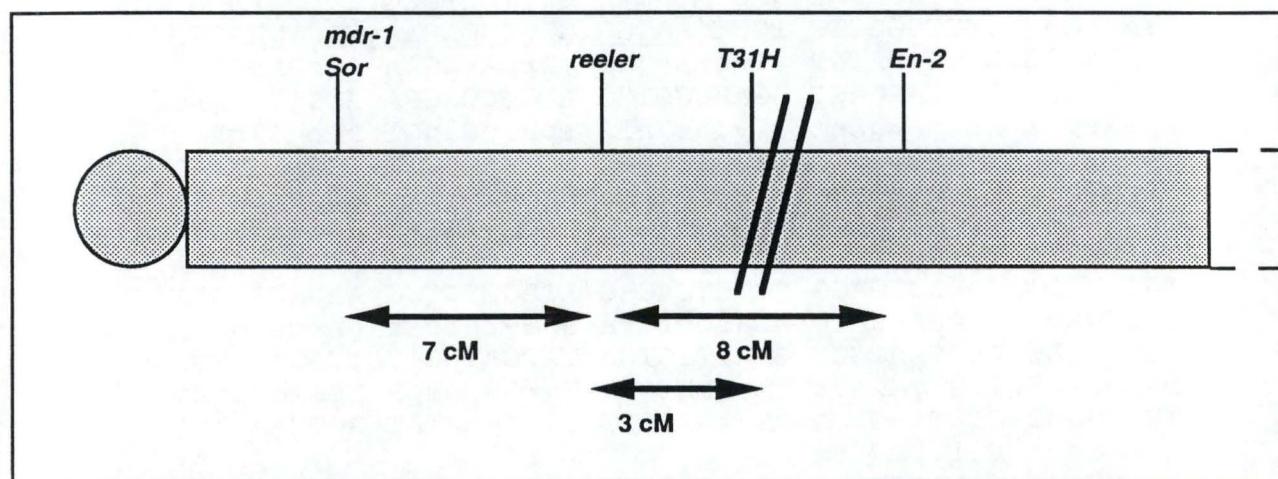
I.3. Discussion : organisation de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris.

En parallèle de la localisation du locus de la sorcine par rapport à *reeler*, le laboratoire a estimé les distances séparant le locus *reeler* du locus *mdr-1*, le locus *reeler* du locus *En-2* et le locus *reeler* du point de translocation *T31H*. Sur les 127 backcross testés, 9 recombinaisons ont été mises en évidence entre le locus *reeler* et le locus *mdr-1*. 10 recombinaisons ont été observées entre le locus *reeler* et *En-2*. Aucune recombinaison n'a été mise en évidence entre le locus de la sorcine et le locus *mdr-1*, c'est-à-dire que ces 2 loci recombinent toujours en même temps par

rapport à *reeler*, indiquant leur association étroite sur le chromosome. Le nombre de recombinants entre *mdr-1/sorcine* et *En-2* est de 19, c'est-à-dire la somme des recombinants pour *mdr-1/sorcine* par rapport à *reeler* et pour *En-2* par rapport à *reeler*. Ces résultats permettent d'estimer la distance *reeler-En-2* à 7.9 ± 2.4 cM et la distance *reeler-mdr-1* à 7.1 ± 2.3 cM (identique à la distance *reeler-sorcine*). La distance séparant *mdr-1/sorcine* de *En-2* est estimée à 15.0 ± 3.2 cM.

Le nombre de backcross actuellement obtenus pour l'estimation de la distance *T31H-reeler* est assez faible, étant donné la difficulté d'élever des animaux porteur à la fois de la translocation et de la mutation *reeler*. Sur les 32 animaux obtenus, aucun recombinant n'a été observé. Ceci nous donne une distance *T31H-reeler* < à 3 ± 3 cM.

Ces résultats nous permettent d'établir l'organisation suivante pour l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris:



Les résultats obtenus permettent également de tirer quelques conclusions sur l'organisation de l'amplicon MDR chez la souris. Ainsi, le locus *mdr-1* et celui de la *sorcine* sont étroitement liés chez la souris (aucune recombinaison n'a été observée entre ces 2 loci). Ceci indique que le gène de la *sorcine* est situé à proximité des gènes codant pour les P-glycoprotéines chez la souris, ce qui est déjà le cas chez le hamster (Jongsma, 1990). L'organisation de l'amplicon MDR chez la souris pourrait donc être similaire à celle de l'amplicon MDR chez le hamster.

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
CAGAGGCGTA	GTCTTCACCA	TGGCGTATCC	CGGGCACCCCT	GGCGCCGGCG	50
M etAlaTyrPr	oGlyHisPro	GlyAlaGlyG			
<u>GCGGGTACTA</u>	<u>CCCAGGCGGG</u>	<u>TATGGAGGAG</u>	<u>CTCCTGGAGG</u>	<u>GCCTTCGTT</u>	100
1yGlyTyrTy	rProGlyGly	TyrGlyGlyA	laProGlyG1	yProSerPhe	
CCCGGACAAA	CTCAGGATCC	GCTCTATGGT	TACTTCGCGT	CTGTGGCTGG	150
ProGlyGlnT	hrGlnAspPr	oLeuTyrGly	TyrPheAlaS	erValAlaG1	
ACAGGATGGA	CAAATTGATG	CTGATGAGTT	GCAGAGATGT	CTAACACAGT	200
yGlnAspGly	GlnIleAspA	laAspGluLe	uGlnArgCys	LeuThrGlnS	
CTGGCATTGC	TGGGGGATAC	AAACCTTTA	ATCTGGAGAC	TTGTCGCCTT	250
erGlyIleAl	aGlyGlyTyr	LysProPheA	snLeuGluTh	rCysArgLeu	
ATGGTTTCAA	TGTTGGACAG	AGATATGTCT	GGCACCATGG	GATTCAATGA	300
MetValSerM	etLeuAspAr	gAspMetSer	GlyThrMetG	lyPheAsnG1	
ATTAAAGAG	CTCTGGGCTG	TGCT <u>GAATGG</u>	<u>CTGGAGACAA</u>	<u>CACTT</u> CATCA	350
uPheLysGlu	LeuTrpAlaV	alLeuAsnG1	yTrpArgGln	HisPheIleS	
GTGGTACAG	TGACAGGGAGT	GGAACGGTGG	ATCCCCAGGA	ACTGCAGAAG	400
erPheAspSe	rAspArgSer	GlyThrValA	spProGlnG1	uLeuGlnLys	
GCTCTGACGA	CGATGGGATT	CAGATTGAAC	CCCCAAACTG	TGAATTCAAT	450
AlaLeuThrT	hrMetGlyPh	eArgLeuAsn	ProGlnThrV	alAsnSerIl	
TGCAAAGCGA	TACAGCACCA	GTGGGAAGAT	CACCTTGAT	GAECTACATCG	500
eAlaLysArg	TyrSerThrs	erGlyLysIl	eThrPheAsp	AspTyrIleA	
CCTGCTGTGT	CAAAC TGAGG	GCTCTCACAG	ATAGCTTTCG	AAGACGGGAT	550
laCysCysVa	1LysLeuArg	AlaLeuThrA	spSerPheAr	gArgArgAsp	
TCTGCTAAC	AAGGAATGGT	GAATTCTCA	TATGATGATT	TCATTCACTG	600
SerAlaGlnG	lnGlyMetVa	1AsnPheSer	TyrAspAspP	heIleGlnCy	
TGTCATGACC	GTCTAAGTCA	AGAAGAAGTT	GTCTGAATAT	ACTAACATT	650
sValMetThr	Val...				
CCAAGCTGAGC	CCAAGCTTGC	TTCCCTCCTGC	CTTCAGTGCT	GTGTGCAGAT	700
TTCCAACAAC	ACTCCCTGAC	AACTGTTGAA	CGGGATTGTG	ACTTTATATA	750
CAACCGAAGC	TTCATTTTA	ATTTGATAA	TAAATCCCTG	AGGTTCAATT	800
AATATAAGAA	CAAGTGTGTT	GTACCAGCCA	GAACCTACCT	TGAGCCACTA	850
TTAACCAAGGC	CTTATTTC	TGCTGTCTT	TATATAAACT	TAAGTATGCA	900
GAGAGTTAA	AGCATATTGT	TATATTCTT	GTGACATGAA		940

Figure II.1.a. Séquence de la sorcine de hamster.

Le premier encadré (bp 56 à 77) correspond à la séquence du primer sorcine 1. La séquence du primer sorcine 2 est complémentaire de celle du deuxième encadré (bp 374 à 395).

II. TENTATIVE DE MISE EN EVIDENCE D'UN POLYMORPHISME POUR LE LOCUS DE LA SORCINE PAR PCR ET ESSAI D'ISOLEMENT DU GENE CHEZ LA SOURIS.

Nous avons vu que l'existence d'un polymorphisme de restriction entre les 2 lignées de souris "B6" et "C" est un outil indispensable pour l'estimation des distances génétiques, pour s'assurer du caractère congénique d'une lignée de souris, ou encore pour localiser un locus particulier par rapport à d'autres marqueurs. Cette technique est cependant assez longue puisqu'elle nécessite l'extraction du DNA des animaux à étudier, la digestion de ce DNA par un enzyme de restriction permettant la mise en évidence d'un polymorphisme, puis l'électrophorèse du DNA digéré et son transfert sur membrane de nylon. Cette membrane doit encore être marquée avec une sonde particulière pour mettre en évidence le polymorphisme. Lorsque le DNA est extrait, ces manipulations prennent presque une semaine.

Les techniques de PCR pourraient permettre de mettre en évidence de manière plus rapide des loci polymorphiques. Ainsi, pourvu que l'on détermine les primers appropriés, il doit être possible d'obtenir une amplification de fragments différents à partir de DNA de souris de lignées différentes. Il suffit par exemple de la présence d'intron(s) de taille ou de nombre différent entre les deux lignées, conduisant à l'amplification de fragments de tailles différentes.

Sur cette base, nous avons tenté de mettre en évidence un polymorphisme entre les lignées "C" et "B6" pour le locus de la sorcine en utilisant les techniques de PCR. Cette approche devrait également nous conduire à l'isolement d'un fragment du gène de la sorcine de souris, fragment qui pourrait être utilisé comme sonde homologue en remplacement de la sonde pCP7 de hamster.

II.1. Choix des primers.

Actuellement, seules les séquences cDNA de la sorcine humaine et de hamster sont connues et peuvent servir à définir des primers capables d'amplifier le locus de la sorcine chez la souris. Nous avons sélectionné comme primers des séquences tout à fait conservées entre l'homme et le hamster, espérant que ces séquences sont également conservées chez la souris.

En comparant les séquences de la sorcine de hamster (Van der Bliek et al., 1986 b) et de la sorcine humaine (Sugimoto et al., non publié : GenBank release 66, 1990) (figures II.1.a. et II.1.b.), nous avons choisi les 2 séquences de 21 nucléotides conservées suivantes :

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890
GCAGTCTGCA	GCATGGCGTA	CCCGGGGCAT	CCTGGCGCCG	GCGGCGGG	TA
MetAlaTy	rProGlyHis	ProGlyAlaG	lyGlyGlyTy		50
CTACCCAGGC	GGGTATGGAG	GGGCTCCCAG	AGGGCCTGCG	TTTCCCAGGAC	
rTyrProGly	GlyTyrGlyG	lyAlaProG1	yGlyProAla	PheProGlyG	100
AAACTCAGGA	TCCGCTGTAT	GGTTACTTTG	CTGCTGTAGC	TGGACAGGAT	
lnThrGlnAs	pProLeuTyr	GlyTyrPheA	laAlaValAl	aGlyGlnAsp	
GGGCAGATAG	ATGCTGATGA	ATTGCAGAGA	TGTCTGACAC	AGTCTGGCAT	200
GlyGlnIleA	spAlaAspG1	uLeuGlnArg	CysLeuThrG	lnSerGlyI1	
TGCTGGAGGA	TACAAACCTT	TTAACCTGGA	GACTTGCCGG	CTTATGGTTT	250
eAlaGlyGly	TyrLysProP	heAsnLeuG1	uThrCysArg	LeuMetValS	
CAATGCTGGA	TAGAGATATG	TCTGGCACAA	TGGGTTTCAA	TGAATTAAA	300
erMetLeuAs	pArgAspMet	SerGlyThrM	etGlyPheAs	nGluPheLys	
GAACTCTGGG	CTGTACT[GAA	TGGCTGGAGA	CAACACTT	TA	350
GluLeuTrpA	laValLeuAs	nGlyTrpArg	GlnHisPheI	leSerPheAs	
CACTGACAGG	AGTGGAACAG	TAGACCCACA	AGAATTGCAG	AAGGCCCTGA	400
pThrAspArg	SerGlyThrV	alAspProG1	nGluLeuGln	LysAlaLeuT	
CAACAATGGG	ATTTAGGTTG	AGTCCCCAGG	CTGTGAATT	AATTGCAAAA	450
hrThrMetG1	yPheArgLeu	SerProGlnA	laValAsnSe	rIleAlaLys	
CGATACAGCA	CCAATGGAAA	GATCACCTTC	GACGACTACA	TCGCCTGCTG	500
ArgTyrSerT	hrAsnGlyLy	sIleThrPhe	AspAspTyrI	leAlaCysCy	
CGTCAAAC TG	AGGGCTCTTA	CAGACAGCTT	TCGAAGACGG	GATACTGCTC	550
sValLysLeu	ArgAlaLeuT	hrAspSerPh	eArgArgArg	AspThrAlaG	
AGCAAGGTGT	TGTGAATTTC	CCATATGATG	ATTCATTCA	ATGTGTCATG	600
lnGlnGlyVa	lValAsnPhe	ProTyrAspA	spPheIleG1	nCysValMet	
AGTGTAA	TCAAGAGGAA	GCTGCATGAA	TGTAATCAAC	ATTCCAAC	650
SerVal...					
GAGCTCTCCT	TTGCTTGTCC	TCTTGCCTT	CGGTAATATG	TATAAACTTA	700
CATCACGACT	TTCTCTTAAC	AGCTGTTGTA	AAGTTTATTA	CTTTATGTAC	750
AACTGAAGTT	TTGTTTTAGT	TTTGATAATA	AATTCTTGGG	ACTTTAATAA	800
GATCTAGTCT	GTTACACCAT	TTAGAACTTT	CCTCAGCCAT	TATCAGTCAT	850
GCCTTATTTT	CTTGCTAAAAA	CTCTATGTAA	ATTTAAGTAT	GCAAAATGTT	900
TAAGTCACAT	TATTTATTTT	TCATTGTGAG	ATACTAAAAA	CTGTTATCAG	950
AC					952

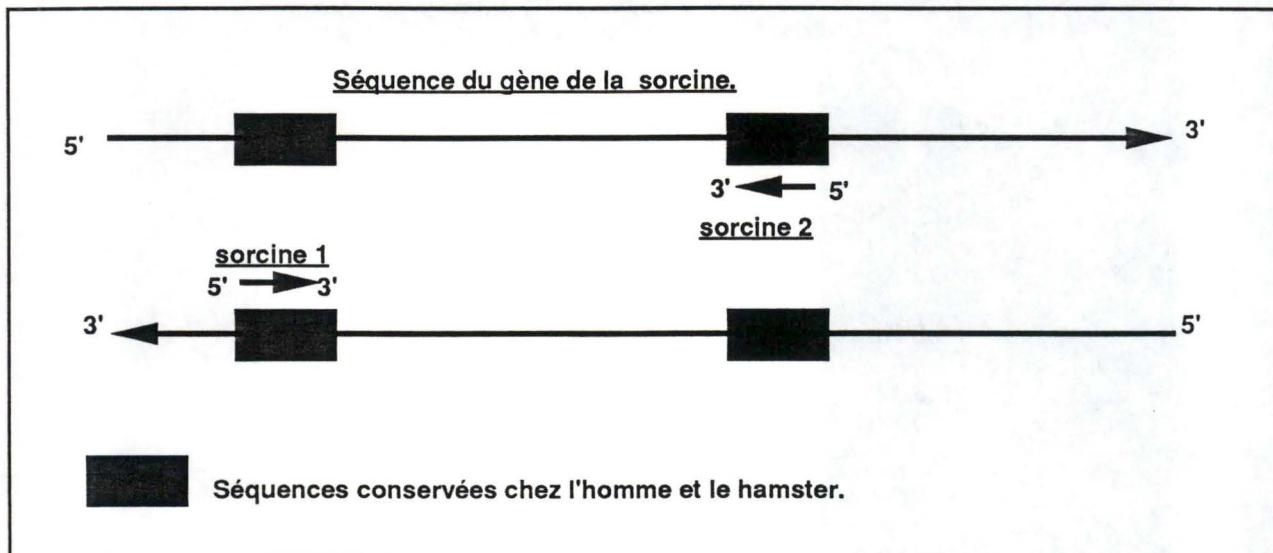
Figure II.1.b. Séquence de la sorcine humaine.

Le premier encadré (bp 48 à 69) correspond à la séquence du primer sorcine 1. La séquence du primer sorcine 2 correspond à la séquence complémentaire de celle du deuxième encadré (bp 317 à 338).

Primer Sorcine 1 : TAC TAC CCA GGC GGG TAT GGA.

Primer Sorcine 2 : AAG TGT TGT CTC CAG CCA TTC.

La position de ces primers par rapport au gène de la sorcine est représentée ci-dessous et localisée de manière plus précise aux figures II.1.a. et II.1.b.



Ces 2 primers ont été synthétisés en mode "trityl on" sur le synthétiseur Applied Biosystems, modèle 381A. Après clivage et déprotection à l'ammoniaque, une partie des primers a été purifiée par précipitation à l'éthanol. 330 µg de primer sorcine 1 (concentration : 247 µM) et 410 µg de primer sorcine 2 (concentration 307 µM) ont été obtenus.

II.2. Tentative de mise en évidence d'un polymorphisme entre les lignées "C" et "B6" par PCR.

II.2.1. Amplification de DNA humain, de souris et de hamster par PCR.

250 ng de DNA de souris "B6", "C", de hamster syrien ainsi que 250 ng de DNA humain sont amplifiés par PCR dans les conditions suivantes :

A. Mélange de réaction.

Pour 50 µl : -5 µl de tampon 10X.

- 200 µM de chaque dNTP.
- 50 picomoles de chaque primer.
- 250 ng de DNA .
- 1.25 unité de Taq DNA polymérase.
- Porter à 100 µl avec de l'eau distillée stérile.

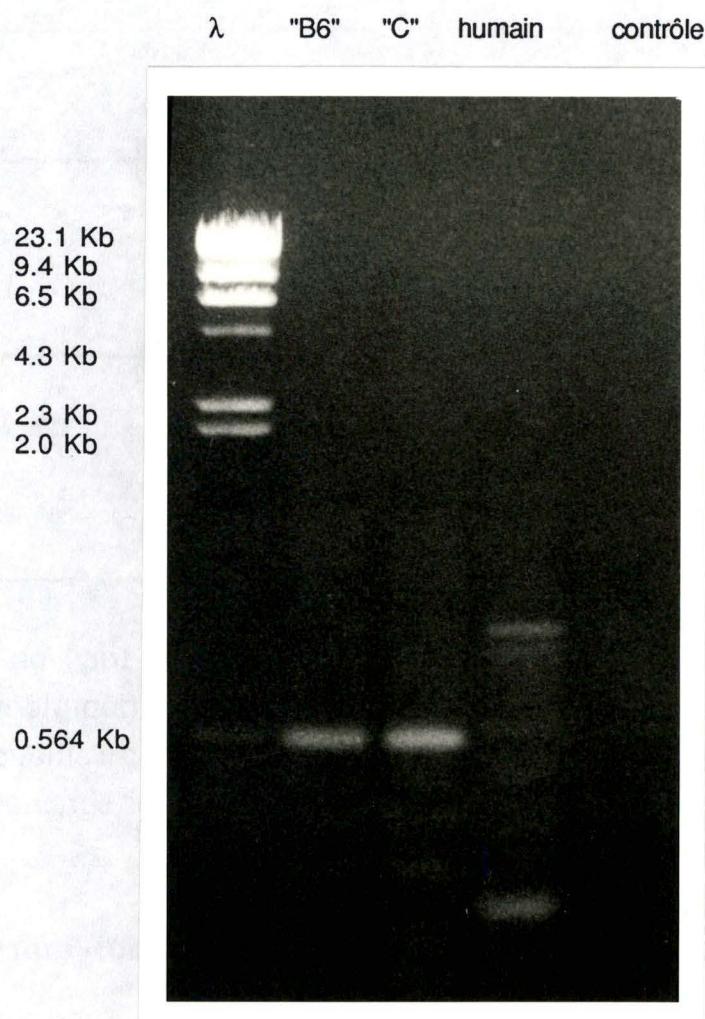


Figure II.2. Amplification de DNA de souris "B6", "C" et de DNA humain par PCR en vue de l'amplification du locus de la sorcine.

Le contrôle négatif (afin de vérifier s'il n'y a pas contamination des solutions utilisées) contient les mêmes éléments que ci-dessus, sauf le DNA à amplifier qui est remplacé par un volume équivalent d'eau distillée stérile. Chaque échantillon est couvert de 50 µl d'huile minérale pour éviter l'évaporation.

B. Conditions d'amplification.

Chaque échantillon est soumis à 40 cycles d'amplification dans les conditions suivantes :

- Une première dénaturation de 3 minutes à 95°C.
- 1 minute de dénaturation à 95°C.
- 1 minute d'annealing à 52°C. 40X.
- 4 minutes d'extension à 72°C.
- Une extension finale de 10 minutes à 72°C.

Après amplification, 10 µl d'échantillon sont déposés sur un gel d'agarose 1%. Les résultats sont présentés figure II.2 (amplification de la sorcine de hamster non montrée). Ces résultats mettent en évidence l'amplification d'une bande d'environ 560 nucléotides aussi bien pour la lignée "C" que pour la lignée "B6". Nous n'avons donc malheureusement pas pu mettre en évidence de polymorphisme entre les lignées "C" et "B6" pour le locus de la sorcine après amplification par PCR. La taille de 560 bp semble raisonnable, puisque la longueur du fragment flanqué par les 2 primers au niveau de la séquence de cDNA (humain ou de hamster) est d'environ 300 nucléotides. Il est donc possible d'obtenir une fragment amplifié d'environ 560 bp à partir de DNA génomique, si l'on considère une structure introns-exons. Pour le hamster, nous obtenons une bande d'environ 1000 bp, et pour l'homme, deux bandes d'environ 900 bp et 300 bp. Il faut remarquer qu'outre la bande principale, toute une série d'autres bandes d'intensité nettement plus faible, et de taille plus importante ou plus faible que la bande prédominante, sont également présentes (peu visibles sur la photo).

II.2.2. Analyse des DNA amplifiés par PCR.

Même si nous n'avons pas obtenu de polymorphisme pour le locus de la sorcine par PCR, le fragment obtenu après amplification doit pouvoir être utilisé comme nouvelle sonde homologue en remplacement de la sonde pCP7 de hamster.

"B6"

"C"

C-*r*Orl

B6-*r*Ed

C.B6-*r*Ed

λ

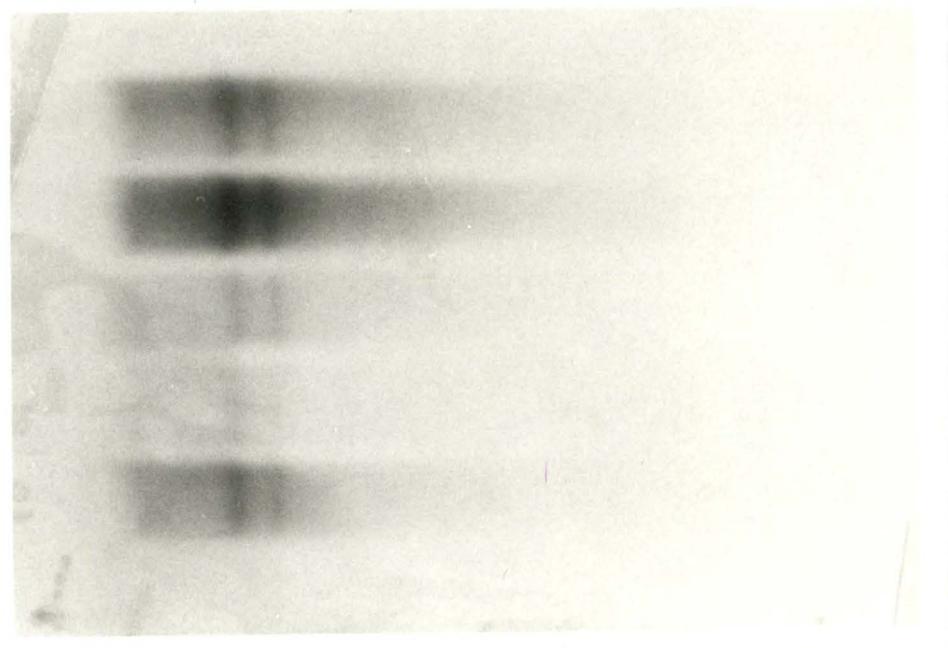


Figure II.3. Analyse en Southern du fragment Sor600.

"B6"

"C"

C-*r*Orl

B6-*r*Ed

C.B6-*r*Ed

λ

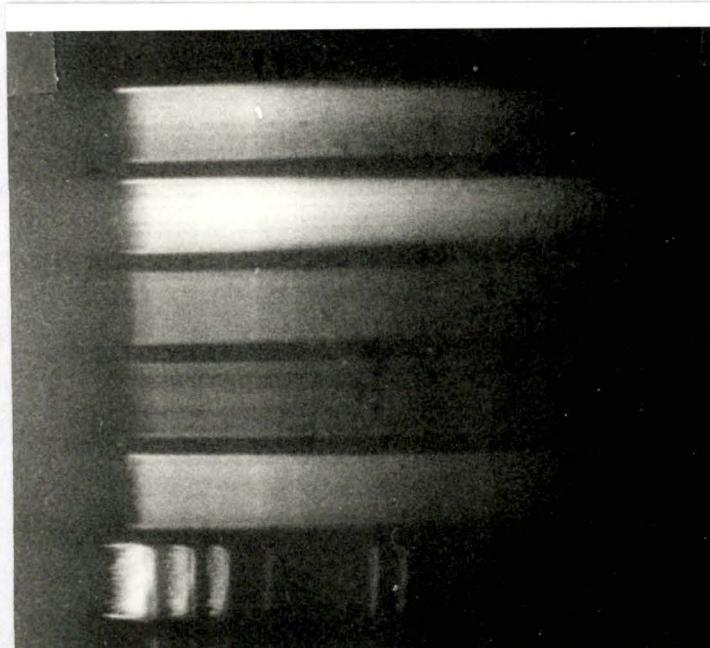


Figure II.4. DNA des différentes lignées après digestion par *Msp*I et électrophorèse sur gel d'agarose. Les bandes reconnues par la sonde Sor600 en Southern sont déjà présentes sur le gel de digestion et correspondent à des séquences répétées.

· Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons purifié le fragment de 560 bp amplifié dans la lignée de souris "B6" et l'avons testé en Southern. Par facilité, nous avons appelé ce fragment Sor600.

Pour cela, 2 X 100 µl de mélange de réaction sont préparés de manière identique au premier essai d'amplification, toutes les quantités étant doublées. Les conditions d'amplification sont également identiques. 180 µl de réaction sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 1% en vue d'une purification sur membrane de DEAE. Après extraction par phénol-chloroforme, le culot est repris dans 30 µl de TE. La concentration de la préparation est estimée sur minigel à 150 ng / µl, soit environ 4.5 µg du fragment amplifié récupérés à partir de 1µg de DNA total au départ.

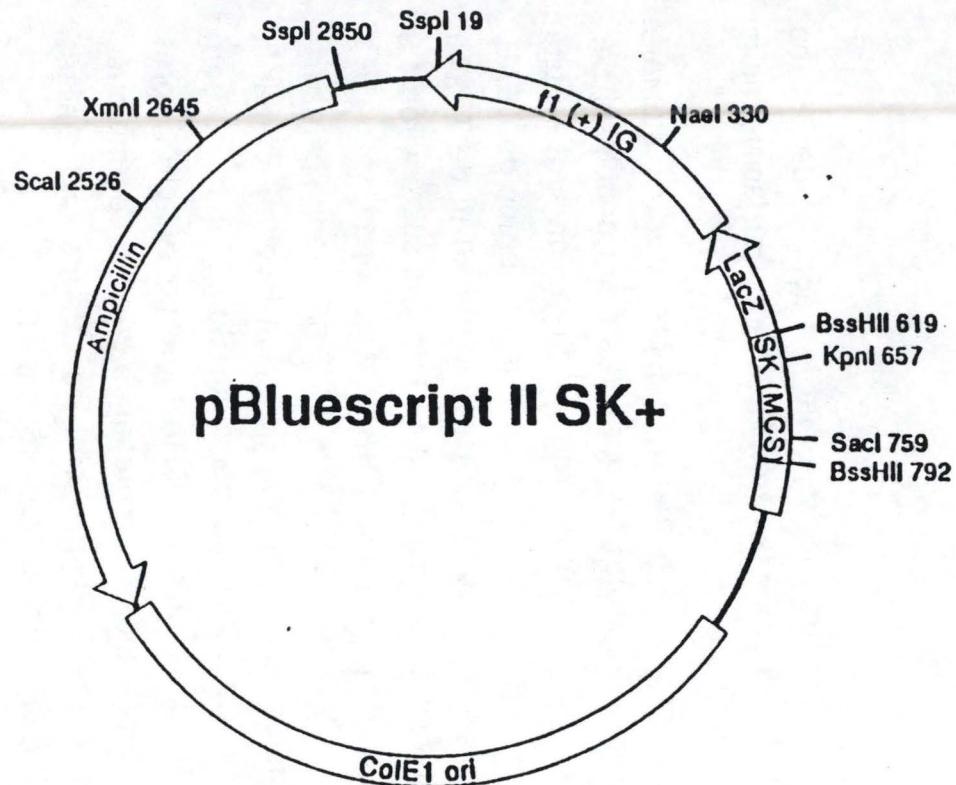
5 µg de DNA de souris "B6", "C", C-*r*Or*l*, B6-*r*Ed et C.B6-*r*Ed sont digérés par *Msp*I pendant 3 heures et transférés sur membrane de nylon Hybond-N⁺ par la technique du Southern blotting alcalin. 30 ng du fragment Sor600 purifiés sont marqués au [P-32] par la technique du "multiprime DNA labelling system". Après préhybridation, la membrane est incubée à 65°C en présence de la sonde marquée pendant une nuit sous agitation modérée. Le lendemain, les lavages sont réalisés dans les conditions suivantes : 2 X SSPE, 0.1 % SDS 15' à 65°C.

1 X SSPE, 0.1 % SDS 15' à 65°C.
0.3 X SSPE, 0.1 % SDS 15' à 65°C.
0.1 X SSPE, 0.1 % SDS 15' à 65°C.
0.1 X SSPE, 0.1% SDS 15' à 65°C.
0.1 X SSPE, 0.1 % SDS 15' à 65°C.

Le film est développé après 6 heures d'exposition.

Si le fragment isolé correspond bien à un morceau du gène de la sorcine de souris, on doit mettre en évidence un polymorphisme de restriction entre les lignées "C" et "B6". Les résultats montrés figure II.3. sont loin de mettre ce polymorphisme en évidence. Pour toutes les lignées ("C", "B6", B6-*r*Ed ,C-*r*Or*l* et C.B6-*r*Ed), le profil obtenu en Southern après hybridation est identique. Un tel profil évoque la reconnaissance par la sonde de séquences de DNA répétées. Si l'on observe la photo du gel correspondant au DNA des différentes lignées après digestion par *Msp*I (figure. II.4.), on remarque que les 2 bandes parallèles présentes sur l'autoradiographie sont aussi présentes sur le gel coloré au bromure d'éthidium. Ces 2 bandes correspondent bien à des séquences répétées, qui, par définition, sont présentes en un grand nombre d'exemplaires, et se marquent donc de manière plus intense sur le gel de digestion. Les conditions de lavage qui ont dû être appliquées constituent également un critère en faveur de l'amplification de séquences répétées. Ainsi, même aux conditions de stringence les plus fortes, le signal mesuré au

Figure II.5. Le fragment Sor600 a été cloné au niveau du site *Sma*I du vecteur pSK⁺.



Reverse Primer
5' AACAGCTATGACCATG 3'
Beta-Galactosidase →

T3 Primer
5' ATTAACCTCACTAAAG 3'

MET BssH II T3 Promoter +1 → Sma I Bst XI Sac II Not I Xba I Spe I Bam HI Sma I Pst I Eco RI
5' GGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCCOCOAATTAAACCCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGTGGCCGCCGCTCTAGAAACTAGTGGATCCCCCGGCTGCAGG
3' CCTTTGTCGATACTGGTACTAATGCGGTTCGCCCGTTATTGGGAGTGATTTCCTTGTTCGACCTCGAGGTGGCGCCACCGCCGGGAGATCTTGATCACCTAGGGGCCAGCTCCTTAA

SK Primer
5' TCTAGAACTAGTGGATC 3' ←

Eco RV Hind III Cle I Sal I Xba I Dra I Apa I Kpn I BssH II
AATTGCGATATCAACCTTATCGATAACCGTCGACCCCTCGAGGGGGGCCGATACCCAAATTCCCGCTATAGTGAQTCGTATTACGCCGCGCTCACTGGCCATGTTAAAGCGGGATATCACTCAGCATAATGCGCGCAGTGAACGGCAGCAAATGTT 3' +
GCTATAGTTGCAATAGCTATGGCAGCTGGAGCTCCCCCGGGCATGGTTAAAGCGGGATATCACTCAGCATAATGCGCGCAGTGAACGGCAGCAAATGTT 3' ← +1
T7 Promoter

KS Primer
3' GCTATGGCAGCTGGAGC 5'

Recombinant Strand
3' GATATCACTCAGCATAA 5' T7 Primer
3' TGACCCGGCAGCAAAATG 5' M13 · 20 Primer

compteur Geiger était trop important pour correspondre au marquage d'un gène unique, ce qui est le cas pour la *sorcine*.

Comme contrôle, nous avons alors décidé de tester les fragments amplifiés chez l'homme et chez le hamster en Southern, sur du DNA de souris "B6", "C", B6-*r1Ed*, C-*r1Orl* et C.B6-*r1Ed* digéré par *MspI*. Au moins dans le cas du fragment isolé chez le hamster, nous aurions dû obtenir un pattern de restriction identique à celui obtenu pour la sonde pCP7. Malheureusement, aussi bien dans le cas du fragment de hamster que des fragments humains, les résultats obtenus en Southern (non montrés) donnent un profil non spécifique, indiquant qu'il doit également s'agir de l'amplification de séquences répétées.

Il est donc probable que les conditions de PCR n'étaient pas suffisamment stringentes, conduisant à l'accumulation de produits non spécifiques au détriment de l'amplification du locus de la *sorcine*. Nous avons donc modifié les conditions de PCR afin d'obtenir une réaction d'amplification plus spécifique. Différentes conditions ont été testées, en diminuant la concentration en primers (jusqu'à 20 picomoles pour 100 µl de réaction), en diminuant la quantité d'enzyme (jusqu'à 1 unité pour 100 µl), en augmentant la température d'annealing (55°C au lieu de 52°C), en diminuant le temps d'extension (1 minute est largement suffisant pour un fragment de 1 Kb), en testant différentes concentrations en DNA. Dans tous les cas, le fragment de 560 bp est retrouvé. On peut cependant mettre en évidence l'apparition d'une bande de ± 300 bp, d'intensité très faible. Cette bande apparaît lorsque la température d'annealing est portée à 55°C, quelles que soient les concentrations en primer ou en DNA. Nous avons récupéré ce fragment et l'avons testé en Southern. Ici encore, nous obtenons après autoradiographie, un profil indiquant la reconnaissance de séquence répétées (résultats non montrés).

Afin de mettre en évidence la nature exacte du fragment amplifié, nous avons décidé de cloner le fragment Sor600 (le plus facile à produire et à isoler parce qu'il est amplifié de manière beaucoup plus importante que le fragment de 300 bp) et de le séquencer.

II.3. Clonage et séquençage du fragment Sor600.

II.3.1. Clonage du fragment Sor600 dans le plasmide pBluescript SK⁺.

Les fragments amplifiés par PCR possèdent des extrémités à bouts francs. Nous avons donc choisi d'insérer le fragment Sor600 au niveau du site de restriction *SmaI* (CCC/GGG) du plasmide pSK⁺ (figure II.5.). Pour cela, 10 µg du plasmide sont digérés 1 heure à 37°C par *SmaI*. Le plasmide linéarisé est ensuite purifié par

λ pSK⁺ et Sor600 "B6"

23.1 Kb
9.4 Kb
6.5 Kb

4.3 Kb

2.3 Kb
2.0 Kb

0.564 Kb

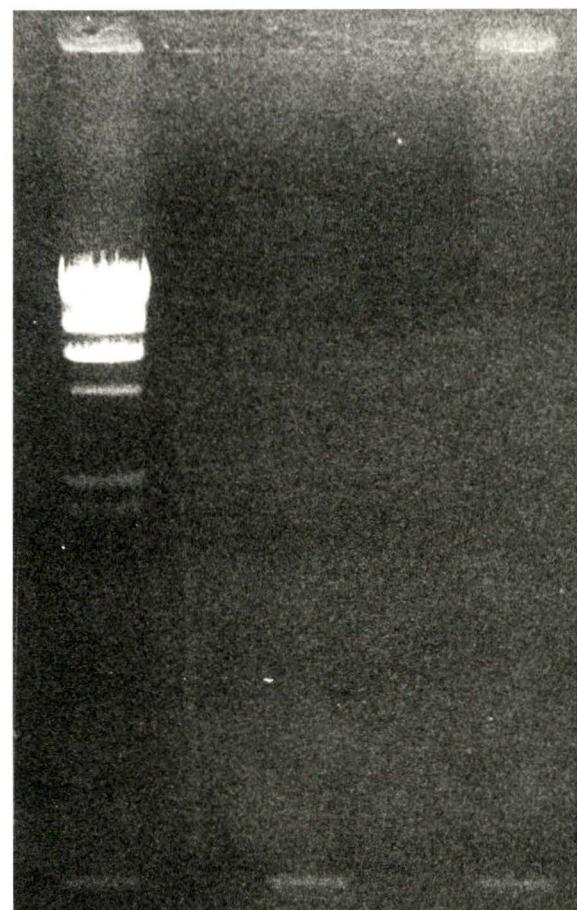


Figure II.6. Amplification par PCR de l'insert cloné dans le vecteur pSK⁺ et de DNA génomique de souris "B6" (visualisation par électrophorèse en gel d'agarose 1%).

phénol-chloroforme. La ligation est réalisée en présence de 100 ng de vecteur linéarisé, 40 ng d'insert Sor600 purifié et 2 unités de T4 DNA ligase, pendant une nuit à température ambiante. 200 µl de cellules compétentes sont ensuite transformés par 2 µl du mélange de ligation et 100 µl sont étalés sur boîte LB + Ampi + IPTG + X-GAL, pour permettre une sélection des recombinants par test blanc-bleu. Après croissance pendant une nuit à 37°C, seulement deux colonies blanches ont été obtenues. Les plasmides contenus dans ces deux colonies blanches ont été récupérés par maxiprep. Afin de s'assurer que les plasmides isolés avaient incorporé un insert, un aliquot de chaque plasmide est digéré par les enzymes *BamHI* et *EcoRI* (le site *SmaI* est perdu lors de la ligation; pour sortir l'insert de chacun des 2 plasmides, nous avons donc choisi 2 sites bordant le site *SmaI*).

Seul un des 2 clones contenait bien un insert dont la taille (560 bp) correspond à la taille attendue. Comme contrôle, pour s'assurer que ce clone contient bien le fragment de 560 bp amplifié dans les lignées de souris "B6" et "C", une PCR est réalisée directement sur le plasmide recombinant, avec les primers sorcine 1 et sorcine 2, utilisés pour isoler le fragment Sor600 au début de ces manipulations. Une bande de 560 bp identique à celle amplifiée directement à partir du DNA génomique "B6" est mise en évidence (figure II.6), démontrant que le fragment cloné correspond bien au fragment amplifié dans la lignée "B6".

Ces résultats appellent quelques commentaires techniques. Ils montrent que l'on peut amplifier directement un insert cloné dans un plasmide, pourvu que l'on dispose des primers appropriés. Il est possible d'utiliser comme primers des séquences connues du vecteur de clonage, tels que les primers universels pour le vecteur pSK+. L'intérêt de ce système est d'éviter les maxipreps en les remplaçant par une amplification directe à partir du plasmide purifié. Il est même possible de réaliser la PCR directement sur les cellules bactériennes, ce qui permet des gains de temps importants. Il faut cependant garder à l'esprit que le taux d'erreur de la Taq DNA polymérase n'est pas négligeable.

II.3.2. Séquençage du fragment Sor600 cloné dans le vecteur pSK+.

Les résultats obtenus précédemment indiquent que l'amplification par PCR à partir de primers supposés spécifiques de la sorcine conduit à l'amplification d'un fragment majoritaire de 560 bp. Ce fragment montre un comportement en Southern qui fait penser au marquage de séquences répétées. Afin de vérifier cette hypothèse et de comprendre les résultats observés, nous avons séquencé ce fragment. Le séquençage est réalisé en une seule fois, en partant des primers universels forward et reverse. Nous pouvons ainsi séquencer environ 330 bp dans

Figure II.7. Séquençage du fragment Sor600. Les deux flèches indiquent la position du primer sorgine 1 (TAC TAC CCA GGC GGG TAT GGA) . L'ordre des dépôts est A, C, G et T. Ce brin a été séquencé à partir du primer universel forward. Les temps de migration sont respectivement de 8 h 30', 6 h et 3 h 30', le premier dépôt situé à gauche sur la photo correspondant au run de 8 h 30'.

A C G T

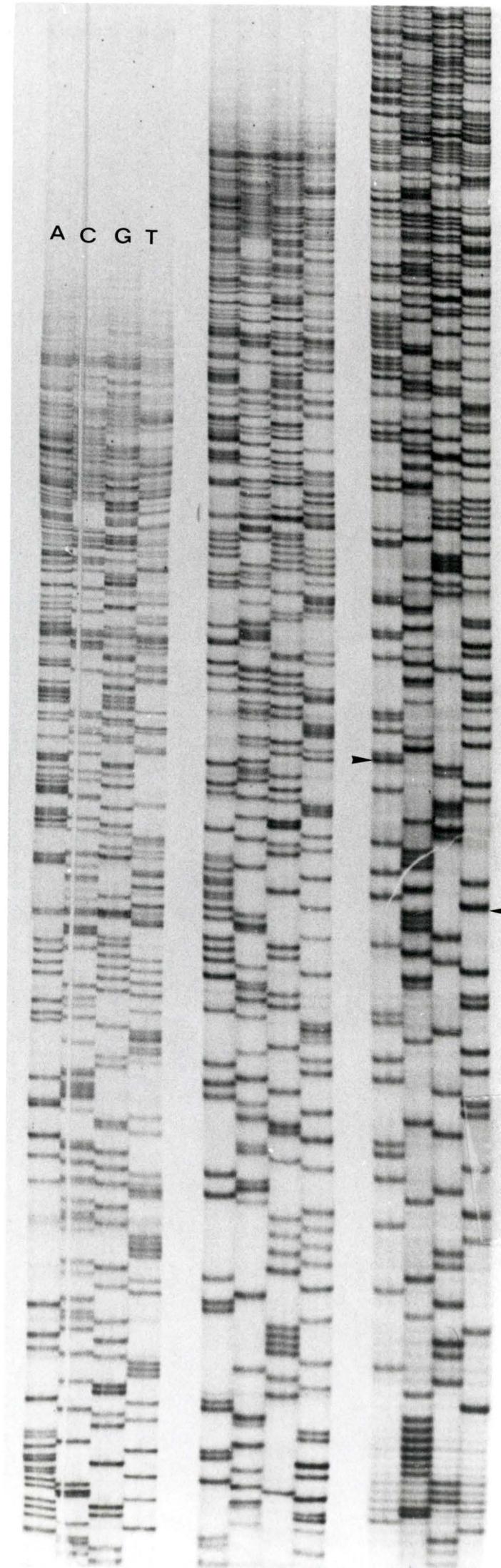


Figure III.8.. Séquençage du fragment Sor600. Les deux flèches indiquent la position du primer sorcine 2 (AAG TGT TGT CTC CAG CCA TTC) . L'ordre des dépôts est A, C, G et T. Ce brin a été séquencé à partir du primer universel reverse. Les temps de migration sont respectivement de 8 h 30', 6 h et 3 h 30', le premier dépôt situé à gauche sur la photo correspondant au run de 8 h 30'.

A C G T



chaque direction. Trois réactions de séquençage du même fragment ont été réalisées, en essayant d'améliorer chaque fois la qualité du gel et les conditions de migration pour arriver à une zone de recouvrement, assurant ainsi la lecture de l'entièreté du fragment. Le séquençage complet des 2 brins n'a pas été réalisé, le séquençage répété de chaque moitié du fragment servant de contrôle.

Le premier séquençage a été réalisé en 3 runs de 6 h 45', 4 h 30' et 2 h, la migration s'effectuant à 1700 V, 60 watts et 40 mA. Ce premier séquençage a permis la lecture d'environ 250 bp dans chaque direction. Nous avons donc dû améliorer les conditions de migration de manière à lire un plus grand nombre de bases dans chaque direction, permettant ainsi d'arriver à une zone de recouvrement. Le deuxième séquençage a été réalisé dans les conditions suivantes: 3 runs de 8 h 30', 6 h et 3 h 30', toujours à 1700 V, 40 watts et 60 mA. Dans ces conditions, nous pouvons lire environ 330 bp dans chaque direction, avec une zone de recouvrement centrale, assurant ainsi la lecture de l'entièreté de la séquence. Les résultats de ce gel sont représentés figures II.7 et II.8. Un dernier séquençage a été réalisé, à la fois pour contrôler les séquences situées en dehors de la zone de recouvrement, et ensuite pour tenter de lire de manière plus précise les bases les plus éloignées, constituant la zone de recouvrement. Les conditions de migration suivantes ont été appliquées: 9 h, 6 h et 3 h, 2000 V, 40 watts et 60 mA. Ce dernier gel confirme la séquence obtenue précédemment. La séquence complète, de 563 bp, est donnée ci-dessous.

primer sorcine 1.

TACTACCCAGGCGGGTATGGAACTCATAATCTTCCTGCATCTAACTTCAAGTGCTGGGGTAAC
TGTGTGTCAACCAGCCTGGCTCAGACTATCGTTTCAGCGCCATCAGAGATCCACATAAGAATACAA
GTGCTAGGCTTGCAGACGCCACTGTCGCTTCGCCGCTTGACTGCAGCCATGGTCAACCCCACCGT
GTTCTTGACATCACTGCTGATGACGAGCCCTGGGCCTCGTCTCCTCAAGCTGTTGCAGACAAAG
TTCCAAGACAGCAGGAAACTTCGAGCTTGAGCACTGGAGAGAAAGGATTGGCTATAAGGGTTCC
TCCTTCACAGAATTATTCCAGGATTCATGTGCCAGGGTGGTACTTACACGCCATAATGGCACTGG
CGGCAGGTCCATCTATGGAGAGAGATTGAGGATGAGGACTTCATCCTGAAGCATAACAGGTCTGACA
TCTTGTCCATGGAAAAGCTGGACCAACACAAACGATTCCCAGTTTATCTGCACTGCCAAGACT
GAATGGCTGGAGACAAACACTT

Complémentaire du primer sorcine 2.

Nous avons comparé la séquence obtenue aux séquence disponibles dans la dernière version (release 66) de GenBank, en utilisant le programme GeneWorks. Nous avons ainsi découvert que le fragment Sor600 que nous avions isolé est

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
TTTGCAGACG	CCACTGTCGC	TTTCGCCGC	TTGCTGCAGC	CATGGTCAAC	50
				MetValAsn	
CCCACCGTGT	TCTTCGACAT	CACGGCCGAT	GACGAGCCCT	TGGGCCGCGT	100
ProThrValP	hePheAspIl	eThrAlaAsp	AspGluProL	euGlyArgVa	
CTCCTTCGAG	CTGTTTGCAG	ACAAAGTTCC	AAAGACAGCA	GAAAACCTTC	150
lSerPheGlu	LeuPheAlaA	spLysValPr	oLysThrAla	GluAsnPheA	
GAGCTCTGAG	CACTGGAGAG	AAAGGATTG	GCTATAAGGG	TTCCTCCTT	200
rgAlaLeuSe	rThrGlyGlu	LysGlyPheG	lyTyrLysG1	ySerSerPhe	
CACAGAATT	TTCCAGGATT	CATGTGCCAG	GGTGGTGACT	TTACACGCCA	250
HisArgIleI	leProGlyPh	eMetCysGln	GlyGlyAspP	heThrArgHi	
TAATGGCACT	GGCGGCAGGT	CCATCTACGG	AGAGAAATT	GAGGATGAGA	300
sAsnGlyThr	GlyGlyArgS	erIleTyrG1	yGluLysPhe	GluAspGluA	
ACTTCATCCT	AAAGCATACA	GGTCCTGGCA	TCTTGTCAT	GGCAAATGCT	350
snPheIleLe	uLysHisThr	GlyProGlyI	leLeuSerMe	tAlaAsnAla	
GGACCAAACA	CAAACGGTTC	CCAGTTTTT	ATCTGCACTG	CCAAGACTGA	400
GlyProAsnT	hrAsnGlySe	rGlnPhePhe	IleCysThrA	laLysThrG1	
ATGGCTGGAT	GGCAAGCATG	TGGTCTTG	GAAGGTGAAA	GAAGGCATGA	450
uTrpLeuAsp	GlyLysHisV	alValPheG1	yLysValLys	GluGlyMetA	
ACATTGTGGA	AGCCATGGAG	CGTTTGGGT	CCAGGAATGG	CAAGACCAGC	500
snIleValG1	uAlaMetGlu	ArgPheGlyS	erArgAsnG1	yLysThrSer	
AAGAACATCA	CCATTCCGA	CTGTGGACAG	CTCTAATTTC	TTTGACTTG	550
LysLysIlet	hrIleSerAs	pCysGlyGln	Leu		
CGGGCATT	ACCCATCAAA	CCATTCCCTC	TGTAGCTCAG	GAGAGCGTCC	600
CTACCCCATC	TGCTCGCAAT	GTCCTGTAAT	CTCTGCTCTC	ACTGAAGTTC	650
TTTGGGTTCC	ATATTTCCCT	CATTCCCTT	CAAGTCTAGC	TGGATTGCAA	700
AGTTAAGTTT	ATGATTATGA	ATAAAAAC	ATAAAG		736

Figure II.9. Séquence du cDNA codant pour la cyclophiline de souris (Hasel, 1990).

fortement homologue de la séquence du mRNA codant pour la cyclophiline des lymphocytes T humains. Nous avons donc probablement isolé un morceau du gène codant pour la cyclophiline de souris.

La cyclophiline est une protéine qui lie de manière spécifique la cyclosporine-A, un agent immunodépresseur actif dans la prévention des rejets au cours des transplantations d'organes et dans le traitement des maladies auto-immunes. La cyclophiline appartient à la famille des immunophilines, qui sont présentes de manière abondante et généralisée dans le cytoplasme. L'identité entre le fragment Sor600 et un fragment du gène de la cyclophiline a été tout à fait confirmée lorsque nous avons comparé notre séquence à celle du mRNA codant pour la cyclophiline de souris (Hasel, 1990) (voir figure II.9), trouvée dans la banque EMBL .

La comparaison entre les 2 séquences est donnée ci-dessous. La séquence donnée est celle du fragment Sor600. La partie en italique et soulignée représente le fragment de Sor600 correspondant à une partie de la séquence de mRNA de la cyclophiline de souris (ou DNA parce que la cyclophiline de souris est constituée d'un seul exon). Les bases différentes entre la séquence du fragment Sor600 et celle du mRNA de la cyclophiline sont indiquées en gras au niveau de la séquence Sor600, et la base correspondante pour le mRNA de la cyclophiline de souris est indiquée en dessous.

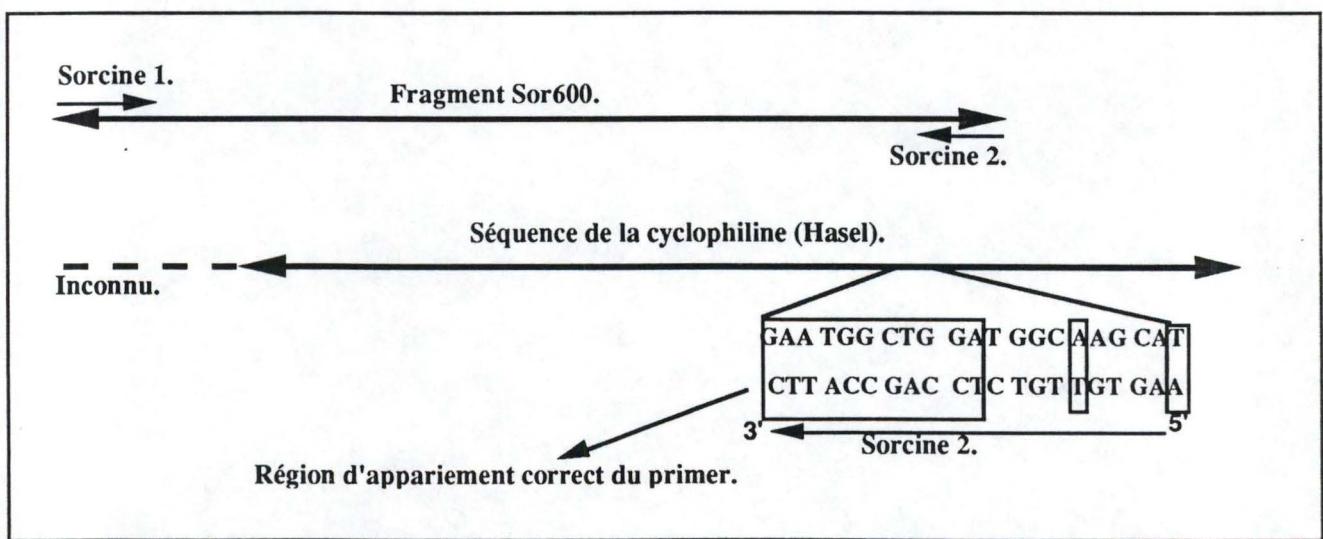
<u>TACTACCCAGGCGGGTATGGA</u> ACTCATAATCTCCTGCATCTAACTTCAAGTGCTGGGGTAAC	
GTGTGTGTCACCATGCC TGG CAGACTATCGTTTCAGCGCCATCAGAGATCCACATAAGAATACAA	
GTGCTAGG <u>G</u> T GCAGACGCCACTGTCGCTT C CGCTT <u>G</u> A <u>T</u> GCAGCC <u>A</u> TGGTCAACCCCACCG	
Absent dans la séquence mRNA.	
<u>TGTTCTT</u> T GACATCA <u>T</u> GCT <u>G</u> T <u>A</u> TGACGAGCC <u>T</u> GGCC <u>T</u> CGT <u>T</u> CC <u>T</u> TC <u>A</u> AGCT <u>T</u> TTGCAGA	
c g c	g g
<u>CAAAGTT</u> C AAAGACAGCAG <u>G</u> A AA <u>T</u> TC <u>G</u> AG <u>C</u> T <u>G</u> AG <u>C</u> ACT <u>G</u> GAG <u>A</u> AG <u>G</u> ATT <u>G</u> G <u>C</u> TATA <u>A</u> AG	
a	
<u>GGTT</u> C CT <u>CTT<u>CAC<u>AGA<u>ATT<u>T</u>CC<u>AGG<u>ATT<u>CAT<u>G</u>T<u>G</u>CC<u>AGG<u>GT<u>GGT<u>ACT<u>T</u>T<u>AC<u>AG<u>CCC<u>ATA<u>AT<u>G</u>G</u></u></u></u></u></u></u></u></u></u></u></u></u></u></u></u>	
<u>CACT</u> G GG <u>CGG<u>CAG<u>GT<u>CC<u>AT<u>T</u>GG<u>AG<u>AGG<u>ATT<u>T</u>G<u>AGG<u>GACT<u>T</u>C<u>T</u>CC<u>AGG<u>T</u>A<u>AGC<u>AT<u>AC<u>AGG<u>T</u></u></u></u></u></u></u></u></u></u></u></u></u></u></u></u>	
c a a a	
<u>CCTG</u> A CA <u>T</u> TT <u>G</u> T <u>CC<u>AGG<u>CAA<u>AAG<u>C</u>T<u>G</u>G<u>ACC<u>AAC<u>AAC<u>ACG<u>ATT<u>CC</u>AG<u>T</u>TT<u>T</u>T<u>T</u>AT<u>T</u>GC<u>ACT<u>G</u></u></u></u></u></u></u></u></u></u></u>	
g t g	
<u>CCAAGA</u> ACT <u>G</u> A <u>A</u> T <u>GG</u> C <u>T</u> GG <u>A</u> G <u>A</u> CA <u>A</u> CA <u>A</u> CT <u>T</u>	

Les différences entre la séquence originale déterminée par Hasel et la séquence que nous avons lue au laboratoire sont réduites. Nous sommes ainsi certains d'avoir isolé un fragment du gène de la cyclophiline de souris. Les différences entre les deux séquences sont probablement liées à des problèmes de fidélité de la Taq DNA polymérase lors de l'amplification du fragment Sor600 par PCR. Cet enzyme a en effet un taux d'erreur assez important, mais pas suffisamment élevé pour rendre compte de l'ensemble des différences observées ici. Il faut également tenir compte d'erreurs possibles de la T7 DNA polymérase lors de la réaction de séquençage, aussi bien pour la détermination de notre séquence que pour celle établie par Hasel.

II.4 Discussion : Echec de la mise en évidence d'un polymorphisme par PCR pour le locus de la sorcine, et isolement du gène de la cyclophiline.

Notre tentative de mise en évidence d'un polymorphisme pour le locus de la sorcine par PCR s'est avérée négative. Paradoxalement, nos tentatives d'isolement d'un fragment du gène de la sorcine nous ont conduits à isoler un fragment du gène de la cyclophiline. La présence, aux extrémités du fragment séquencé, des deux primers sorcine 1 et sorcine 2, ne permet pas de parler d'artefact PCR. Dès lors, comment expliquer l'amplification d'un fragment de gène codant pour la cyclophiline à partir de primers a priori spécifiques de la sorcine ?

En l'absence d'explication nette, nous nous limiterons à avancer quelques hypothèses. L'amplification de la cyclophiline à partir de primers spécifiques de la sorcine ne peut s'expliquer que si ces primers reconnaissent des séquences au niveau du gène de la cyclophiline. Le schéma ci-dessous nous montre que cette hypothèse est uniquement vérifiable pour le primer sorcine 2. En effet, nous ne connaissons pas la séquence en amont du gène de la cyclophiline à laquelle le primer sorcine 1 aurait pu s'apparier.



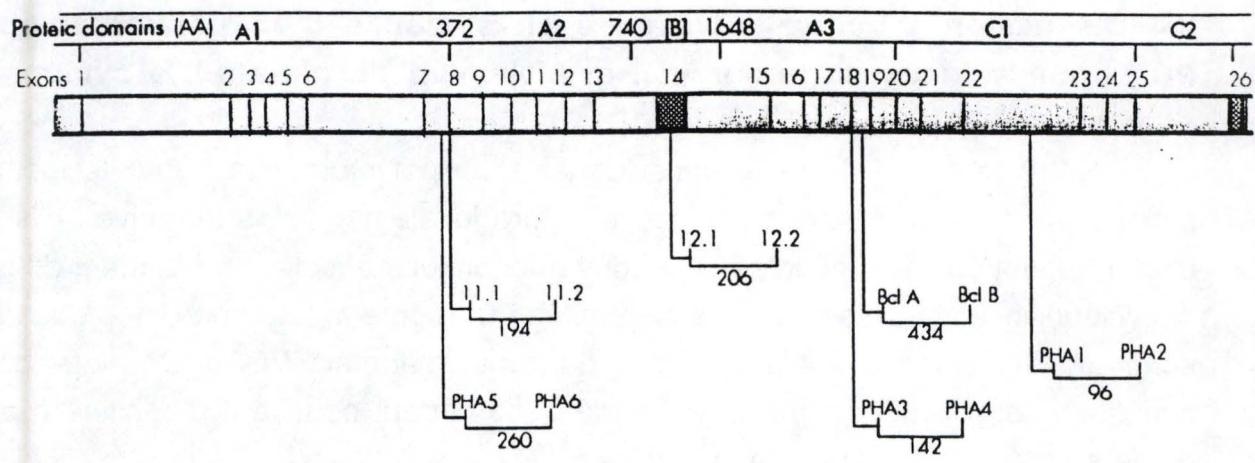


Figure II.10. Gène du facteur VIII de la coagulation.

L'appariement n'est pas parfait sur la totalité de la séquence du primer sorcine 2. Cependant, 11 bases situées à l'extrémité 3' du primer sont correctement appariées, expliquant ainsi en partie comment des primers spécifiques de la sorcine peuvent amplifier un gène différent. Un deuxième argument que l'on peut avancer est celui du nombre d'exemplaires de chaque gène dans le génome de la souris. Le gène de la sorcine doit correspondre à un gène unique, alors que le gène de la cyclophiline semble exister en plusieurs exemplaires, en tout cas chez l'homme (Haendler et al., 1987) et probablement chez la souris. Une troisième explication pourrait résider dans la structure du gène de la sorcine. Bien que l'organisation génomique du locus *sorcine* soit inconnue, il est probable que le gène ait une organisation introns-exons et cette dernière pourrait expliquer l'échec de l'amplification de la sorcine par PCR. Pour illustrer cette hypothèse, prenons l'exemple du gène codant pour le facteur VIII de la coagulation. Il s'agit d'un gène de 186000 bp, constitué de 26 exons de 69 à 3106 bp et de nombreux introns dont certains peuvent s'étendre sur 32400 bp (voir figure II.10.). Si le gène de la sorcine présente une structure complexe, il est possible que les primers sélectionnés reconnaissent en fait des séquences distantes de plusieurs Kb au niveau du DNA génomique. Ceci pourrait expliquer l'échec de l'amplification puisque l'efficacité d'une réaction de PCR diminue fortement lorsque la taille des fragments à amplifier s'étend au delà de 3 Kb. Ceci permettrait également d'expliquer que la modification des conditions de PCR de manière à en augmenter la spécificité n'améliore pas les résultats.

Il nous reste à expliquer pourquoi le profil obtenu sur Southern fait penser à la reconnaissance de séquences répétées. Nous avons montré, par recherche d'homologie de séquences dans GenBank, qu'il existe une homologie faible entre le primer sorcine 2 et les séquences alphoïdes, et une homologie entre le primer sorcine 1 et les séquences répétées B1 de la souris. Il est donc possible que le fragment Sor600 que nous avons isolé par PCR, et qui est donc bordé par ces 2 primers, reconnaisse des séquences répétées sur Southern. Ce problème serait peut-être résolu en modifiant les conditions d'hybridation, par exemple en travaillant à une température plus élevée, pour faire apparaître les bandes spécifiques de la cyclophiline. Etant donné que ces résultats s'écartent de notre sujet, ce point n'a pas été exploré plus loin.

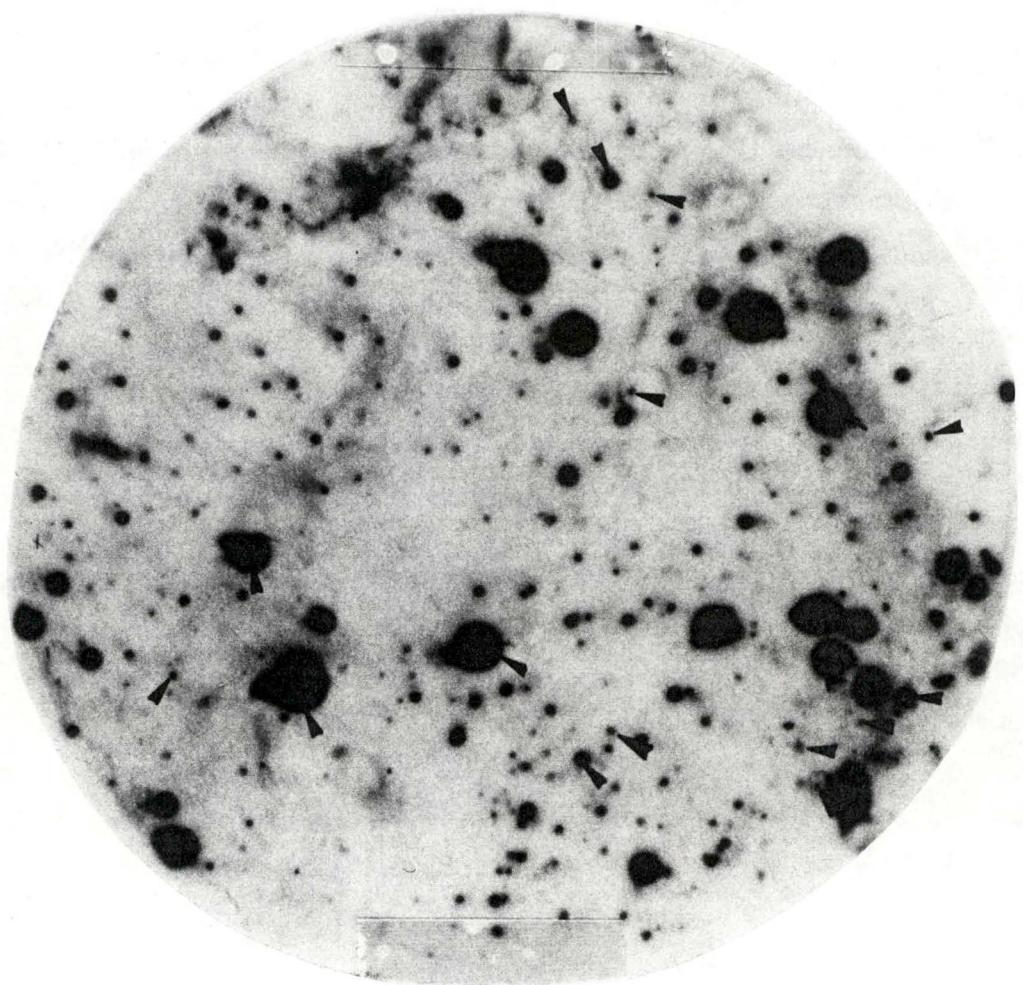


Figure III.1. Screening de la librairie de cosmide spécifique du chromosome 7 humain: hybridation d'un filtre réplique avec du DNA humain total marqué. Les flèches indiquent les clones donnant un signal positif après hybridation avec du DNA de souris et humain et négatif après hybridation avec du DNA de hamster.

III. RECHERCHE DE NOUVEAUX MARQUEURS DE L'EXTREMITE CENTROMERIQUE DU CHROMOSOME 5 DE LA SOURIS.

Outre la localisation d'un marqueur connu de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris, nous avons recherché de nouveaux marqueurs de cette région chromosomique. Puisque l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris présente des régions d'homologie avec le chromosome 7 humain, nous avons décidé de rechercher ces nouveaux marqueurs potentiels dans des banques dérivées de ce chromosome humain. Deux approches ont été suivies, à savoir le screening d'une banque de cosmides, et le screening d'une banque de Charon A21.

III.1. Screening d'une banque de cosmides spécifique du chromosome 7 humain.

III.1.1. Screening de la librairie.

La librairie nous a été fournie par M. Buchwald (University of Toronto, Canada). Le screening est réalisé par technique d'hybridation sur colonies. Pour cela, une dilution est préparée de manière à obtenir environ 300 cosmides dans 10 ml de LB+Amphi et étalée sur un filtre Hybond-N⁺ selon le principe décrit dans la partie II. (Matériel et méthodes). Le filtre est ensuite déposé sur boîte LB+Amphi et incubé une nuit à 37°C pour constituer la master plate. Trois filtres répliques ont été réalisés.

30 ng de DNA de souris, hamster et d'homme, préalablement dilués et cassés à la seringue, sont marqués au [P-32] par la technique du "multiprime DNA labelling system". Après préhybridation, les filtres répliques sont hybridés soit avec le DNA marqué de hamster, soit avec le DNA marqué de souris, soit avec le DNA marqué humain, pendant une nuit à 65°C, sous agitation modérée. Les lavages sont réalisés dans les conditions suivantes:

- SSPE 2 X, SDS 0.1 % : 15' à 65°C.
- SSPE 1X, SDS 0.1 % : 15' à 65°C.
- SSPE 0.3 X, SDS 0.1% : 15' à 65°C.

Le résultat de l'autoradiographie (après une nuit d'exposition) pour le filtre marqué par le DNA humain est présenté figure III.1.

La stratégie utilisée pour la sélection des clones intéressants a été développée dans l'introduction. Pour rappel, nous sélectionnons les clones donnant un signal positif après hybridation avec du DNA humain et de souris et donnant un signal négatif

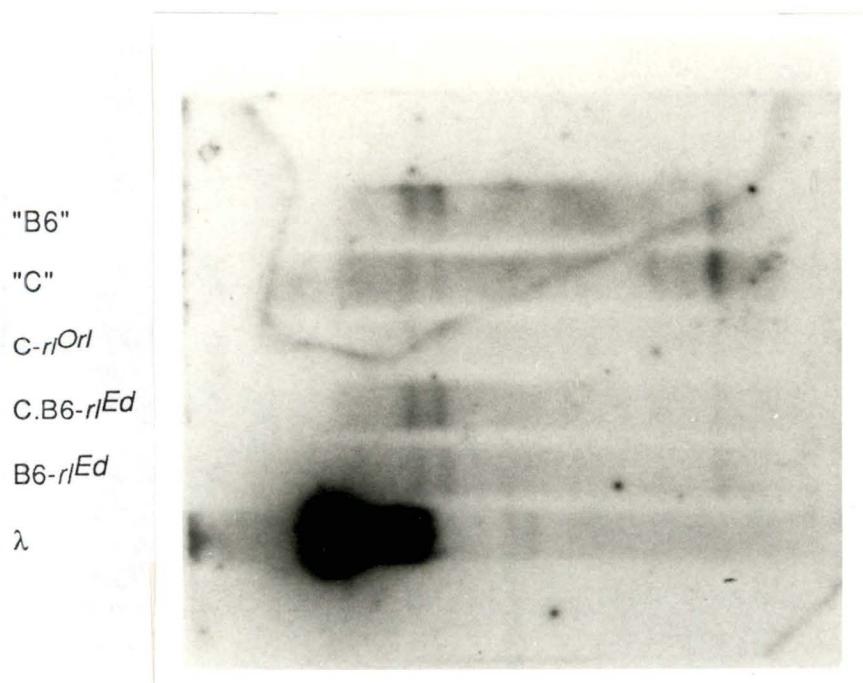


Figure III.2. Analyse en Southern du clone cosmide n° 3. Le profil obtenu fait penser à la reconnaissance de séquences répétées, notamment par la reconnaissance dans toutes les lignées de souris des deux mêmes bandes de forte intensité déjà présentes sur le gel de digestion.

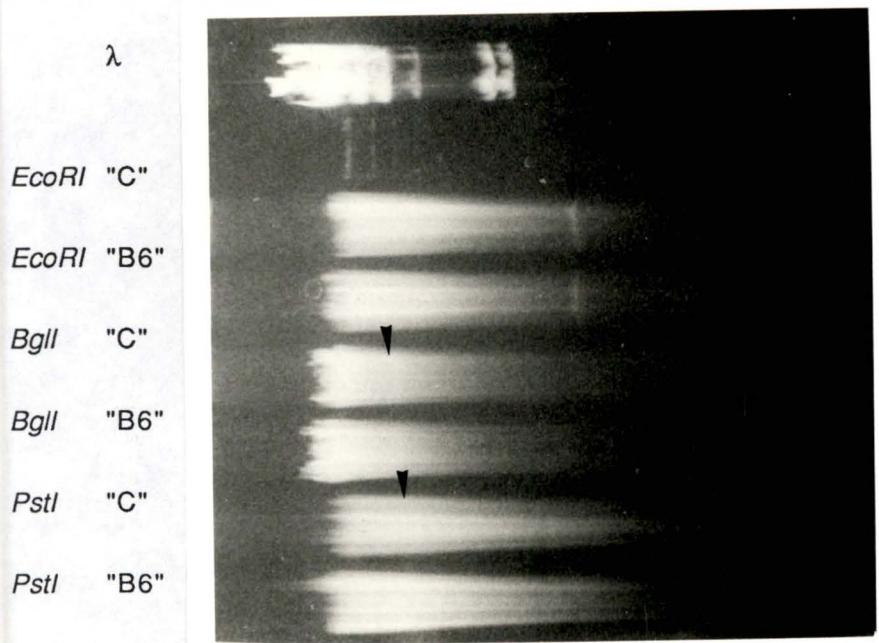


Figure III.3. Gel d'agarose montrant le déplacement des bandes correspondant aux séquences répétées après digestion du DNA de souris par différents enzymes de restriction (*EcoRI*, *BgII*, *PstI*). Ces bandes de plus fortes intensités sont indiquées par une flèche sur la photo du gel.

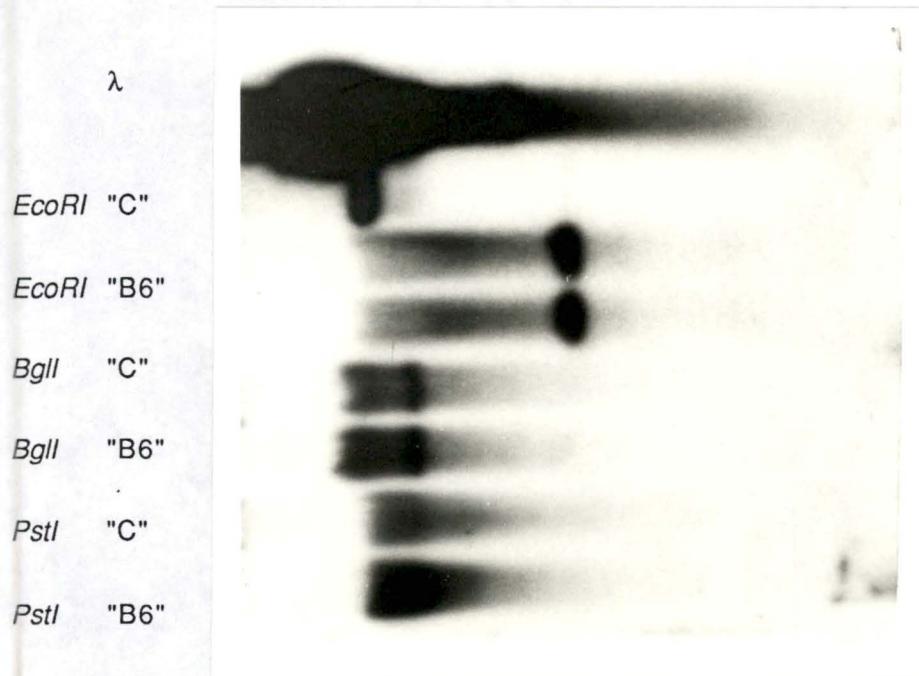


Figure III.4. Southern réalisé à partir du gel ci-dessus. On voit nettement la reconnaissance par le cosmid 3 des zones correspondant aux séquences répétées sur le gel.

après hybridation avec du DNA de hamster. Ceci pourrait théoriquement conduire à l'isolement de DNA chromosomique humain, capable de reconnaître des séquences génomiques de souris.

Les clones possédant ces caractéristiques sont indiqués par une flèche sur la figure III.1. Nous avons ensuite récupéré les clones correspondants (9 en tout, numérotés cosmid 1 à cosmid 9) sur la master plate. Chaque clone a été placé dans 3 ml de LB+Amp et incubé une nuit sous agitation à 37 °C. Ces cultures ont ensuite été congelées dans 0.15 volume de glycérol.

Afin de détecter si les clones sélectionnés pouvaient constituer de nouveaux marqueurs de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris, une maxiprep a été réalisée à partir de chaque culture. D'autre part, 5 µg DNA de souris "B6", "C", C.B6-*r1Ed*, C-*r1Or1* et B6-*r1Ed* ont été digérés par *MspI* et transférés sur 2 membranes de nylon Hybond-N+ par la technique du Southern blotting alcalin. Pour commencer les essais, nous avons choisi au hasard 2 cosmides (cosmid 2 et cosmid 3). 30 ng de chaque cosmid ont été marqués au [P-32] par la technique du "multiprime DNA labelling system". Après préhybridation, les membranes sont incubées une nuit à 65°C en présence soit du cosmid 2 marqué, soit du cosmid 3 marqué. Les lavages sont réalisés dans les conditions suivantes :

- SSPE 2X, SDS 0.1 % : 15' à 65°C.
- SSPE 1X, SDS 0.1 % : 15' à 65°C.
- SSPE 0.3X, SDS 0.1 % : 15' à 65°C.
- SSPE 0.1X, SDS 0.1 % : 15' à 65°C
- SSPE 0.1 X, SDS 0.1 % : 15' à 65°C.

L'autoradiographie est révélée après une nuit d'exposition. Le résultat obtenu pour le cosmid 3 est donné figure III.2. Le résultat obtenu pour l'autre cosmid est similaire. On observe la présence de bandes identiques pour toutes les lignées de souris. Ces bandes correspondent aux bandes les plus intenses présentes sur le gel coloré au bromure d'éthidium et correspondent donc à des séquences répétées. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons réalisé l'expérience suivante: si l'on digère le DNA génomique des souris par des enzymes de restriction différents, les fragments correspondant aux séquences répétées présentent des tailles différentes selon l'enzyme utilisé. Les bandes de plus fortes intensités correspondant à ces séquences répétées seront donc situées à des niveaux différents sur le gel de digestion. Ceci est représenté figure III.3. Si l'insert cloné dans le cosmid que nous avons sélectionné contient bien des séquences répétées, nous devrions mettre en évidence, après Southern, un déplacement des bandes au niveau des zones correspondant à ces séquences répétées sur le gel de digestion. Ceci a bien été observé (voir figure III.4.).

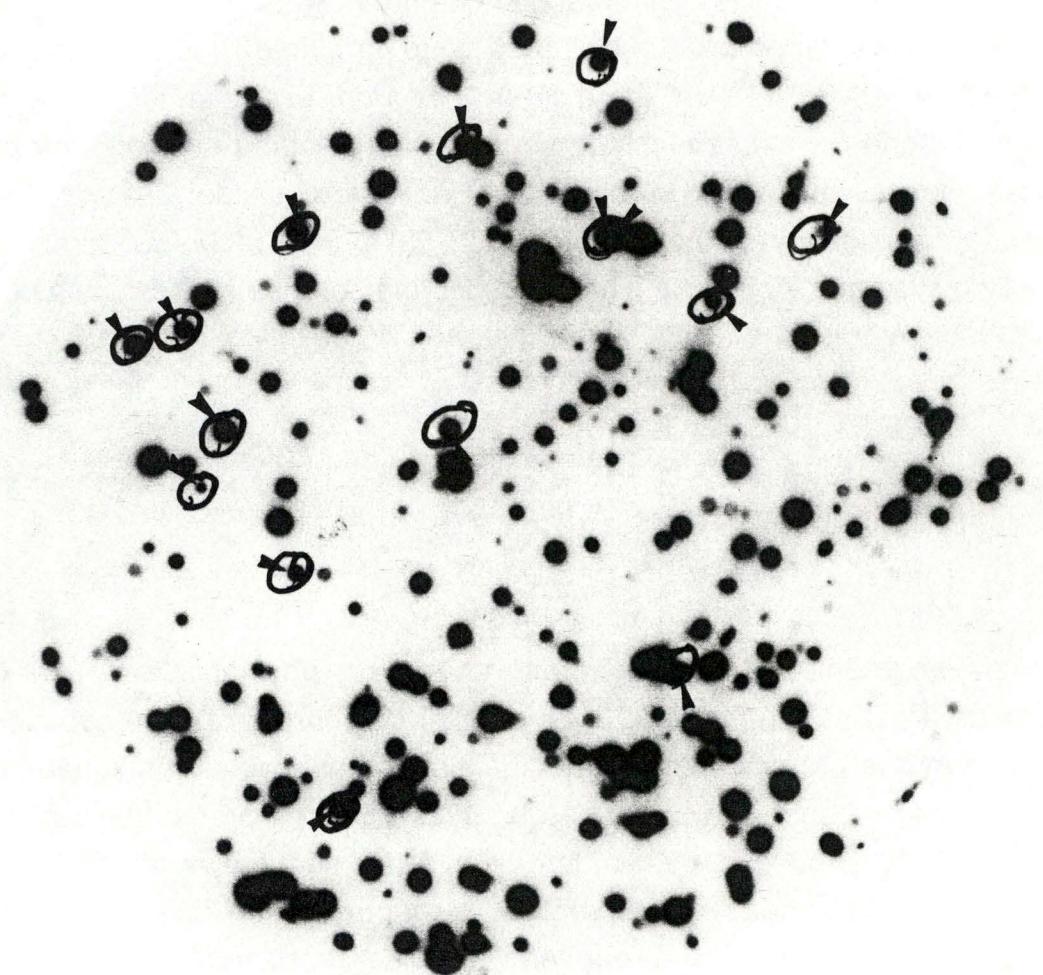


Figure III.5. Screening d'une librairie de charon A21 spécifique du chromosome 7 humain: hybridation d'un filtre réplique avec du DNA humain total marqué. Les clones donnant un signal positif après hybridation avec du DNA humain et de souris, et négatif après hybridation avec du DNA de hamtser sont indiqués par une flèche.

· A la vue de ces résultats, nous avons décidé d'abandonner la recherche de nouvelles sondes dans la librairie de cosmid. En effet, les inserts clonés dans des vecteurs de type cosmid ont en moyenne des tailles de 35 à 45 Kb. Si l'on considère une fréquence de ces séquences répétées de 100000 copies par génome de souris (le génome entier s'étend sur environ 2000 Mégabases), on peut s'attendre à trouver une de ces séquences environ tous les 20 Kb. Il est donc très probable que, vu la taille importante des inserts clonés dans des cosmides, nous trouvions des séquences répétées dans pratiquement tous les clones.

III.2. Screening d'une librairie de Charon A21 spécifique du chromosome 7 humain.

Cette librairie a été obtenue à l'ATCC (American Type Culture Collection, n°57755) . Les inserts ont une taille moyenne de 4 Kb. En théorie, nous avons moins de chance de trouver des séquences répétées dans ces inserts. La recherche de nouveaux marqueurs a été réalisée principalement dans cette librairie.

III.2.1.Screening de la librairie.

Des plaques de lyse ont été réalisées sur une boîte LB de 15 cm de diamètre, de manière à obtenir environ 300 plaques de lyse par boîte. Trois filtres répliques ont ensuite été réalisés. 30 ng de DNA de souris, de hamster syrien et de DNA humain, préalablement dilué et cassé à la seringue, sont marqués au [P-32] par la méthode du "multiprime DNA labelling system". Après préhybridation, chaque membrane est incubée une nuit à 65°C en présence soit du DNA humain marqué, soit du DNA de hamster marqué, soit du DNA de souris marqué. Le lendemain, les lavages sont réalisés dans les conditions suivantes :

- SSPE 2X, SDS 0.1 % : 15' à 65°C.
- SSPE 1X, SDS 0.1 % : 15' à 65°C.
- SSPE 0.3X, SDS 0.1 % : 15' à 65°C.

L'autoradiographie est révélée après une nuit d'exposition. Le résultat obtenu avec le filtre hybridé au DNA humain est présenté figure III.5. A l'aide de l'autoradiographie, nous avons ensuite récupéré sur la master plate , les clones nous donnant un signal positif après hybridation avec le DNA humain et de souris, et négatif après hybridation avec le DNA de hamster. Ceci doit nous permettre de sélectionner des clones contenant des inserts de DNA chromosomique humain, capables de reconnaître du DNA de souris. 14 clones ont été récupérés (dans 500 µl de SM chaque, conservé à 4°C et constituant le stock).

III.2.2. Amplification des clones intéressants par PCR.

Pour tester si ces clones constituent de nouveaux marqueurs de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris, nous avons décidé d'amplifier l'insert contenu dans chaque clone par PCR. Les préparations d'ADN phagien sont en effet fastidieuses et longues (environ une semaine). Par contre, la PCR permet d'obtenir une quantité suffisante d'insert en une journée.

A. Choix et synthèse des primers.

La banque spécifique du chromosome 7 humain a été construite en introduisant les inserts au niveau du site *Hind*III du vecteur Charon A21. Nous avons donc utilisé comme primers des séquences du vecteur flanquant le site d'insertion *Hind*III (Carey et al., 1990).

Primer "right" : 5' TCA CTT CGA CAG AAG AGT TAG TTG 3'.

Primer "left" : 5' CCT TTA AAA AAG TCG TTT CTG CA 3'.

Ces 2 primers ont été synthétisés en mode "trytil on" sur le synthétiseur Applied Biosystems, modèle 381A. Après clivage et déprotection à l'ammoniaque, les primers sont purifiés sur gel de polyacrylamide. Les concentrations après purification sont estimées à 312 µM pour le primer "left" et 301 µM pour le primer "right", dans un volume de 500 µl de TE.

B. Préparation des échantillons pour la PCR.

Nous avons réalisé des plaques de lyse sur boîtes LB de 10 cm de diamètre à partir de 150 µl des 500 µl stock des clones sélectionnés (méthode dérivée de Dumanski, 1990). Sur les 14 clones récupérés, 12 ont donné des plaques de lyse. Dans une boîte 96-puits, nous avons déposé par puits 60 µl d'eau distillée stérile et 3 à 4 plaques de lyse fraîchement préparées, et cela pour chaque clone. Nous avons ensuite laissé diffuser le DNA pendant une nuit à 4°C.

C. Réalisation de la PCR.

Pour 100 µl de réaction :

- 10 µl de tampon 10X.
- 200 µM de chaque dNTP.
- 100 picomoles de chaque primer.

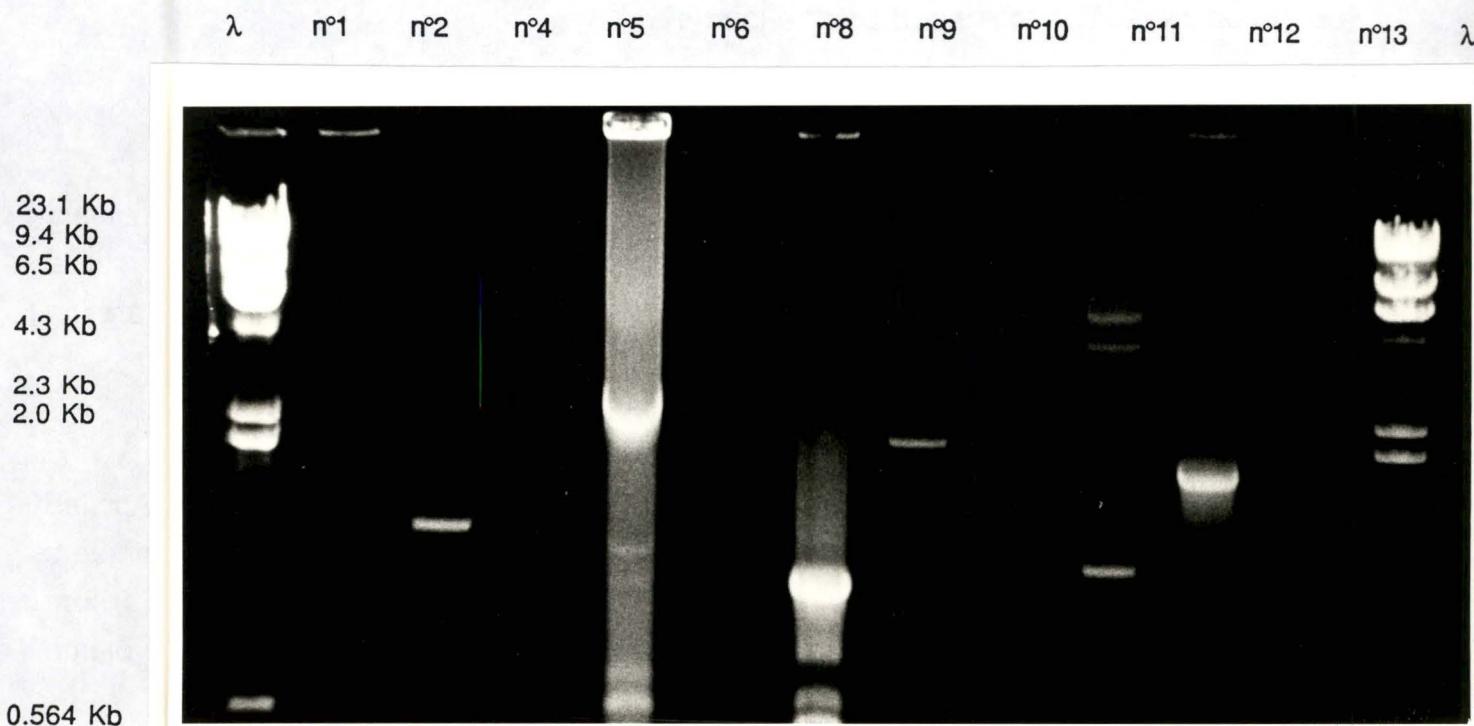


Figure III.6. Amplification par PCR des inserts présents dans la banque de Charon A21 spécifique du chromosome 7 humain. Visualisation de l'amplification par électrophorèse en gel d'agarose.

- 2.5 unités de Taq DNA polymérase.
- porter à 100 µl avec le DNA phagien préparé comme ci-dessus (environ 60 µl).
- couvrir de 100 µl d'huile minérale.

Les conditions des cycles d'amplification sont les suivantes : -3' à 95 °C.

1X.

- 1' à 95°C.
- 1' à 52°C. 30X.
- 4' à 72 °C.
- 10' à 72°C. 1X.

Les résultats de l'amplification sont visualisés par dépôt de 10 µl de chaque échantillon sur un gel d'agarose 1%. Un exemple de résultat obtenu est donné figure III.6. On voit que le taux d'amplification ainsi que la spécificité de la réaction varient d'un clone à l'autre. Ce genre de problème se manifeste par exemple lorsque la quantité de DNA template est trop importante et peut donc être résolu en adaptant cette concentration. La taille des 12 inserts récupérés est donnée ci-dessous.

<i>Clone n°1</i>	5.5 Kb	<i>Clone n°8</i>	1.1 Kb
<i>Clone n°2</i>	1.3 Kb	<i>Clone n°9</i>	2.1Kb
<i>Clone n°4</i>	4.9 Kb	<i>Clone n°10</i>	4 .0Kb
<i>Clone n°5</i>	2.2 Kb	<i>Clone n°11</i>	1.1Kb
<i>Clone n°6</i>	3.6 Kb	<i>Clone n°12</i>	1.8 Kb
<i>Clone n°7</i>	4.4 Kb	<i>Clone n°13</i>	3.1 Kb

Les produits de PCR ont ensuite été récupérés par GeneClean ou sur membrane de DEAE (on récupère en général de 0.2 à 2 µg de DNA pour 100 µl de réaction de PCR après purification).

III.2.3. Analyse des clones isolés en Southern.

60 µg de DNA de souris "C", "B6", C-*r1Orl*, B6-*r1Orl* et C;B6-*r1Ed* sont digérés par *MspI* et transférés sur 12 membranes Hybond-N+ par la technique du Southern blotting alcalin. 30 ng de chaque insert amplifié par PCR et purifié sont marqués au [P-32] par la méthode du "multiprime DNA labelling system". Après préhybridation, chaque membrane est incubée une nuit à 65°C en présence d'un des inserts marqués. Le lendemain, les lavages sont réalisés dans les conditions suivantes :

- SSPE 3X, SDS 0.1 % : 15' à 65°C.
- SSPE 2X, SDS 0.1 % : 15' à 65°C.
- SSPE 0.3X, SDS 0.1% : 15' à 65°C.

"B6"

"C"

C-*r*Orl

C.B6-*r*Ed

B6-*r*Ed

λ

10.



Figure III.7. Analyse en Southern de l'insert extrait par PCR du clone Charon A21 n° 10.

-- SSPE 0.1X, SDS 0.1% : 15' à 65°C.

L'autoradiographie est révélée après une nuit d'exposition. Un exemple de résultat obtenu est donné figure III.7. Les autres résultats nous donnent une image similaire. Ici encore, il semble que les clones que nous avons isolés révèlent uniquement des séquences répétées. L'autoradiographie du filtre réplique que nous avons utilisé pour la sélection des clones potentiellement intéressants aurait déjà dû nous mettre sur la voie, étant donné l'intensité importante du marquage au niveau des clones positifs. Cette voie ne donnant pas de résultats intéressants et dans l'impossibilité d'améliorer la technique de screening initial, nous n'avons pas poursuivi ces expériences.

III.3. Discussion : tentative d'isolement de nouveaux marqueurs de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris et problème des séquences répétées.

Tant l'essai d'isolement de clones intéressants à partir de la librairie de cosmides spécifique du chromosome 7 humain, que la recherche de ces clones dans une librairie de phages λ dérivée de ce chromosome se sont avérées infructueuses.

Nous avons vu que cet échec provient du fait que, lors de la sélection des clones potentiellement intéressants, seuls des clones contenant des séquences répétées sont isolés. La stratégie de sélection utilisée, à savoir la sélection des clones positifs après hybridation avec du DNA humain et de souris, et négatifs après hybridation avec du DNA de hamster, n'est donc pas adéquate. Ceci est déjà visible sur les filtres répliques de phages, et de manière encore plus marquée pour les cosmides. De nombreux clones donnent en effet un signal d'intensité très importante, trop peut-être que pour pouvoir correspondre à l'isolement de fragment correspondant à des gènes uniques. On peut en effet comprendre que si l'insert contenu dans le clone cosmid ou Charon A21 correspond à un gène unique, le signal après hybridation avec du DNA génomique humain total soit trop faible pour être détecté par autoradiographie, surtout après un temps d'exposition d'une nuit. Ce principe a été utilisé par Fuscoe (1989), pour isoler des clones correspondant à des séquences uniques à partir d'une librairie de Charon A21 spécifique du chromosome 21 humain. Une méthode dérivée pourrait permettre la sélection de clones de DNA humain correspondant à des gènes uniques, et présentant une bonne hybridation croisée avec le DNA de souris. On pourrait choisir des clones donnant un signal négatif après hybridation avec du DNA humain, de hamster et de souris. Pour isoler les clones contenant des séquences uniques, mais également capables de reconnaître du DNA de souris, il faut ensuite sous-cloner les inserts dans un plasmide présent en grand nombre d'exemplaires dans un hôte bactérien. Après transfert des bactéries contenant les plasmides sur membrane et

hybridation avec du DNA génomique humain, et grâce au grand nombre d'exemplaires de l'insert présent dans chaque hôte bactérien, on devrait obtenir un signal correspondant à l'isolement d'un gène unique. Il suffirait ensuite de sélectionner les clones capables de reconnaître du DNA de souris.

Même si elle est plus efficace que la méthode que nous avons utilisée, cette stratégie semble bien laborieuse, et nous pensons que d'autres approches doivent être envisagées pour la recherche de nouveaux marqueurs de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris. Etant donné que 90% des séquences génomiques sont non codantes et donnent souvent des signaux très bruités en Southern, nous pensons qu'il serait plus efficace de rechercher de nouveaux marqueurs proches de *reeler* dans des librairies cDNA. En effet, les fragments cDNA donnent souvent des signaux propres en Southern et démontrent volontiers des polymorphismes entre lignées de souris; de plus, les clones cDNA correspondent aux séquences codantes qui sont a priori les plus intéressantes. Une seconde stratégie possible serait l'élimination des séquences répétées présentes dans le DNA utilisé comme sonde (humain, hamster ou souris), de manière à ce que seules des séquences correspondant à des gènes uniques puissent s'hybrider au DNA des filtres répliques. Cette stratégie est basée sur les cinétiques de réassociation. La vitesse de réassociation du DNA dénaturé dépend de la concentration en séquences complémentaires: après dénaturation, des séquences correspondant à des gènes uniques retrouvent plus difficilement et donc plus lentement le brin complémentaire que des séquences présentes en un très grand nombre d'exemplaires. Les techniques utilisables sont de deux types . Premièrement, on peut incuber le DNA marqué et dénaturé qui sera utilisé comme sonde (humain ou de souris) avec le même DNA non marqué, fragmenté et dénaturé. Les séquences répétées, présentes en un plus grand nombre d'exemplaires, se renaturent plus rapidement que les séquences uniques, de sorte que les séquences marquées correspondant à des séquences répétées ne sont plus disponibles (puisque elles sont renaturées) pour l'hybridation avec le DNA fixé sur les filtres répliques et que seules les séquences correspondant à des gènes uniques peuvent alors s'hybrider . La difficulté de cette approche réside dans le choix d'un temps d'incubation adéquat, permettant la renaturation des séquences répétées, mais pas celle des séquences correspondant à des gènes uniques. Deuxièmement, on peut procéder aux hybridations en présence d'un excès de fragments de DNA correspondant aux séquences à hybridation rapide. Pour cela, du DNA génomique est cassé aux ultrasons, dénaturé puis renaturé jusqu'à un produit Cxt prédéfini (on peut utiliser par exemple une valeur Cxt de 1 moles de nucléotides/litre/seconde). Le DNA renaturé au produit Cxt sélectionné est purifié sur colonne d'hydroxyapatite puis

récupéré par concentration et précipitation afin d'être utilisé comme agent bloquant dans les hybridations.

Chapitre IV.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

Les travaux réalisés au laboratoire de Physiologie ont pour but la caractérisation de gènes impliqués dans le développement cérébral. Parmi ceux-ci, le gène *reeler* occupe une place particulièrement importante car de nombreux travaux démontrent qu'il joue un rôle essentiel dans la mise en place de l'architecture cérébrale chez la souris. Le produit du gène *reeler* n'étant pas connu, sa caractérisation et l'étude de son mode d'action ne seront malheureusement possibles qu'après isolement et clonage du gène. Ce "clonage positionnel" du locus *reeler* nécessite l'établissement d'une carte fine du fragment du chromosome 5 où il est situé, et la première étape de la carte consiste en un mapping de différents loci marqueurs de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris par rapport à *reeler*. Notre travail s'inscrit dans ce cadre, et aborde plus spécialement deux questions, à savoir la localisation d'un marqueur connu par rapport à *reeler* et la recherche de nouveaux marqueurs potentiels de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris.

Sur base de travaux antérieurs, nous avons décidé de localiser le marqueur de la sorcine par rapport au locus *reeler*. Cette étude, menée en parallèle avec la localisation d'autres marqueurs de l'extrémité centromérique du chromosome 5, nous a permis d'établir la cartographie suivante : le locus *mdr-1* et celui de la sorcine sont situés à ≈ 7 cM, en position proximale (par rapport au centromère) du locus *reeler*. Le locus *En-2* a été localisé à ≈ 8 cM du locus *reeler*, en position distale par référence au centromère. L'ensemble de ces travaux permet d'établir la carte génétique suivante de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de souris :

Cen. - Sorcine/ *mdr-1* - *reeler* - *T31H* - *En-2* - autres loci.

L'étroite association entre le locus de la sorcine et *mdr-1* indique que le gène codant pour la sorcine est situé à proximité de ceux des P-glycoprotéines chez la souris, ce qui est aussi le cas chez le hamster où ces gènes font partie d'un segment chromosomique amplifié dans des lignées cellulaires soumises à l'action de drogues anticancéreuses, appelé l'amplicon MDR. Nos résultats suggèrent donc que l'organisation de l'amplicon MDR pourrait être identique chez la souris et chez le hamster. En parallèle de l'estimation de la localisation du locus de la sorcine par techniques génétiques classiques, nous avons tenté de mettre en évidence un polymorphisme pour ce locus, par amplification par PCR d'un fragment de DNA

flanqué par des primers conservés chez le hamster et chez l'homme. Cette approche s'est révélée infructueuse, en ce sens que nous n'avons pas réussi à amplifier le locus de la sorcine ni à démontrer une amplification polymorphe. Nous avons par contre amplifié une séquence différente dont le clonage et le séquençage ont montré qu'elle correspond à une partie du gène de la cyclophiline de souris.

Nos travaux démontrent que les marqueurs utilisés jusqu'à présent sont trop éloignés de *reeler* que pour permettre l'approche du locus par "walking" ou même par "jumping". D'autres marqueurs de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de la souris doivent donc être recherchés

Des régions de synténie étant connues entre l'extrémité centromérique du chromosome 5 de souris et le chromosome 7 humain, nous avons décidé de rechercher ces nouveaux marqueurs potentiels dans des banques génomiques dérivées de ce chromosome, à savoir une banque de cosmides et une banque de phage Charon A21, toutes deux spécifiques du chromosome 7 humain. Nous avons montré que cette approche n'était pas concluante, conduisant à la sélection systématique de clones contenant des séquences répétées ou en tout cas ubiquitaires et inutilisables pour le mapping.

D'autres approches doivent donc absolument être envisagées pour trouver de nouveaux marqueurs du segment chromosomal qui nous intéresse. Différentes voies sont possibles et feront l'objet d'expériences futures. Premièrement, des travaux récents suggèrent qu'il est possible d'éliminer l'hybridation aux séquences ubiquitaires en réalisant les hybridations en présence de DNA enrichi en séquences à hybridation rapide. Ce dernier est produit en fragmentant du DNA génomique de souris aux ultrasons et en le laissant s'associer jusqu'à un Cot déterminé (de l'ordre de 1), puis en purifiant le DNA double brin contenant les séquences ubiquitaires sur hydroxyapatite. Deuxièmement, comme les sondes produites à partir de cDNA se comportent de manière plus satisfaisantes en Southern que les fragments génomiques, la recherche de nouveaux marqueurs pourrait se faire dans des librairie de cDNA plutôt que dans des librairies génomiques. Troisièmement, il existe une lignée cellulaire hybride hamster-chromosome 5 de souris qui est donc enrichie en séquences du chromosome 5 murin et l'on peut penser trouver plus facilement des sondes intéressantes dans une librairie cosmide produite à partir de cette lignée.

Quelle que soit l'approche suivie, il reste que l'isolement d'un locus par cloning positionnel demeure une entreprise longue, difficile et dont le succès n'est jamais garanti. Notre travail souligne donc l'intérêt qu'il y aurait à élargir les investigations à d'autres gènes que le gène *reeler* et à s'intéresser à des gènes spécifiquement exprimés dans le cerveau embryonnaire, ce qui suppose la

production de librairies cDNA de cerveau embryonnaire enrichies en séquences correspondant à des messages rares.

Chapitre V.

BIBLIOGRAPHIE.

BIBLIOGRAPHIE

- Carey, A.H., Roach, S., Williamson, R., Dumanski, J.P., Nordenskjold, M., Collins, V.P., Rouleau, G., Blin, Jalbert, P., Scambler, P.J., *Localization of 27 DNA Markers to the Region of Human Chromosome 27q11-pter Deleted in Patients with the DiGeorge Syndrome and Duplicated in the der22 Syndrome*, Genomics, 7, 1990, pp. 299-306.
- Caviness, V.S., So, D.K., Sidman, R.L., *The Hybrid Reeler Mouse*, The Journal of Heridity, Vol. 63, No. 5, 1972, pp. 241-246.
- De Bruijn, M.H.L., Van der Bliek, A.M., Biedler, J.L., Borst, P., *Differential Amplification and Disproportionate Expression of Five Genes in Three Multidrug-Resistant Chinese Hamster Lung Cell Lines*, Molecular and Cellular Biology, Dec. 1986, Vol. 6, No. 12, pp. 4717-4722.
- Dumanski, J.P., *Rapid Procedures for the Isolation of Random Chromosome-specific DNA Probes from a Phage Library*, A journal of methods in cell and molecular biology, Vol 2, No 1, February 1990, pp. 31-35.
- Endicott, J.A., Ling, V., *The Biochemistry of P-glycoprotein-mediated Multidrug Resistance*, Annu. Rev. Biochem., 58, 1989, pp. 137-171.
- Erlich H.A., *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, Stockton Press , 1989.
- Falconer, D.S., *Location of Reeler in Linkage Group III of the Mouse*, Heredity, 6, 1952, pp. 255-257.
- Falconer, D.S., *Two New Mutants, 'Trembler' and 'Reeler', with Neurological Actions in the House Mouse*, J. Genet., 50, 1951, pp. 192-201
- Flaherty, L., *Congenic Strains*. In H.L. Foster, J.D. Small and J.G. Fox (Eds.), *The Mouse in Biomedical Research*, Vol. I, Academic, New York, 1981
- Fuscoe, J.C., Collins, C.C., Pinkel, D., Gray, J.W., *An Efficient Method for Selecting Unique-sequence Clones from DNA Libraries and its Application to Fluorescent Staining of Human Chromosome 21 Using in Situ Hybridization*, Genomics 5, 1989, pp. 100-109.
- Goffinet, A.M., *Cerebellar Phenotype of Two Alleles of the 'Reeler' Mutation on Similar Backgrounds*, Brain Research, 519, 1990, pp. 355-357.
- Goffinet, A.M., Dernoncourt, C, *Localization of the Reeler Gene Relative to Flanking Loci on Mouse Chromosome 5*, Mammalian Genome, 1, 1991, pp. 100-103.
- Goffinet, A.M., *Determinants of Nerve Cell Patterns During Development: A Review*, European Journal of Morphology, Vol. 28, No. 2-4, 1990, pp. 149-168.
- Goffinet, A.M., *Events Governing Organization of Postmigratory Neurons: Studies on Brain Development in Normal and Reeler Mice*, Brain Research Reviews, 7, 1984, pp. 261-296.

Green, M.C., *Gene Mapping*. In H.L. Foster, J.D. Small and J.G. Fox (Eds.), *The Mouse in Biomedical Research*, Vol. I, Academic, New York, 1981.

Haendler, B., Hofer-Warbinek, R., Hofer, E., *Complementary DNA for Human T-Cell Cyclophilin*, The EMBO Journal, Vol. 6, No. 4, 1987, pp. 947-950.

Hasel, K.W., Sutcliffe, J.G., *Nucleotide Sequence of a cDNA Coding for Mouse Cyclophilin*, Nucleic Acids Research, 18, 1990, pp. 4019-4019.

Hillyard, A.L., Doolittle, D.P., Davisson, M.T., and Roderick, T.H., *Locus Map of Mouse, Mouse Genome*, 89, 1991.

Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, 1990.

Jongsma, A.P.M., Riethorst, A., Aten, J.A., *Determination of the DNA Content of a Six-Gene Amplicon in the Multidrug-resistant Chinese Hamster Cell Line CHRB3 by Flow Karyotyping*, Cancer Research, 50, May 1990, pp. 2803-2807.

Jongsma, A.P.M., Spengler, B.A., Van der Bliek, A.M., Borst, P., and Biedler, J.L. *Chromosomal Localization of Three Genes Coamplified in the Multidrug-resistant CHRC5 Chinese Hamster Ovary Cell Line*, Cancer Research, 47, 1987, pp. 2875-2878.

Joyner, A.L. and Martin, G.R., *En-1 and En-2, Two Mouse Genes with Sequence Homology to the Drosophila Engrailed Gene: Expression during Embryogenesis*, Genes Dev., 1, 1987, pp. 29-38

Lau, Y.F., Kan, Y.W., *Versatile Cosmid Vectors for the Isolation, Expression, and Rescue of Gene Sequences: Studies with the Human α -globin Gene Cluster*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 80, 1983, pp. 5225-5229.

Logan, C., Willard, H.F., Rommens, J.M., Joyner, A.L., *Chromosomal Localization of the Human Homeo-box-containing Genes En-1 and En-2*, Genomics, 4, 1989, pp. 206-209.

Lyon, M.F., Searle, A.G., *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*, Oxford University Press, Second Edition, 1989.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, 1982.

Martin, G.R., Richman, M., Reinsch, S., Nadeau, J.H., Joyner A., *Mapping of the Two Mouse Engrailed-like Genes: Close Linkage of En-1 to Dominant Hemimelia (Dh) on Chromosome 1 and of En-2 to Hemimelic Extra-toes (Hx) on Chromosome 5*, Genomics, 6, 1990, pp. 302-308.

Martinson, T., Levan, G., *Localization of the Multidrug Resistance-associated 170 kDa P-glycoprotein Gene to Mouse Chromosome 5 and to Homogeneously Staining Regions in Multidrug-resistant Mouse Cells by in situ Hybridization*, Cytogenet Cell Genet, 45, 1987, pp. 99-101.

Melmer, G., Sood, R., Rommens, J., Rego, D., Tsui, L., Buchwald, M., *Isolation of Clones on Chromosome 7 That Contain Recognition Sites for Rare-Cutting Enzymes by Oligonucleotide Hybridization*, Genomics, 7, 1990, pp. 173-181.

Meyers, M.B., Biedler, J.L., *Increased Synthesis of a Low Molecular Weight Protein in Vincristine-resistant Cells*, Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 99, No. 1, 1981, pp. 228-235.

Mock, B.A., Nordan, R.P., Justice, M.J., Kozak, C., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Clark, S., Wong, G., Rudikoff, S., *The Murine IL-6 Gene Maps to the Proximal Region of Chromosome 5*, J. Immunol., 1989, Vol 142, pp. 1372-...

Rakic, P., *Principles of Neural Cell Migration*, Experientia, 46, 1990, pp. 882-891.

Raymond, M., Rose, E., Housman, D.E., Gros, P., *Physical Mapping, Amplification and Overexpression of the Mouse mdr Gene Family in Multidrug-resistant Cells*, Molecular and Cellular Biology, Vol. 10, No 4, 1990, pp. 1642-1651.

Riordan, J.R., Deuchars, K., Kartner, N., Alon, N., Trent, J., Ling, V., *Amplification of P-glycoprotein Genes in Multidrug-resistant Mammalian Cell Lines*, Nature, 1985, Vol. 316, pp. 817-823.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., *Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase*, Science, Vol. 289, 1988, pp. 487-491.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., *DNA Sequencing with Chain-terminating Inhibitors*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 74, No. 12, 1977, pp. 5463-5467.

Tabor, S., Richardson, C.C., *DNA Sequence Analysis with a Modified Bacteriophage T7 DNA Polymerase*, Proc. Natl. Acad. USA, Vol. 84, 1987, pp. 4767-4771.

Trent, J.M., Witkowski, C.M., *Clarification of the Chromosomal Location of the Human P-glycoprotein (mdr-1) Gene*, Cancer Genet Cytogenet, 26, 1987, pp. 187-190.

Van der Bliek, A.M., Van der Velde-Koerts, T., Ling, V., Borst, P., *Overexpression and Amplification of Five Genes in a Multidrug-Resistant Chinese Hamster Ovary Cell Line*, Molecular and Cellular Biology, May 1986 (a), pp. 1671-1678.

Van der Bliek, A.M., Meyers, M.B., Biedler, J.L., Hes, E., Borst, P., *A 22-kd Protein (Sorcin/V19) Encoded by an Amplified Gene in Multidrug-resistant Cells, is Homologous to the Calcium-binding Light Chain of Calpain*, The EMBO Journal, Vol. 5, No. 12, 1986 (b), pp. 3201-3208.

Van der Bliek, A.M., Baas, F., Van der Velde-Koerts, T., Biedler, J.L., Meyers, M.B., Ozols, R.F., Hamilton, T.C., Joenje, H., Borst, P., *Genes Amplified and Overexpressed in Human Multidrug-resistant Cell Lines*, Cancer Research, 48, 1988, pp. 5927-5932.

Van Dilla, M.A., Deaven, L.L., *Construction of Gene Libraries for Each Human Chromosome*, Cytometry, 11, 1990, pp.208-218.

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN: acide désoxyribonucléique.
Ampi: ampicilline.
ARN: acide ribonucléique.
ATP: adénosine triphosphates.
B6-*r/Ed*: souris *reeler Edinburgh* (noires).
"B6": ligné de souris C57B1/6 (noires).
C-r/Orl:souris *reeler Orléans.* (blanches).
C.B6-*r/Ed*: lignée congénique.
C.O. : crossing-over.
"C": lignée de souris BALB/c(blanches).
cDNA: DNA complémentaire.
cM: centiMorgan.
ddNTPs: 2',3'-didéoxyribonucléotides 5'-triphosphates.
dNTPs: 2'-désoxyribonucléotide 5'-triphosphates.
DO: densité optique.
E.Coli: *Escherichia coli*.
g: gramme.
IPTG: isopropylthio-β-D galactoside.
Kb: kilobases(1000 paires de bases).
Kd: kilodalton.
λ: lambda.
l: litre
LB: millieux riche pour bactérie.
M: molaire
maxiprep: préparation en grande quantité d'ADN plasmidique.
μg: microgramme.
mg: milligramme.
μl: microlitre.
ml: millilitre.
mM: millimolaire.
mRNA: ARN messager.
ng: nanogramme .
pb: paire de bases.
rpm: rotation par minute.
SNC: système nerveux central.
UV: ultra-violet.
X-gal: 5-bromo 4-chloro 3-indolyl β-D galactoside.