



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Caractérisation de séquences codantes à partir de chromosomes artificiels de levure provenant de la région reeler

Brüls, Thomas

Award date:
1993

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



**FACULTES UNIVERSITAIRES N.-D. DE LA PAIX
NAMUR
FACULTE DES SCIENCES**

**Caractérisation de séquences codantes à partir
de chromosomes artificiels de levure provenant
de la région *reeler*.**

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

**Thomas Bröls
Décembre 1993**

**Caractérisation de séquences codantes à partir de
chromosomes artificiels de levure provenant
de la région *reeler*.**

BRÜLS Thomas

Résumé

Reeler est une mutation qui affecte le développement embryonnaire du système nerveux central. L'absence d'informations sur le produit du gène *reeler* rend le clonage positionnel du gène indispensable pour élucider le mécanisme d'action de la mutation. A cette fin, plusieurs marqueurs situés à moins d'1 cM de *reeler* ont été identifiés et ont servi de point de départ à l'agencement d'un ensemble de chromosomes artificiels de levure (YACs) chevauchants.

Nous avons évalué la possibilité d'enrichir une banque cDNA d'embryons totaux en cDNAs spécifiquement encodés dans le DNA génomique cloné dans ces YACs. La stratégie de "capture magnétique" élaborée par D. A. Tagle (1993), basée sur une hybridation différentielle de cDNAs au DNA biotinylé de YACs, nous a permis de sélectionner une dizaine d'inserts. Deux de ceux-ci ont été caractérisés de façon plus approfondie. Les résultats de la cartographie du premier insert nous ont permis de confirmer son origine sur le YAC utilisé pour la sélection et de valider la technique. Les résultats plus ambigus du deuxième insert pourraient avoir des implications importantes au niveau de la construction du contig de YACs.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)

Décembre 1993

Promoteur : J. Vandenhaute

Co-promoteur : A. M. Goffinet

Je remercie le Professeur J. Vandehaute, qui a éveillé mon goût pour la génétique et permis la réalisation de ce mémoire.

Je remercie tout spécialement le Professeur André M. Goffinet pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, et pour l'intérêt soutenu qu'il a manifesté pour ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Marie-Claire Beckers ; elle a rendu agréable et captivant mon premier contact avec l'univers du DNA Recombinant.

Je remercie aussi Isabelle Bar pour sa disponibilité, ses conseils judicieux, et sa bonne humeur qui m'a accompagnée tout au long de ce mémoire.

Je remercie spécialement Inès Royaux pour l'aide immesurable qu'elle m'a apportée lors de la finition de ce mémoire. Elle sait combien je lui en suis reconnaissant.

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire : Catherine, Christiane, Danielle, Daniel, Mr I. Becsei, Pascal et Thanh, dont la bonne humeur et l'assistance efficace constitueront pour moi un souvenir inoubliable.

Je remercie le Professeur J. Delcour, le Dr C. Michiels et A. Tibor d'avoir accepté de lire ce mémoire.

Enfin, je tiens à remercier Caroline et toutes les personnes que je ne puis nommer, mais qui ont contribué d'une façon ou d'une autre à rendre ces quatre dernières années agréables et enrichissantes.

A eux tous, à mes parents,

Merci.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

B6	= lignée de souris C57B1/6
bp	= paire de base (base pair)
C	= lignée de souris BALB/c
cDNA	= DNA complémentaire
CIAA	= chloroforme / alcool isoamylique
cM	= centimorgan
DEPC	= diétylpyrocarbonate
DNA	= acide désoxyribonucléique
dNTPs	= 2'-déoxyribonucléotides 5'-triphosphates
ddNTPs	= 2', 3'- dideoxyribonucléotides 5'-triphosphates
E. coli	= <i>Escherichia coli</i> .
IPTG	= Isopropylthio- β -D Galactoside
Kb	= kilobases
pBS	= plasmide Bluescript
PCR	= Réaction de Polymerisation en Chaîne
PFGE	= Eléctrophorèse en Champ Pulsé (Pulsed Field Gel Electrophoresis)
RFLP	= Polymorphisme de Longueur de Fragments de Restriction
RNA	= acide ribonucléique
SDS	= sodium dodecyl sulfate
SNC	= système nerveux central
SSCP	= polymorphisme de conformation de chaîne simple brin
STS	= "Sequence Tagged Site"
TCA	= acide trichloroacétique
TE	= Tampon Tris-EDTA
UV	= lumière ultra-violette
X-gal	= 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D Galactoside
YAC	= Chromosome Artificiel de Levure (Yeast Artificial Chromosome)

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

I. Généralités	p 1
II. Quelques aspects du développement cérébral	p 2
III. <i>Reeler</i> et l'évolution	p 3
IV. Intérêts à cloner le gène <i>reeler</i>	p 3
V. La stratégie du clonage positionnel	p 4
V. 1. Saturation de la région <i>reeler</i>	p 4
V. 2. La marche vers <i>reeler</i>	p 8
V. 3. Bilan de la cartographie fine et de la construction du contig.....	p 10
V. 4. Isolement de séquences codantes.....	p 11
V. 5. Caractérisation des séquences isolées.....	p 15
VI. But du travail	p16

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Techniques relatives à la manipulation de bactéries, plasmides et phages	p 17
II. Techniques relatives à la manipulation de levures	p 20
III. Construction d'une banque de cDNA	p 21
IV. Capture magnétique de cDNAs encodés dans des YACs	p 27
V. Sélection directe	p 32
VI. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	p 34
VII. Électrophorèse sur gel d'agarose	p 37
VIII. Southern blot alcalin	p 39
IX. Techniques d'hybridation sur filtre à l'aide de sondes radioactives	p 41
X. Séquençage cyclique.....	p 43
XI. Calcul de distances génétiques.....	p 46

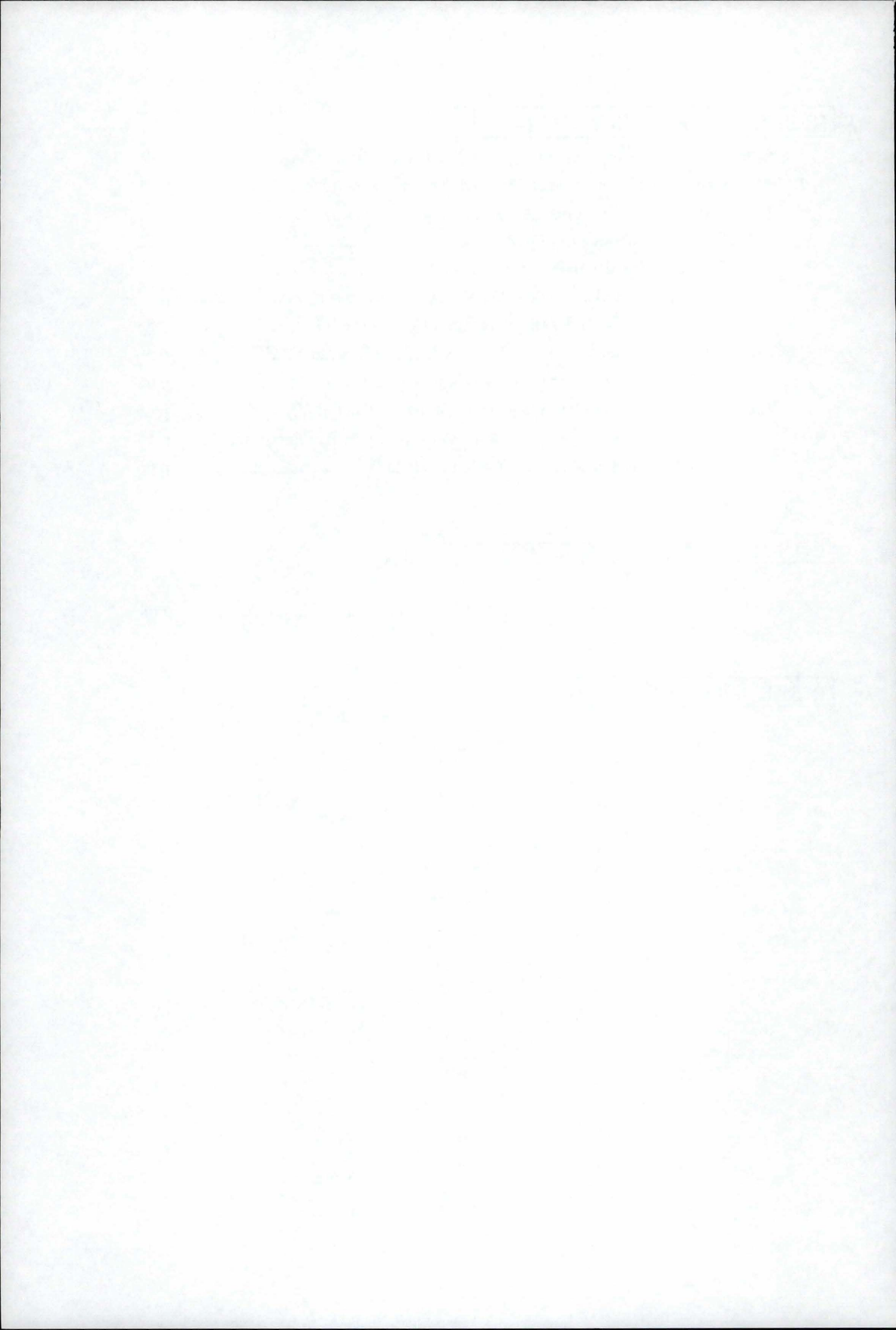
RÉSULTATS ET DISCUSSION

I. Construction d'une banque cDNA à partir d'embryons totaux E14.....	p 49
II. Isolement et caractérisation de cDNAs par capture magnétique.....	p 50
II.1. Purification de DNA de YAC.....	p 51
II.2. Capture magnétique de cDNAs.....	p 52
II.3. Caractérisation des inserts clonés.....	p 54
II.3.1. Caractérisation des cDNAs sélectionnés par le YAC 24-5E.....	p 54
II.3.2. Discussion des résultats relatifs à l'insert n°27.....	p 58
II.3.3. Caractérisation des cDNAs sélectionnés par le YAC FAT-F4...	p 59
II.3.4. Discussion des résultats relatifs à l'insert n°1.....	p 62
II.4. Limitations potentielles à la généralisation de la technique.....	p 65
II.4.1. Problèmes liés à l'utilisation des inserts en tant que sondes.....	p 65
II.4.2. Biais contre les cDNAs de grande taille.....	p 66

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Conclusions et perspectives.....	p 68
----------------------------------	------

BIBLIOGRAPHIE



INTRODUCTION

I. GÉNÉRALITÉS.

Reeler est une mutation autosomale récessive caractérisée pour la première fois à Edinburgh en 1948 (Falconer, 1951). Cet allèle est entretenu sur un background isogénique C57B1/ 6J (noté B6). Une seconde mutation *reeler* est apparue à Orléans en 1969. Cet allèle, noté r^{Orl} est disponible sur un background Balb/c (noté C). La construction de lignées congéniques a permis de comparer les 2 allèles sur les 2 backgrounds et de montrer que les différences morphologiques entre allèles Ed et Orl sont uniquement liées au background.

Le phénotype *reeler* est visible à divers niveaux du système nerveux central (SNC), particulièrement au niveau du cervelet qui est très atrophié et responsable des signes cliniques (ataxie et tremblements). Des analyses morphologiques au cours du développement (revues par Goffinet, 1984) suggèrent une absence de stabilisation des neurones à la fin de leur migration radiale, avec pour conséquence le développement de patterns architectoniques anarchiques ne permettant pas le gain de complexité associé à la mise en place des différentes structures du SNC. Le caractère *reeler* se manifeste exclusivement au niveau architectonique en ce sens que les neurones *reeler* sont générés en temps et en nombre normal. Inspirée de ces travaux morphologiques, l'hypothèse selon laquelle *reeler* affecterait un événement de reconnaissance intercellulaire fut formulée dès 1979 (Goffinet, 1984). Cependant, bien que plusieurs molécules d'adhésion cellulaire impliquées dans le développement neuronal soient décrites, les données de cartographie génétique les excluent en tant que gènes candidats pour *reeler*.

II. QUELQUES ASPECTS DU DÉVELOPPEMENT CÉRÉBRAL.

Trois étapes principales se succèdent dans l'histogenèse cérébrale :

- 1) Le stade prolifératif durant lequel les précurseurs des neurones prolifèrent dans la zone ventriculaire.
- 2) Le stade migratoire où les jeunes neurones migrent radialement à travers la zone intermédiaire et viennent s'établir au niveau de la plaque corticale suivant une séquence bien précise.
- 3) Le stade de maturation durant lequel le réseau complexe de connexions s'établit.

La période située entre le jour embryonnaire 11 (E11) et E14 est consacrée à la production des neurones destinés à la plaque corticale. Du point de vue histologique, le cortex n'est que peu différencié à ce moment. C'est vers E14 que les premiers patterns architectoniques apparaissent dans le cortex et que se manifestent les premiers effets morphologiques de *reeler*, à savoir le positionnement anarchique des neurones au niveau de la plaque corticale et l'inversion du gradient d'histogenèse (ce gradient est normalement dirigé de dedans en dehors : chez tous les mammifères, les neurones néoformés traversent au cours de leur migration les couches de neurones plus anciens, pour constituer des couches de plus en plus superficielles).

La manifestation à E14 des anomalies associées à *reeler* est à la base d'une stratégie de soustraction entre banques de DNA complémentaire (cDNA) E11 et E14 en vue d'identifier des clones préférentiellement exprimés dans le cerveau embryonnaire à E14 (Coche, 1993 : communication personnelle).

III. REELER ET L'ÉVOLUTION.

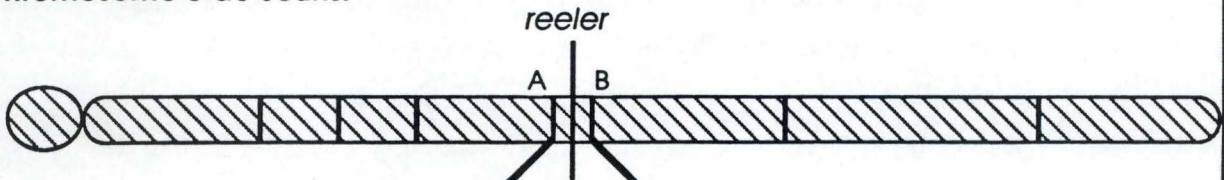
Des études comparées du développement cortical chez des animaux appartenant à différentes lignées de reptiles ont démontré que l'organisation radiale de la plaque corticale n'est pas de type tout ou rien (Goffinet, 1992). Au contraire, il semblerait que l'architectonique cellulaire se soit plutôt complexifiée à des degrés divers après divergence phylétique. Il est intéressant de noter la différence qui existe au niveau du cortex médian entre le type d'organisation primitif des tortues, et celui plus élaboré des lézards: un gradient d'histogenèse orienté de l'extérieur vers l'intérieur est trouvé dans le cortex médian des tortues, alors qu'aucune direction précise de gradient n'est définie chez les lézards. Nous avons déjà mentionné que le cortex des mammifères se formait suivant un gradient orienté de l'intérieur vers l'extérieur. Ce type de gradient est inexistant dans le cortex des reptiles et peut être considéré comme marquant une acquisition importante dans l'évolution du cortex cérébral. Plus intéressant, le fait que le gradient d'histogenèse chez la souris *reeler* est orienté de l'extérieur vers l'intérieur, comme celui de certains reptiles, permet de supposer que l'acquisition au cours de l'évolution, d'un gradient cortical dirigé vers l'extérieur requiert la présence d'un allèle fonctionnel au niveau du locus *reeler* (Goffinet, 1992).

IV. INTÉRÊTS À CLONER LE GÈNE REELER.

Reeler semble donc tenir un rôle clé dans la régulation génétique du développement cérébral, et l'acquisition de ce gène a probablement marqué une étape importante dans l'évolution du cortex cérébral dans la lignée qui mène des reptiles aux mammifères. De plus, la mutation *reeler* constitue un modèle pour certaines maladies humaines caractérisées par la présence d'hétérotopies neuronales et d'anomalies architectoniques, en particulier le syndrome hépato-cérébro-rénal ou maladie de Zellweger (Shimozawa *et al.*, 1992).

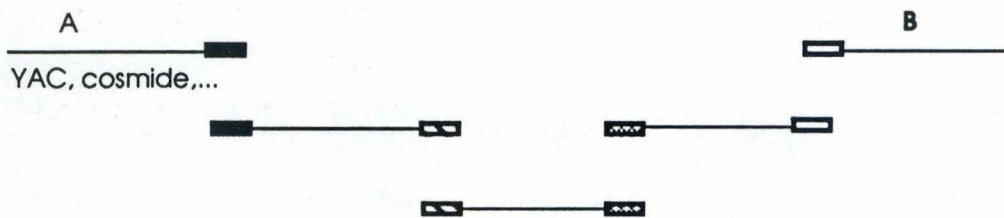
L'isolement du gène *reeler*, la caractérisation de son produit et de son mécanisme d'action fourniraient des éléments essentiels à la compréhension du développement et de l'évolution du SNC, de même qu'à l'approche médicale de problèmes tels que la débilité mentale chez l'homme. Etant donné l'absence d'informations biochimiques et immunologiques sur le produit du gène *reeler*, la réalisation de ces objectifs repose sur le clonage du gène.

Chromosome 5 de souris.



Etape n°1 : A et B : 2 marqueurs situés à moins de 1 cM de reeler (analyse de panneaux backcross et intercross).

Etape n°2 : Construction d'un contig = ensemble de clones contigus contenant le gène recherché.



Etape n°3 : Le contig est caractérisé, et le gène candidat isolé.

Figure 1 : Principe du clonage positionnel.

V. LA STRATÉGIE DU CLONAGE POSITIONNEL.

La stratégie du **clonage positionnel** consiste à isoler un gène sur la seule base de sa localisation chromosomique. On peut la décomposer schématiquement en 3 étapes (figure 1) :

- 1) L'isolement de marqueurs génétiques proches, à moins d'un centimorgan (cM) du gène d'intérêt. Cette étape requiert la caractérisation de marqueurs informatifs potentiellement intéressants, et la localisation de ces marqueurs par croisements génétiques et détermination du pourcentage de recombinaison avec le gène d'intérêt.
- 2) Lorsque des marqueurs suffisamment proches du gène sont trouvés, une marche sur le chromosome ("chromosome walking") est entreprise en direction du gène recherché jusqu'à ce que la région génomique d'intérêt soit reconstituée sous forme d'un agencement de clones chevauchants, appelé "contig".
- 3) Lorsque le contig est établi, la caractérisation de séquences codantes et l'isolement de gènes candidats à partir du DNA cloné peut débuter.

Ainsi, une approche combinant la saturation en marqueurs informatifs de la région contenant *reeler* à la construction du contig et à la caractérisation de séquences codantes, devrait permettre l'isolement d'un fragment de DNA contenant des séquences candidates pour *reeler* après quelques années de travail.

V. 1. Saturation de la région *reeler*.

La saturation de la région *reeler* requiert l'établissement d'une carte génétique fine de la partie centromérique du chromosome 5. Cette carte positionne *reeler* par rapport à d'autres marqueurs proches en mesurant les fréquences de recombinaison entre *reeler* et ces marqueurs sur des panneaux backcross et intercross. A cette fin, plusieurs sources de marqueurs sont ont été exploitées simultanément :

- Localisation par rapport à un point de translocation
- Exploitation d'un lignée cellulaire hybride
- Données de cartographie chez l'homme
- Microdissection
- Suivi de la littérature
- Criblage d'une banque cDNA

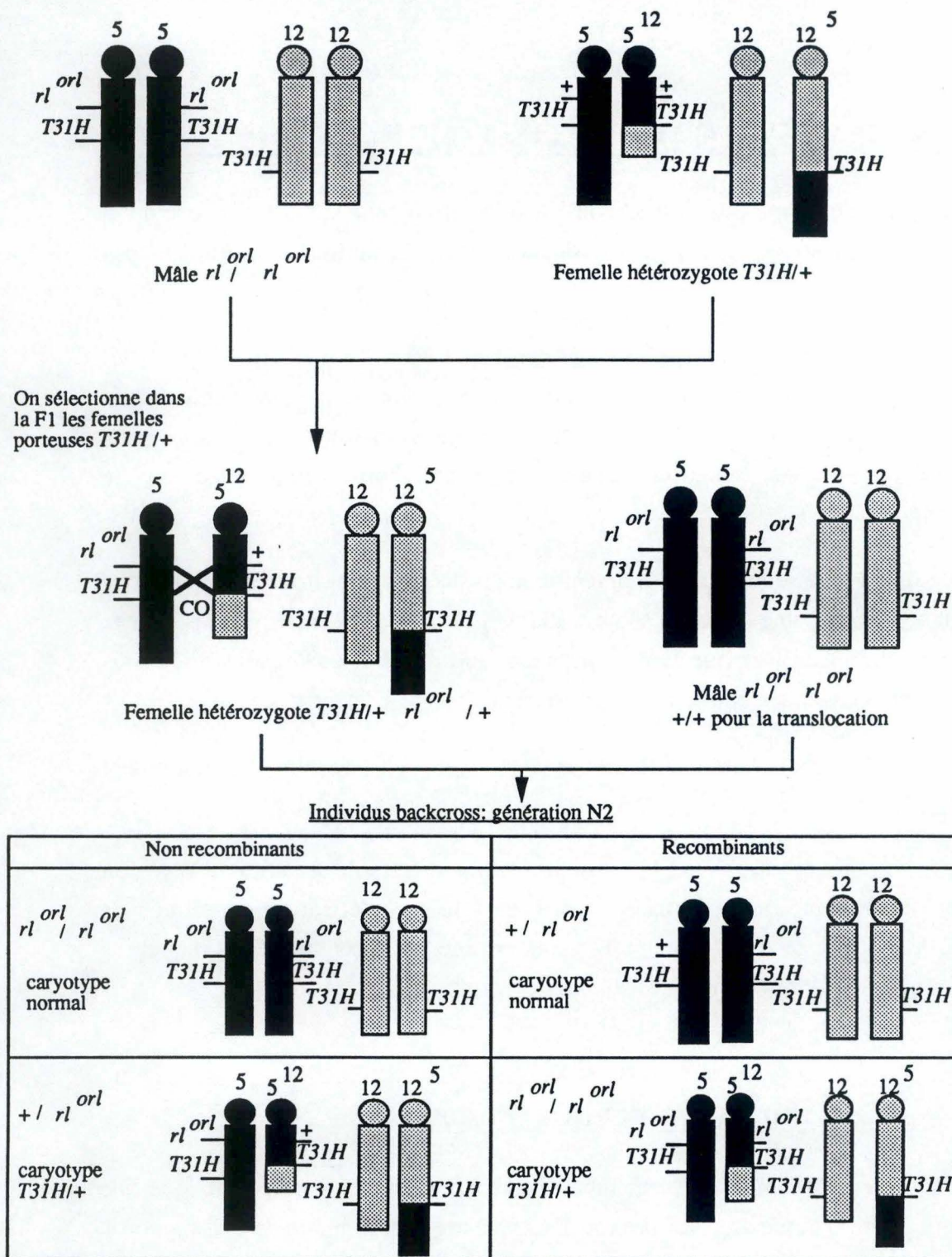
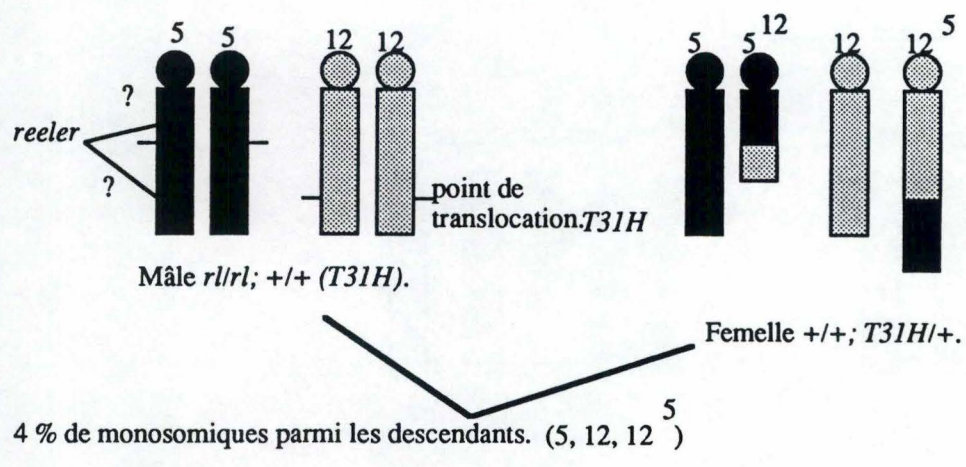
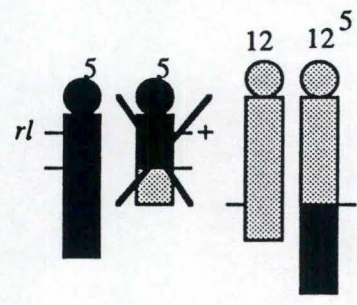


Figure 2 : Estimation de la distance génétique séparant *reeler* du point de translocation $T31H$.

Des mâles homozygotes *reeler* Orléans sont croisés avec des femelles hétérozygotes pour la translocation $T31H$. Les femelles F1 hétérozygotes pour la translocation sont sélectionnées par caryotype, et backcrossées à des mâles homozygotes *reeler* pour produire les animaux N2. Les animaux N2 sont typés pour le phénotype *reeler* par analyse du comportement et macrodissection du cerveau. La présence de la translocation $T31H$ est déterminée par caryotype.

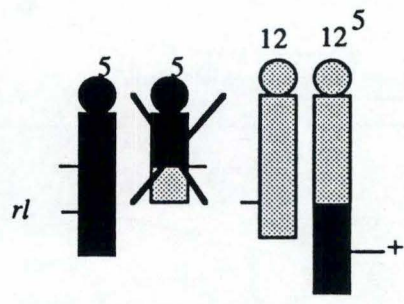


Si *reeler* est proximal.



Souris *reeler* *rl* : le phénotype *reeler* peut se manifester.

Si *reeler* est distal.



Souris *reeler* +/ : le phénotype *reeler* ne peut se manifester. Les souris monosomiques seront toujours normales.

Figure 3 : Localisation de *reeler* par rapport à *T31H*.

L'obtention de souris monosomiques *reeler* a permis de localiser ce locus en position proximale par rapport au point de translocation *T31H*.

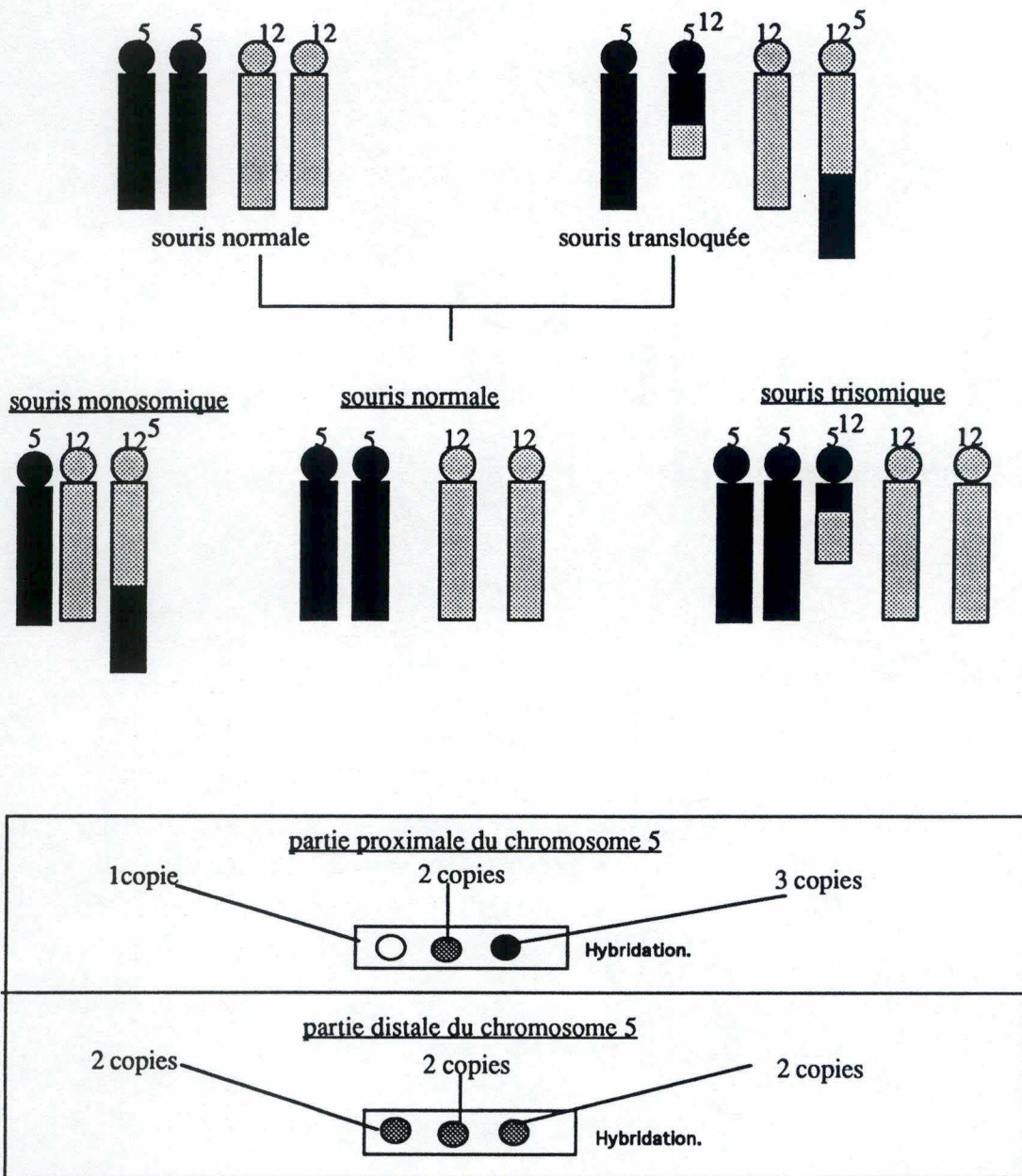


Figure 4 : Principe du dosage génique.

1. Localisation de *reeler* et de marqueurs adjacents par rapport à un point de translocation.

La translocation T(5;12)31H est une translocation réciproque affectant les chromosomes 5 et 12, et résultant en la formation d'un long chromosome 12⁵ et d'un petit chromosome 5¹² constitué de la partie centromérique du chromosome 5 et du segment télomérique du chromosome 12 (Beechey *et al.*, 1980). Les recombinaisons entre *reeler* et T31H ont été analysées comme illustré à la figure 2. Aucun recombinant n'a été obtenu sur 32 backcross, localisant *reeler* à 3 ± 3 cM du point de translocation (Dernoncourt *et al.*, 1991).

- *Reeler* est proximal par rapport à T31H :

La progéniture de femelles T31/+ comprend approximativement 4 % d'animaux monosomiques tertiaires et 10% d'animaux trisomiques tertiaires pour la partie proximale du chromosome 5. Les souris monosomiques, de constitution (5, 12, 12⁵), ont perdu le chromosome 5¹² et ne possèdent donc qu'un seul exemplaire de la partie du chromosome 5 proximale par rapport au point de translocation (figure 3). Etant donné le caractère récessif de *reeler*, l'obtention d'individus *reeler* monosomiques tertiaires à partir du croisement de femelles T(5,12)31H/+ avec des mâles rl/rl a permis de démontrer la localisation proximale du locus *reeler* par rapport au point de translocation (Dernoncourt *et al.*, 1991).

- Localisation de marqueurs par rapport au point de translocation : principe du dosage génique :

Les animaux monosomiques (5, 12, 12⁵) et trisomiques (5, 5, 12, 12, 12⁵) possèdent respectivement 1 et 3 copies de la partie proximale du chromosome 5, alors que les souris normales en ont 2, et que toutes possèdent 2 copies de la partie distale du chromosome 5. Après hybridation avec des quantités identiques de DNA de souris monosomiques, normales et trisomiques fixé sur membrane, une sonde marquée présentera un effet de dose 1-2-3 si elle est située en position proximale, et un effet de dose 2-2-2 si elle est localisée en position distale par rapport au point de translocation (figure 4).

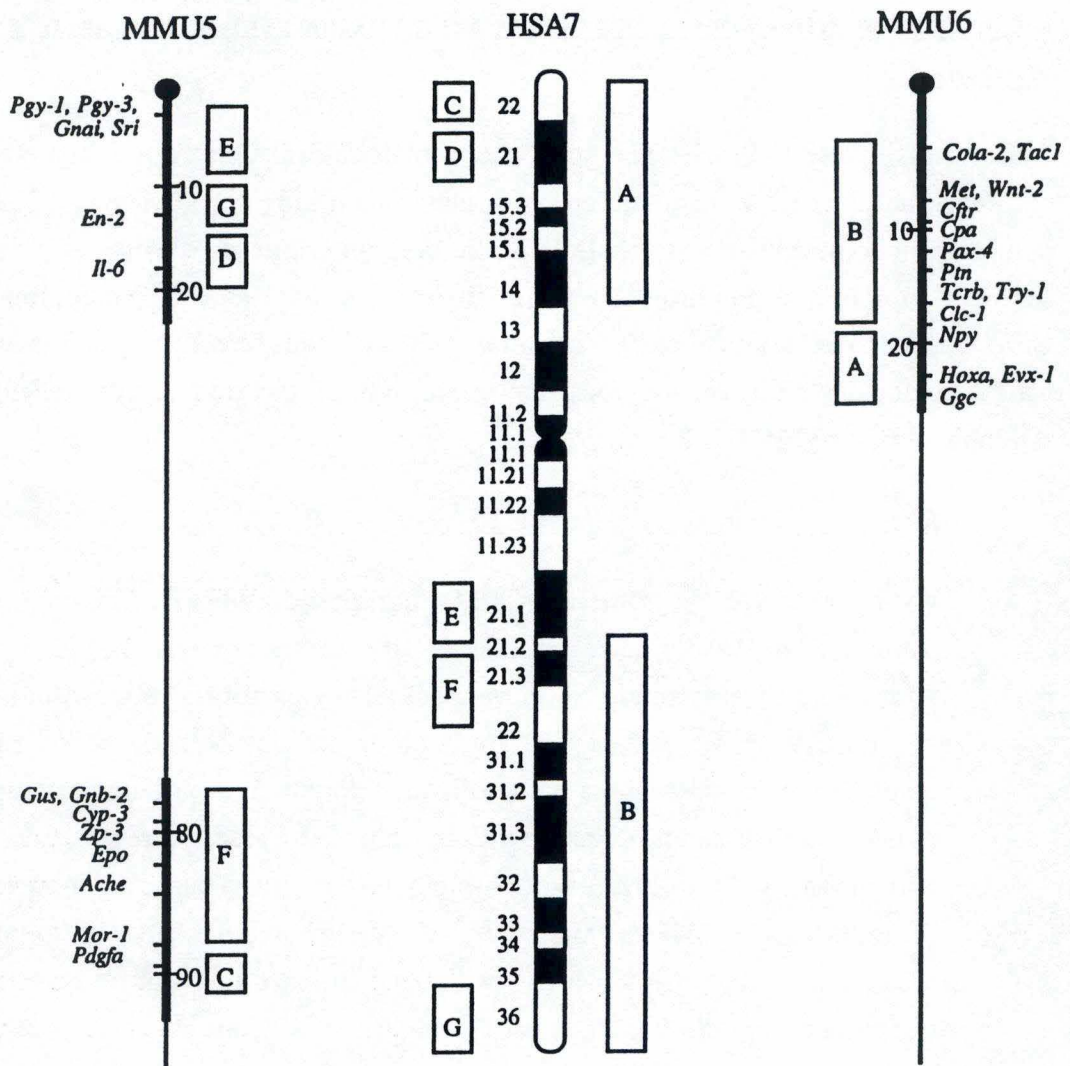


Figure 5 : Carte comparative des régions d'homologie entre le chromosome 5 de souris (MM5) et le chromosome 7 humain (HSA 7). Les régions d'homologie entre le chromosome 7 humain et le chromosome 6 de souris (MM6) sont également représentées.

2. Exploitation d'une lignée cellulaire hybride spécifique du chromosome 5 de souris.

La lignée cellulaire hybride BM3C3 contient le chromosome 5 de souris sur un background de hamster chinois. En employant des amorces spécifiques de séquences moyennement répétées de souris (famille L1), des fragments de DNA anonyme ont été amplifiés par PCR (technique d' IRS-PCR ; Simmler *et al.*, 1991). Après clonage de ces fragments et criblage par le test de dosage génique, 2 sondes proximales par rapport au point de translocation ont pu être isolées (3R2 et CD9). CD9 a pu être mappé à 4,2 cM en position distale par rapport à *reeler*, grâce au panneau backcross *C/spretus*.

Des données récentes démontrent que le chromosome 5 de souris de la lignée hybride contient une délétion au niveau de la région d'intérêt. En effet, certains marqueurs cartographiés dans la région chromosomique contenant *reeler* sont absents de la lignée cellulaire BM3C3 (voir points 3 et 5). L'existence de cette délétion limite l'exploitation de la lignée hybride pour valider l'origine d'une sonde dans la région d'intérêt.

3. Données provenant des travaux de cartographie chez l'homme.

La comparaison des cartes humaines et de souris révèle l'existence de 2 groupes de cosynténie entre le chromosome 5 de souris et le chromosome 7 humain (figure 5). Ces données indiquent que le gène homologue de *reeler* se trouve probablement sur le chromosome 7 humain. Plusieurs marqueurs des régions humaines homologues au 5 de souris ont pu être testées. Parmi ceux-ci, Hgf (hepatocyte growth factor) a pu être localisé à 3,5 cM de *reeler* en position proximale, et 5HT_{5A} (récepteur de la sérotonine) a pu être mappé à 3,5 cM en position distale de *reeler*.

Rem : Hgf n'est pas présent dans la lignée cellulaire hybride BM3C3.

4. Microdissection.

La région proximale du chromosome 5¹² est microdisséquée à partir d'un étalement métaphasique de fibroblastes de souris porteuses de la translocation réciproque T(5, 12)31H. Les fragments microdisséqués sont amplifiés par PCR à l'aide d'amorces dégénérées (DOP-PCR ; Telenius, 1992) et clonés. Les inserts sont ensuite criblés par l'essai de dosage génique et analysés en Southern sur du DNA génomique de souris B6, C et *spretus*. Un polymorphisme de restriction est recherché pour les clones sélectionnés, et une distance génétique avec *reeler* est estimée. L'insert T121 a été isolé de la sorte et ne montre aucune recombinaison avec *reeler* (T. Huyhen-Thu et C. Paternotte, communication personnelle).

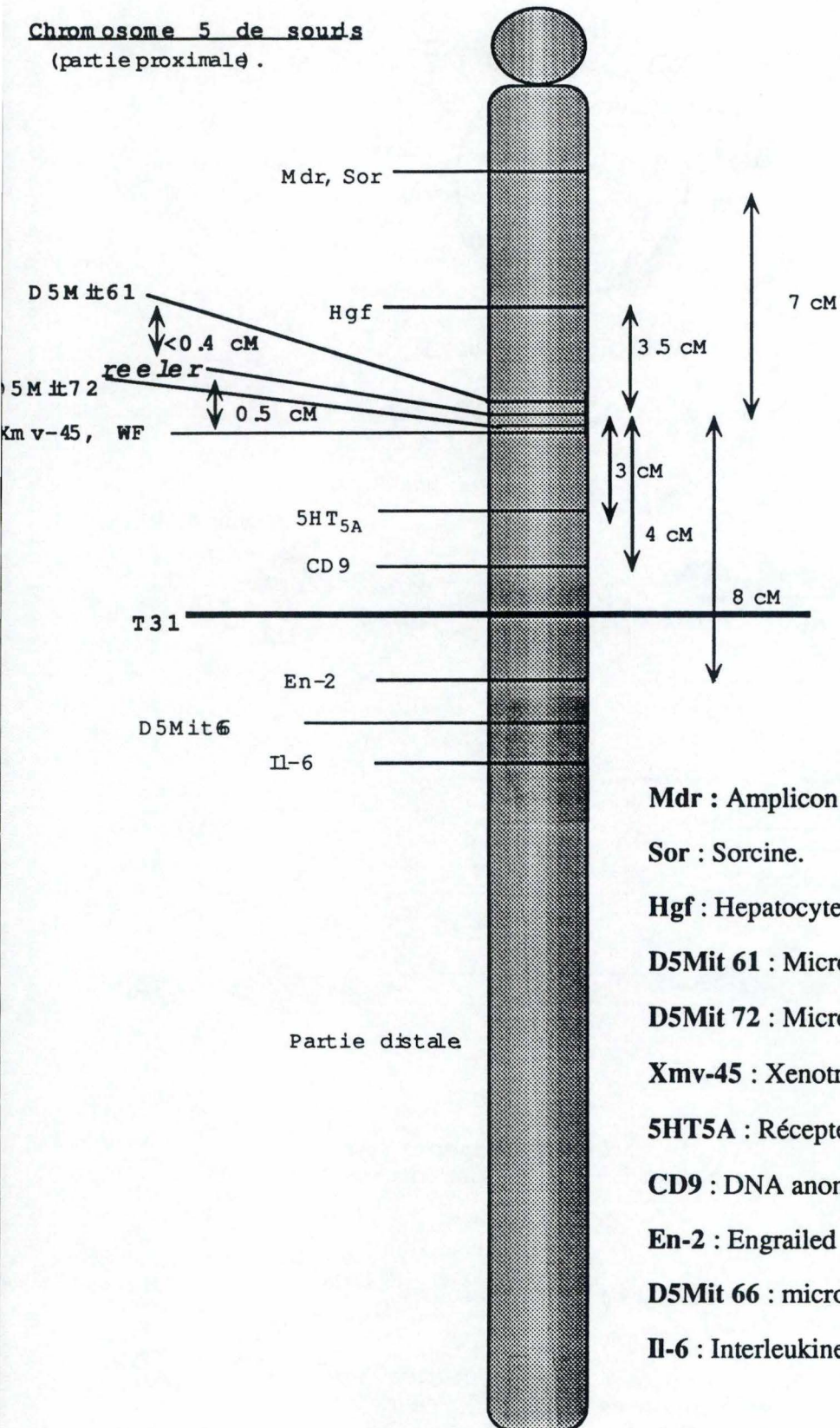
5. Données provenant de la littérature.

5.a. Le rapport sur le chromosome 5 publié en 1992 dans Mammalian Genome reprend 2 marqueurs situés dans la région de *reeler* : Cchl2a, sous-unité d'un canal de transport de Ca⁺⁺ (Chin, 1992) et Xmv-45, le site d'intégration d'un provirus xénotrope (Frankel *et al.*, 1989). Xmv-45 a pu être cartographié par rapport à *reeler* sur le panneau backcross B6/C parce que révélant un polymorphisme entre ces 2 souches : Xmv-45 est présent chez les souris B6 et absent chez les souris C. Les premiers résultats de mapping ont localisé Xmv-45 à $0,8 \pm 0,8$ cM, distalement par rapport à *reeler* (Beckers *et al.*, 1993). Ces résultats ont été confirmés par l'utilisation en tant que sonde d'un fragment de DNA anonyme (baptisé WF) flanquant le site d'intégration proviral et révélant un polymorphisme entre les souches C et B6 après digestion par *Msp* I. Des résultats ultérieurs impliquant le panneau backcross C/*spretus* et le panneau intercross ont affiné la distance entre *reeler* et WF à 0,53 cM (Beckers *et al.*, 1993). Cette distance est suffisamment petite que pour pouvoir envisager une marche sur le chromosome à partir de ce marqueur.

5.b. Les microsatellites sont des séquences simples répétées contenant de l'ordre de quelques dizaines d'unités di ou tri- nucléotidiques répétées en tandem. Les microsatellites sont très polymorphes de par la variabilité du nombre de répétitions (Love *et al.*, 1990). Ces différences de longueur peuvent être mises en évidence par PCR pourvu que l'on dispose d'amorces correspondant aux séquences uniques flanquant ces microsatellites. Actuellement, 1300 marqueurs microsatellites répartis sur l'ensemble des chromosomes balisent le génome de la souris. La carte génétique des microsatellites est continuellement mise à jour par le groupe de Lander (MIT). Plusieurs microsatellites ont été cartographiés dans la région d'intérêt, dont deux démontrent un polymorphisme intéressant pour cette étude :

- D5Mit61 : la distance séparant le microsatellite 61 de *reeler* a été analysée sur le panneau backcross C/*spretus* et sur le panneau intercross. Sur 245 méioses informatives, aucune recombinaison n'a été observée, localisant le locus 61 à moins de 0,4 cM de *reeler*. Tant qu'aucune recombinaison n'aura été obtenue entre 61 et *reeler*, il sera impossible de déterminer si ce locus est proximal ou distal par rapport à *reeler*. Nous reviendrons plus loin sur ce point capital.

Chromosome 5 de souris
(partie proximale).



Mdr : Amplicon de résistance multidrogues.

Sor : Sorcine.

Hgf : Hepatocyte growth factor.

D5Mit 61 : Microsatellite.

D5Mit 72 : Microsatellite.

Xmv-45 : Xenotropic murine leukemia virus - 45.

5HT5A : Récepteur à la sérotonine, de type 5A.

CD9 : DNA anonyme.

En-2 : Engrailed - 2.

D5Mit 66 : microsatellite.

Il-6 : Interleukine 6.

Figure 6 : Carte génétique de la région chromosomique contenant *reeler* (novembre 1993).

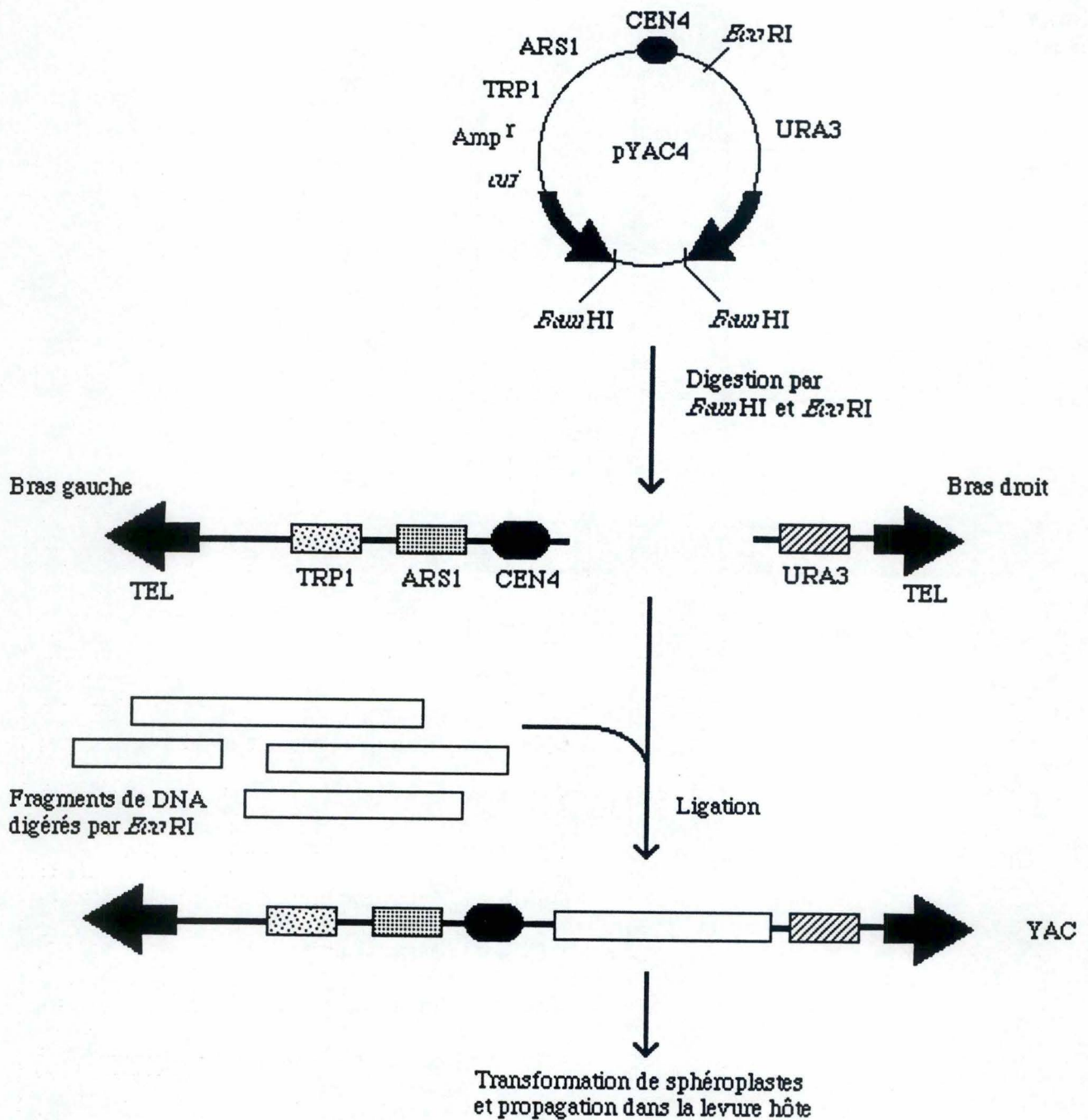


Figure 7 : Clonage de fragments de DNA dans les chromosomes artificiels de levure (YACs).

Le vecteur utilisé est pYAC 4. Il contient les séquences nécessaires à sa répllication et sa stabilité sous forme linéaire dans les cellules de levure. Ces séquences sont : le centromère (CEN), les deux télomères (TEL), une origine de répllication autonome (ARS) et deux gènes pour la sélection des cellules de levure transformées (URA3 et TRP1). Pour la croissance dans les cellules bactériennes, le vecteur possède une origine de répllication bactérienne (*ori*) et un gène de résistance à l'ampicilline(Amp^r).

Le vecteur est digéré par *Bam*HI et *Eco*RI pour produire deux bras cohésifs. Le DNA de haut poids moléculaire à cloner (partiellement digéré par *Eco*RI) est ligué aux bras du vecteur pour former le YAC. Des sphéroplastes sont ensuite transformés.

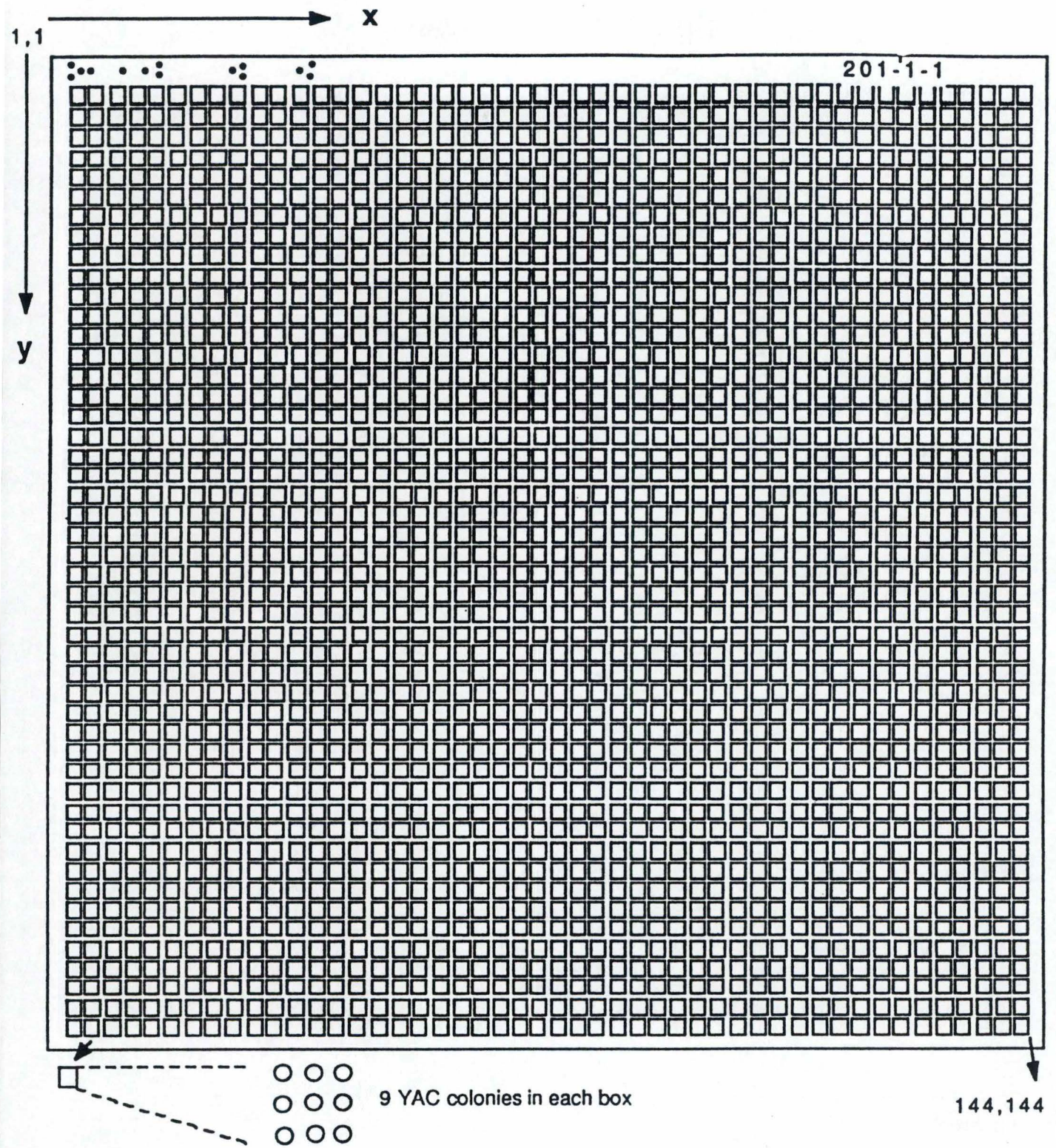
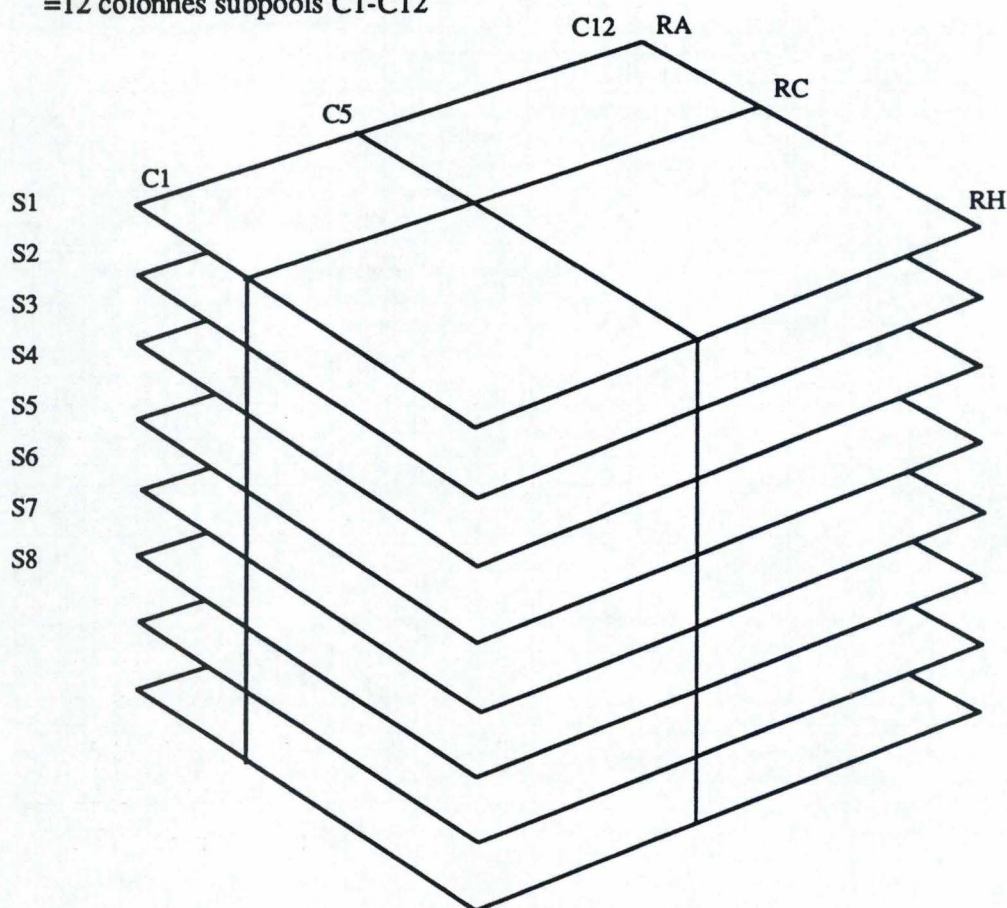


Figure 8 : La banque de YACs de l'Imperial Cancer Research Fund. est constituée de 20 000 clones, avec des inserts d'une taille moyenne de 700 kb (soit 4 l'équivalent de 4 fois la taille du génome de souris.). La banque est transférée sur des filtres de Nylon à haute densité, chaque filtre contenant 144 x 144 clones (soit l'ensemble de la banque), comme représenté ci-dessus. Ceci permet de réaliser le criblage de la banque, par hybridation sur colonies, en une seule expérience.

1 SuperPool = 8 boîtes multi-puits = 768 clones
 = 8 boîtes subpools S1-S8
 = 8 rangées subpools RA-RH
 = 12 colonnes subpools C1-C12



Identification des clones :

premier criblage: identification du superpool(SP1-SP25) = 25 PCR
deuxième criblage: 3 coordonnées: S1-S8 = 8 PCR
 RA-RH = 8 PCR | = 28 PCR
 C1-C12 = 12 PCR

Figure 9 : La banque de Princeton est composée de 120 000 clones, avec des inserts d'une taille moyenne de 650 kb. La banque a été organisée pour le criblage par PCR en pools et superpools de boîtes, rangées et colonnes, comme présenté ci-dessus.

- D5Mit72 : aucune recombinaison n'a été observée entre *reeler* et ce marqueur sur l'ensemble des panneaux interspécifiques *C/spretus* backcross et intercross. Cependant, des données qui seront discutées dans la rubrique "Résultats et discussion" permettent de localiser le microsatellite 72 distalement par rapport à *reeler* .

Rem : D5 Mit 61, contrairement à D5 Mit 72, est absent de la lignée BM3C3.

6. Bilan.

L'établissement d'une carte génétique fine de la région contenant *reeler* (figure 6) a permis de caractériser 3 marqueurs situés à une distance proche de *reeler* (inférieure à 1 cM). Ces marqueurs servent de point de départ à l'agencement par marche sur le chromosome d'un ensemble de clones chevauchants correspondant à la région génomique d'intérêt (Bar *et al*, 1993).

Il est évident que le fait de pouvoir disposer de 2 marqueurs situés de part et d'autre de *reeler* faciliterait la construction du contig. C'est pourquoi la recherche d'un marqueur proche et proximal par rapport à *reeler* se poursuit activement au laboratoire. Un tel marqueur proximal devrait être trouvé en surveillant les événements de recombinaison entre *reeler* et des marqueurs issus du contig lors de l'agencement ou de la caractérisation de celui-ci.

V. 2. La marche vers *reeler*.

La construction d'un contig est un processus itératif dans lequel les extrémités d'un clone sont isolées et utilisées pour isoler le clone suivant. Le nombre d'étapes pour couvrir une région donnée est donc fonction de la taille des inserts clonables dans le vecteur utilisé. De par la taille importante (plusieurs centaines de kb) des fragments clonables dans les chromosomes artificiels de levure (YACs ; Burke, 1987) (figure 7), ceux-ci sont des vecteurs de choix pour la construction du contig en un minimum d'étapes. La construction du contig a débuté par l'isolement des YACs contenant les marqueurs proches de *reeler*, à savoir WF, D5Mit 61 et D5Mit 72. Pour ce faire, les banques YACs de l'Imperial Cancer Research Fund (Larin, 1991) sont criblées par hybridation (figure 8) et celles de Princeton (Tilghman, 1992) par PCR (figure 9).

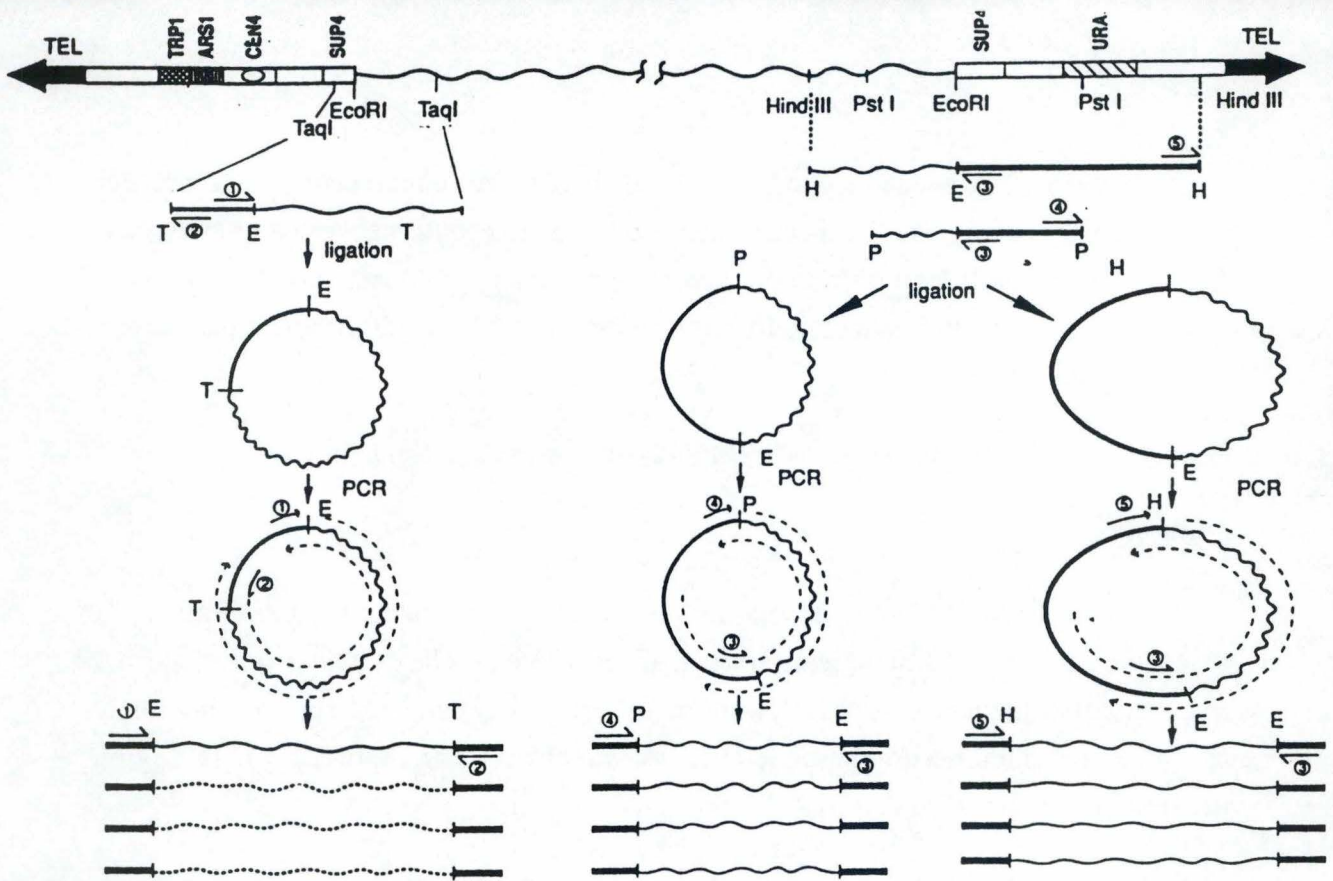


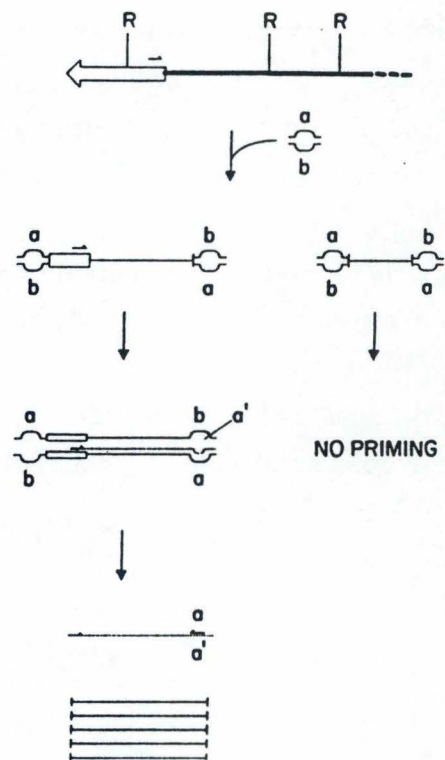
Figure 10 :

a. La PCR- inverse .

Le DNA total de levure, contenant le YAC, est digéré par un enzyme dont le site est présent dans le vecteur pYAC4, utilisé pour construire les banques de YACs. (le vecteur est schématisé par un rectangle fléché, contenant un centromère, un télomère,... . L'insert est schématisé par un trait ondulé). Le DNA est ensuite ligué pour former des molécules circulaires. Certaines de ces molécules circulaires contiennent un fragment du vecteur, et l'extrémité de l'insert . En utilisant des primers spécifiques du vecteur (numérotés de 1 à 5 sur le schéma), on peut ensuite amplifier par PCR l'extrémité du YAC

b. La vectorette .

Le DNA total de levure est digéré par un enzyme de restriction dont le site R est présent dans le vecteur pYAC4 (représenté par un rectangle fléché). Le DNA digéré est ensuite ligué à une cassette oligonucléotidique (représentée par une bulle) appelée vectorette ou bulle . La vectorette est formée de deux oligonucléotides complémentaires à chaque extrémité, mais non-complémentaires entre-eux au centre (régions a et b). Après la ligation, tous les fragments digérés, dont certains correspondent aux extrémités du YAC, possèdent à leurs deux extrémités les vectorettes. On réalise ensuite une première PCR en utilisant un primer spécifique du vecteur. Ceci permet la synthèse d'un fragment possédant une séquence a', complémentaire de la région a. Les PCRs suivantes sont réalisées en utilisant un primer du vecteur, et un primer contenant la séquence a. Tous les fragments ne possédant pas l'extrémité du YAC ne peuvent être amplifiés, puisqu'ils ne contiennent pas la séquence a'. Par cet artifice, seuls sont amplifiés les fragments contenant une portion du vecteur pYAC4, c'est à dire les fragments correspondants à l'extrémité du YAC.



La condition du criblage par PCR est de disposer d'amorces qui amplifient un fragment spécifique du marqueur. Les microsatellites répondent à ce critère. Pour d'autres marqueurs, tels que WF, des amorces sont recherchées dans la séquence, synthétisées et validées, définissant ainsi un "sequence tagged site" ou STS (Olson, 1990). Le criblage de la banque de l'ICRF par hybridation sur colonies de la sonde WF a résulté en l'identification d'un seul clone positif. Le criblage de la banque de Princeton par PCR a permis d'identifier 4 clones positifs pour WF, 4 clones positifs pour le microsatellite 61 et 3 autres YACs pour D5Mit72.

Caractérisation des YACs et agencement du contig :

La construction du contig repose principalement sur l'isolement des extrémités des inserts clonés en YACs. Pour ce faire, les techniques les plus utilisées sont l'Alu-vecteur PCR (Nelson *et al.*, 1991), la Vectorette PCR (Riley *et al.*, 1990) et l'inverse PCR (Arveiler *et al.*, 1991). La Vectorette et l'inverse PCR sont appliquées au laboratoire avec un certain succès. Leur principe est expliqué à la figure 10.

Les extrémités isolées de la sorte peuvent être utilisées à plusieurs fins :

- 1) Pour déterminer si le YAC est chimérique, c'est-à-dire si un événement de recombinaison a rassemblé dans un seul clone 2 fragments d'origine chromosomique différente. A cette fin, chaque extrémité est testée pour sa présence dans l'hétérocaryon BM3C3 et pour un effet de dosage génique (les loci WF, 61 et 72 étant proximaux par rapport à T31H, toutes les extrémités testées doivent présenter un effet de dose positif).
- 2) Si ces extrémités présentent un polymorphisme, elles peuvent servir de marqueur pour calculer une distance génétique avec *reeler*.
- 3) Ces extrémités peuvent servir de sondes pour établir une carte physique de la région, au niveau génomique.
- 4) Comme nous l'avons déjà mentionné, ces extrémités fournissent le principal* moyen pour ordonner les YACs entre eux en hybridant chaque extrémité à l'ensemble des YACs, de manière à détecter les YACs possédant des régions communes (*une alternative pour la détection de régions "overlap" est le fingerprinting (voir par exemple Wada *et al.*, 1990)).

Les données obtenues à partir des extrémités isolées ont permis de connecter entre eux les YACs WF et 61. L'état actuel de la construction du contig par combinaison de ces différentes méthodes est résumé à la figure 11.

Extrémité centromérique
du chromosome 5 de souris.

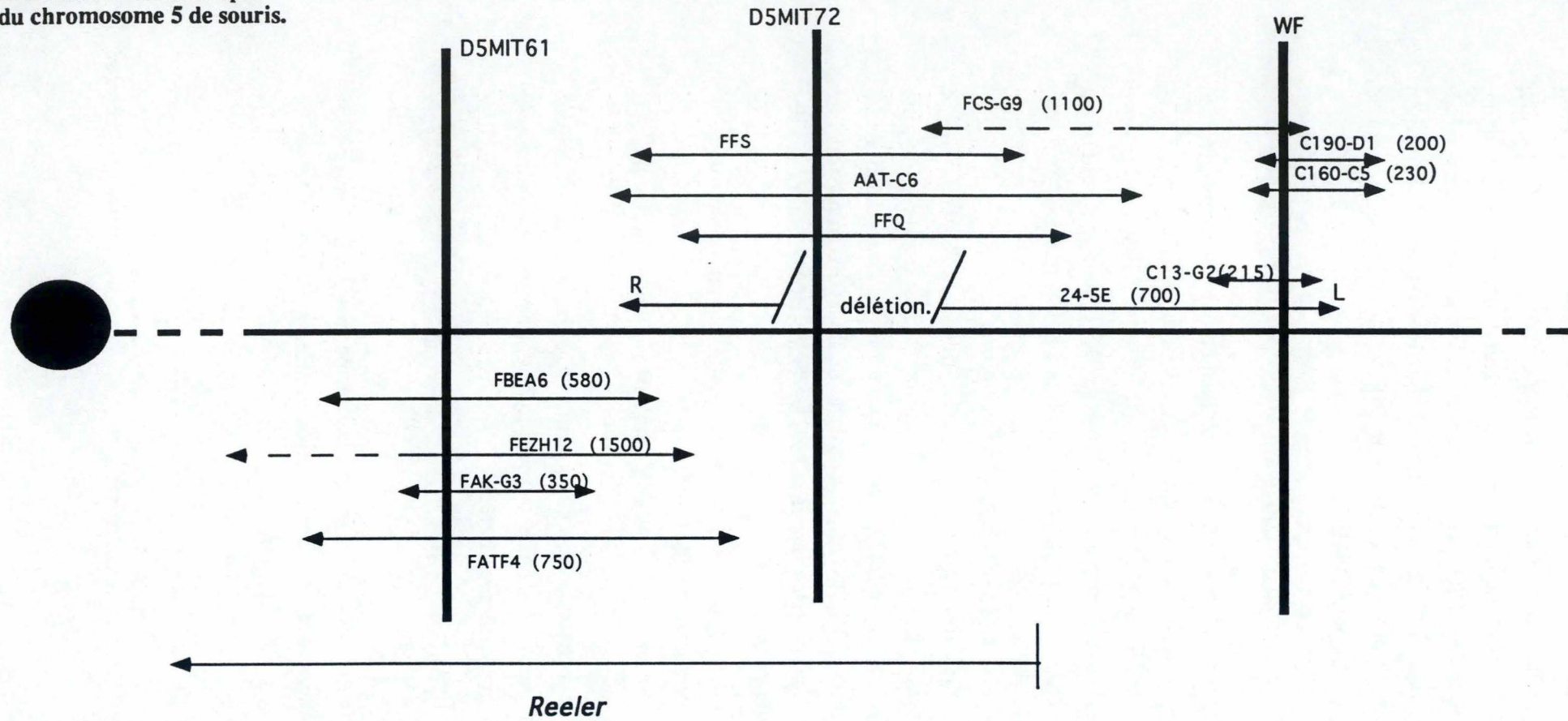


Figure 11 : Organisation des YACs WF, D5Mit61 et D5Mit72 sous forme d'un contig. Les données concernant les YACs D5Mit 72 sont encore à confirmer. R et L définissent respectivement les extrémités droites et gauches des YACs. Les YACs chimériques sont dessinés en traits discontinus.

V. 3. Bilan de la cartographie fine et de la construction du contig.

Nous avons déjà indiqué que l'absence de recombinaison entre *reeler* et 61 ne permettait pas de déterminer la localisation (proximale ou distale) du microsatellite par rapport à *reeler*. La mise en évidence d'un événement de recombinaison entre ces 2 loci nécessite l'analyse d'un nombre suffisant de méioses (impliquant l'élevage d'un nombre suffisant d'animaux !), l'isolement des extrémités des YACs 61 et la recherche d'un polymorphisme de restriction entre les souris utilisées pour la construction des panneaux backcross et intercross. Alternativement, les sondes non utilisables en Southern peuvent être séquencées et des STS définis. Un polymorphisme de séquence est ensuite recherché par la technique de gel SSCP (= single strand conformation polymorphism ; Orita *et al.*, 1989).

- Si *reeler* s'avère être situé entre 61 et WF, soit en position distale par rapport à 61, alors on peut considérer que le contig est complet et que *reeler* est cloné dans un ou plusieurs YAC(s) 61.
- Si par contre *reeler* s'avère être en position proximale par rapport à 61, il faudra alors effectuer un pas supplémentaire de marche sur le chromosome vers l'extrémité centromérique du chromosome 5. Pour ce faire, l'extrémité la plus centromérique d'un des YACs 61 sera utilisée pour cribler les banques de l'ICRF et de Princeton afin de sortir les YACs correspondants. Cependant, si l'on combine les données relatives aux fréquences de recombinaison entre *reeler* et WF sur le panneau backcross B6/C aux données de fréquence de recombinaison entre *reeler* et 61 sur le panneau backcross C/*spretus* et sur le panneau intercross, on peut estimer la fréquence de recombinaison entre *reeler* et 61 comme étant inférieure ou égale à 0,25 cM, ce qui correspond à une distance physique qui ne devrait pas dépasser 500 kb. Il est donc très probable que le locus *reeler* sera dépassé lors du prochain saut vers le centromère.

La suite logique des travaux visant à cloner *reeler* est d'orienter les investigations vers un niveau de résolution supplémentaire, à savoir la localisation d'événements de recombinaison sur le contig, la construction d'une carte physique, et la recherche des séquences codantes du contig. Suivant cette stratégie, nous entreprenons dans ce mémoire l'évaluation d'une technique d'hybridation permettant d'isoler et de caractériser des séquences présumées codantes à partir des clones de YACs provenant de la région *reeler*.

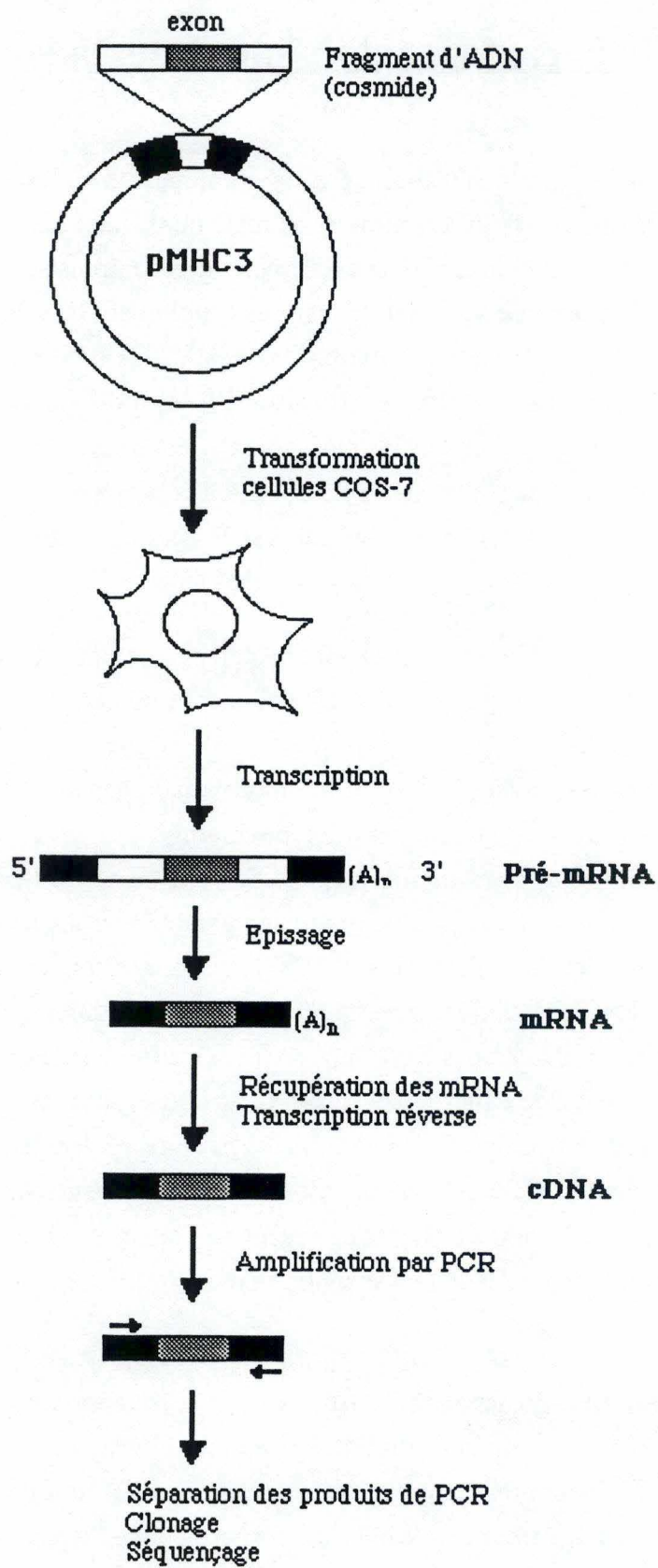


Figure 12 : Principe de l'exon trapping.

V. 4. Isolement de séquences codantes.

L'identification de gènes constitue actuellement l'étape limitante de la stratégie de clonage positionnel (Elvin *et al.*, 1992). A ce jour, aucune technique ne peut prétendre rencontrer cet objectif de façon satisfaisante, aussi la caractérisation des séquences codantes dans des fragments clonés repose sur la combinaison de différentes approches brièvement décrites ci-dessous.

1. Recherche d'îlots CpG hypométhylés.

Les îlots CpG sont caractérisés par une densité élevée de dinucléotides CpG non méthylés, identifiables par leur sensibilité à certaines enzymes de restriction "rare cutters" qui contiennent un ou plusieurs résidus CpG dans leur séquence de reconnaissance (Bird, 1987). La plupart des gènes ubiquitistes transcrits par la RNA polymérase II, de même que certains gènes montrant une expression spécifique de tissu sont associés à des îlots CpG. Les îlots peuvent s'étendre jusqu'à quelques kb et sont souvent associés aux extrémités 5' des gènes, bien que certains aient été trouvés associés aux extrémités 3' et à l'intérieur même des séquences transcrites (Gardinner-Garden et Frammer, 1987).

2. Exon trapping.

La méthode d'exon trapping (Buckler *et al.*, 1991 ; Hamaguchi *et al.*, 1992) est basée sur la réaction d'excision-épissage (figure 12). Des fragments de DNA génomique (YACs, cosmides,...) sont insérés dans un plasmide dérivé d'un vecteur d'expression, au niveau d'un intron possédant les jonctions d'épissage droite et gauche d'un gène choisi, placé sous le contrôle d'un promoteur fort. Des cellules de mammifère sont transfectées avec les plasmides qui sont transcrits et épissés. Si un fragment génomique contient un exon entier dans la bonne orientation, ce dernier est retrouvé dans la population des messagers cellulaires sous la forme d'un mRNA hybride composé des exons présents dans le vecteur et de l'exon provenant du fragment génomique. Les messagers hybrides sont détectés en pratiquant une réaction de rétrotranscription du mRNA en cDNA simple brin suivie d'une amplification par PCR au moyen d'amorces spécifiques des exons du vecteur (technique dite de "RT-PCR"). Les produits PCR sont ensuite clonés, séquencés et caractérisés.

3. Approches basées sur une hybridation.

Les approches suivantes sont toutes basées sur une réaction d'hybridation. La présence d'événements d'hybridation non spécifiques constitue leur principale limitation. Un paragraphe abordant cette question dans le cadre des hybridations YACs/cDNAs est présenté en fin de chapitre.

3.a. Cross-hybridation de sondes génomiques entre espèces, ou zooblots.

L'association d'une séquence unique à un gène peut être inférée par hybridation de cette séquence à des Southern blots de DNA provenant de différentes espèces (Monaco *et al.*, 1986). Dans cette optique, une séquence conservée au cours de l'évolution possède une capacité fonctionnelle, et correspond probablement à une séquence transcrite.

3.b. Criblage conventionnel d'une banque cDNA par sonde dérivée d'un YAC marqué.

L'utilisation de DNA de YAC purifié, marqué et bloqué au niveau des séquences répétées pour cribler directement par hybridation une banque cDNA étalée sur plaques est un processus peu reproductible dont le succès est occasionnel (Lovett *et al.*, 1991). La complexité élevée des séquences de YAC est la cause principale du faible rapport signal/bruit de fond observé. L'identification de séquences codantes devient en fait extrêmement difficile à l'aide des méthodologies classiques de criblage lorsque la région d'intérêt excède 30 kb. Les mêmes arguments condamnent l'approche consistant à révéler directement des Northern blots avec des YACs entiers marqués et soulignent que le sous-clonage du YAC en cosmides est une condition nécessaire pour l'utilisation efficace des procédures classiques de criblage.

3.c. Méthode de "sélection directe".

La méthode de sélection directe (Lovett *et al.*, 1991 ; Vetrie *et al.*, 1993) consiste à immobiliser le DNA purifié d'un clone génomique (YAC, cosmide, ...) sur un petit morceau de filtre, et à l'hybrider avec une banque cDNA entière, amplifiée par PCR. Les cDNAs spécifiquement hybridés sont élués après lavage et réamplifiés par PCR. Ils peuvent ensuite être injectés dans un cycle de sélection supplémentaire, ou être clonés en vue de leur caractérisation. Deux banques cDNAs ont été construites au laboratoire et ont été utilisées comme matériel de départ dans les expériences de sélection. La première est spécifique du cerveau d'embryon de souris E14 (Beckers 1992, comm. pers.). Nous avons construit la seconde à partir d'embryons totaux E14.

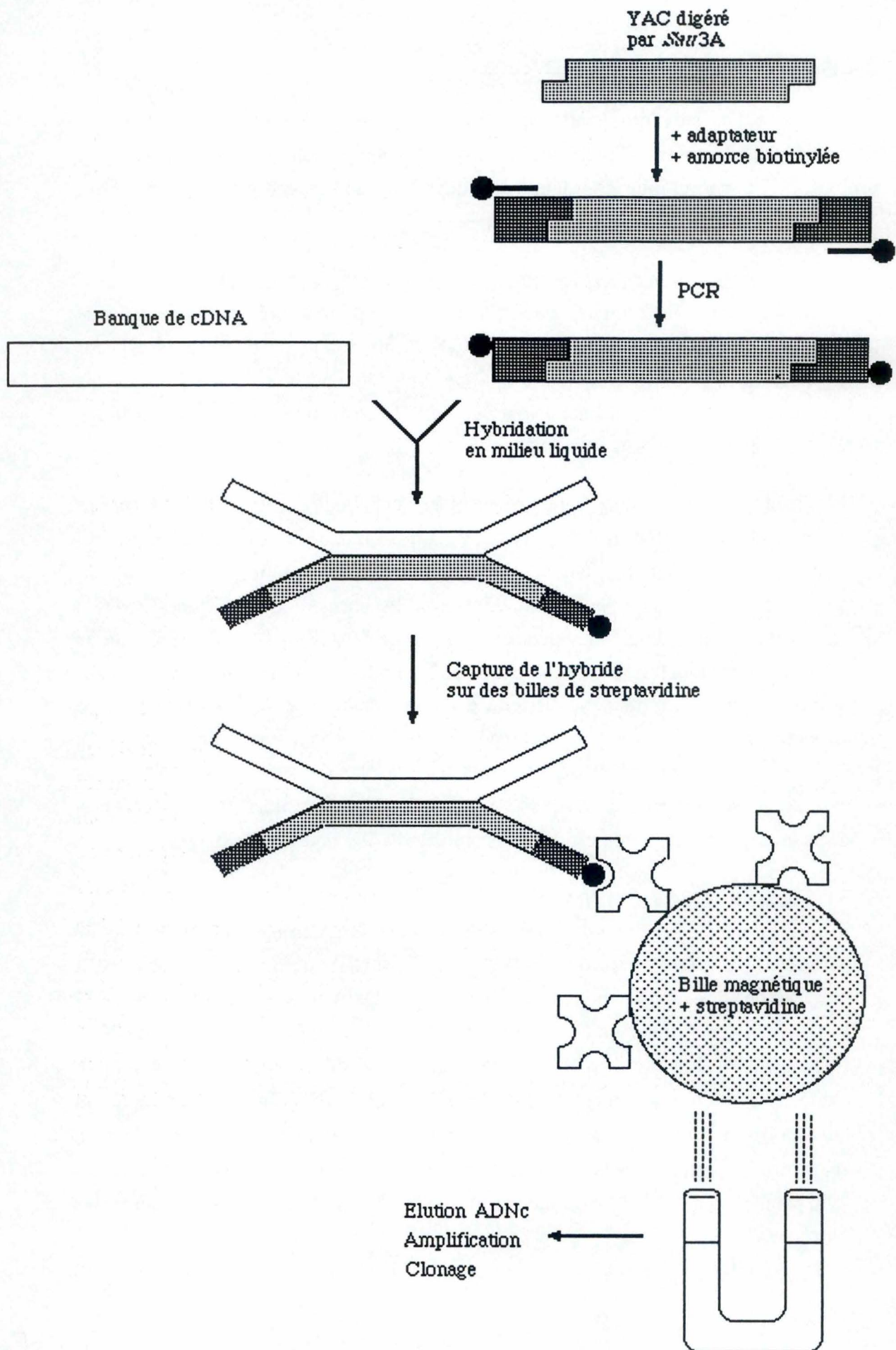


Figure 13 : Isolement de séquences codantes par capture magnétique :

3.d. Hybridation en solution d'une banque de cDNA à du DNA génomique de YAC biotinylé.

Les cinétiques d'hybridation sur filtre sont difficiles à prédire par rapport aux cinétiques d'hybridation en solution (Young, 1985). C'est pourquoi un système de capture biotine/streptavidine et une hybridation en solution ont été proposés afin de mieux contrôler les paramètres de l'hybridation (Tagle, 1993). Le DNA génomique cloné peut être marqué à la biotine selon des méthodes conventionnelles (nick translation, terminal nucleotidyl transferase, ...), ou plus simplement par amplification par PCR à l'aide d'une amorce biotinylée en 5'. Le fait de pouvoir disposer de DNA génomique biotinylé exclusivement en 5' évite d'éventuels problèmes stériques avec la Taq polymérase durant la PCR, ou avec les inserts cDNA lors de l'hybridation. De plus, la stabilité du complexe biotine/streptavidine permet d'effectuer des manipulations telles que l'éluion des cDNAs hybridés, les changements de tampon et de solution de lavage, etc ... facilement et avec un minimum de pertes de matériel.

Schéma général (figure 13) :

Du DNA génomique de YAC purifié à partir d'un gel pulsé est digéré par une enzyme "4 bases cutter" et ligué à des adaptateurs. Les segments génomiques ligués sont amplifiés par PCR à l'aide d'une amorce biotinylée en 5' dont la séquence est complémentaire à l'un des brins de l'adaptateur. Les inserts de la banque cDNA sont amplifiés par PCR à l'aide d'amorces vecteurs et hybridés à haute stringence aux fragments génomiques biotinylés, après blocage des séquences répétées. Les complexes biotinylés cDNA-YAC sont capturés à l'aide de billes paramagnétiques couvertes de streptavidine, et les cDNAs non spécifiquement liés sont lavés. Les cDNAs retenus sont ensuite élués et amplifiés par PCR. Les produits de PCR peuvent être clonés afin de constituer une sous-banque spécifique d'une région, ou être recyclés dans un nouveau tour de sélection. Un enrichissement de 2 à 3 ordres de grandeur par étape de sélection est mentionné dans la littérature (Lehrach *et al.*, 1993).

A propos des séquences répétées :

1- Au niveau cDNA : Approximativement 3 à 10% de cDNAs contiennent des éléments répétitifs (Knapp *et al.*, 1981) et doivent être bloqués avant l'étape d'hybridation sous peine de rencontrer des problèmes de bruit de fond insurmontables. Les cDNAs sont généralement bloqués avec du DNA génomique total avant d'être hybridés au DNA génomique. Les éléments répétitifs des cDNAs peuvent également être bloqués avec du DNA Cot-1 (Gibco BRL) hautement enrichi en séquences répétées. Le DNA Cot-1 présente l'avantage de ne pas augmenter la complexité globale des séquences présentes dans le mélange d'hybridation.

La caractérisation à grande échelle de cDNAs sélectionnés a de plus révélé (Weissman *et al.*, 1991) que jusqu'à 70% des clones pouvaient être d'origine ribosomale. Ces clones peuvent être sélectionnés par les faibles quantités de DNA ribosomal de levure copurifié avec le DNA de YAC, après la séparation en PFGE. Les YACs comigrent en effet souvent avec du DNA de levure contenant les séquences ribosomales qui sont à l'origine de la cross-hybridation entre séquences ribosomales conservées entre la souris et la levure. L'élimination d'une grande partie de ces clones contaminants est possible en incluant du DNA ribosomal dans l'étape de bloquage, ou en effectuant un contre criblage après la sélection avec une sonde ribosomale.

2- Au niveau YAC : Le DNA génomique de YAC est qualitativement bloqué de la même façon qu'il soit immobilisé sur un filtre ou en solution. Le mélange de bloquage comprend, outre le DNA génomique total et le DNA ribosomal, du DNA génomique de levure soniqué destiné à bloquer le DNA dégradé de levure qui est copurifié avec le YAC, et du DNA du vecteur pYAC4 ou pBR322 (dont pYAC4 est dérivé) afin de bloquer les séquences de YAC issues du vecteur de clonage d'origine.

V. 5. Caractérisation des séquences isolées.

Les clones cDNAs sélectionnés dans un premier temps doivent être caractérisés quant à leur localisation génomique dans la région d'intérêt. Pour ce faire, les cDNAs sont marqués et hybridés à des filtres contenant les YACs d'origine ainsi que des DNAs contrôles. Seuls les cDNAs donnant un signal positif avec le(s) YAC(s) d'origine et un signal négatif avec les DNAs contrôles seront caractérisés de façon plus approfondie, notamment par séquençage et confirmation de leur localisation par des arguments autres que l'hybridation.

La séquence des cDNAs sélectionnés est introduite dans des banques de données afin de déterminer si elle correspond ou ressemble à des séquences déjà décrites. La connaissance de la séquence permet de plus la définition de STS (Sequence Tagged Site ; Olson, 1990) qui rendent possible la localisation par PCR des cDNAs sur le contig de YACs ainsi que la recherche d'un polymorphisme de séquence par la technique de SSCP.

Les cDNAs retenus sont également testés en tant que sondes, en vue de définir un polymorphisme de restriction entre les espèces utilisées pour la construction des panneaux backcross et intercross, permettant ainsi d'établir la localisation génétique précise de la sonde. Enfin, les cDNAs peuvent être localisés physiquement sur le contig si une carte de restriction est disponible.

Bien qu'il soit illusoire d'espérer isoler rapidement un fragment issu du gène *reeler* alors que les techniques d'isolement et caractérisation de séquences codantes ne sont pas encore parfaitement maîtrisées au laboratoire, il est intéressant de terminer cette introduction en énonçant quelques critères disponibles pour déterminer si un clone isolé pourrait provenir du gène *reeler* :

- 1) Les candidats ne doivent montrer aucune recombinaison avec *reeler*.
- 2) Les candidats doivent correspondre à des messagers exprimés dans le cerveau embryonnaire à E14. Le critère d'expression le plus sensible est la réaction de RT-PCR, qui pourrait être réalisée avec les amorces synthétisées pour définir un STS.
- 3) Hybridation *in situ* du candidat sur des coupes histologiques d'embryons et visualisation de l'expression au niveau des neurones post-migratoires.
- 4) Cross-hybridation avec du DNA génomique d'autres mammifères (= zooblots avec les différents ordres de vertébrés afin de tester l'hypothèse du rôle évolutif de *reeler*).

5) Détection d'anomalies au niveau du DNA candidat chez les animaux *reeler*.

Rappelons que nous disposons de 2 allèles (Ed et Orl) pour la mutation. Si ces anomalies correspondent à des réarrangements importants, elles pourraient déjà être détectables au niveau de l'analyse en Southern.

Enfin, une fois qu'un sérieux gène candidat aura été trouvé, la façon la plus incontestable de démontrer que celui-ci correspond bien à *reeler* est de produire, par recombinaison homologue, une souris transgénique "knock-out" présentant le phénotype *reeler*. Une démonstration presque aussi valable est fournie par la complémentation de *reeler* par un transgène comprenant la région génomique normale correspondante, insérée à un autre endroit du génome.

VI. BUT DU TRAVAIL.

Notre travail s'inscrit dans le cadre du projet de clonage positionnel du gène *reeler*. L'établissement d'une carte génétique fine (Dernoncourt et al., 1991 ; Beckers et al., 1993) a permis la reconstitution de la région génomique d'intérêt sous la forme d'un agencement contigu de chromosomes artificiels de levure.

Nous évaluerons, dans le cadre de ce mémoire, la possibilité d'isoler des séquences codantes à partir de ces clones YACs. L'approche que nous suivrons repose sur l'hybridation différentielle d'une population de cDNAs au DNA génomique cloné en YACs, et devrait permettre d'atteindre un triple objectif :

- 1) Jeter les premières bases d'une "carte transcriptionnelle". La résolution croissante de cette carte devrait, à plus long terme, permettre l'identification de segments de DNA clonés issus du gène *reeler*.
- 2) Notre étude contribuera à la caractérisation des clones YACs, et permettra de confirmer l'agencement du contig.
- 3) Nous isolerons des nouveaux marqueurs qui contribueront à la saturation de la région d'intérêt. La localisation d'événements de recombinaison sur le contig pourrait, entre autre, permettre l'identification du marqueur proche proximal nécessaire pour cloturer le contig.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. TECHNIQUES RELATIVES À LA MANIPULATION DE BACTÉRIES, PLASMIDES ET PHAGES.

I. 1. Milieu liquide LB et milieux solides contenant de l'agar ou de l'agarose.

Voir Current Protocols in Molecular Biology 1.1.2, 1.1.3, 1.1.4 (Ausubel *et al.*, 1993).

I. 2. Solutions d'antibiotiques et solutions pour culture de bactériophages 1.

Voir Current Protocols in Molecular Biology 1.1.2, 1.1.3, 1.1.4 (Ausubel *et al.*, 1993).

I. 3. Souche bactérienne.

La souche bactérienne utilisée est XL1 blue d'*E.Coli*. Cette souche est rec A1, end A1, gyr A96, thi, hsd R17, rk⁻, mk⁺, sup E44, rel A1, l⁻, lac⁻.

La souche possède l'épisome F' qui est pro AB, lac I^qZ DM15, 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 lac Z), permettant la sélection blanc-bleu (voir I. 5.).

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 (ZDM15) délétée sur le chromosome bactérien (l'extrémité COOH de la β -galactosidase, promoteur et opérateur). L'autre partie devra être fournie par du DNA exogène.

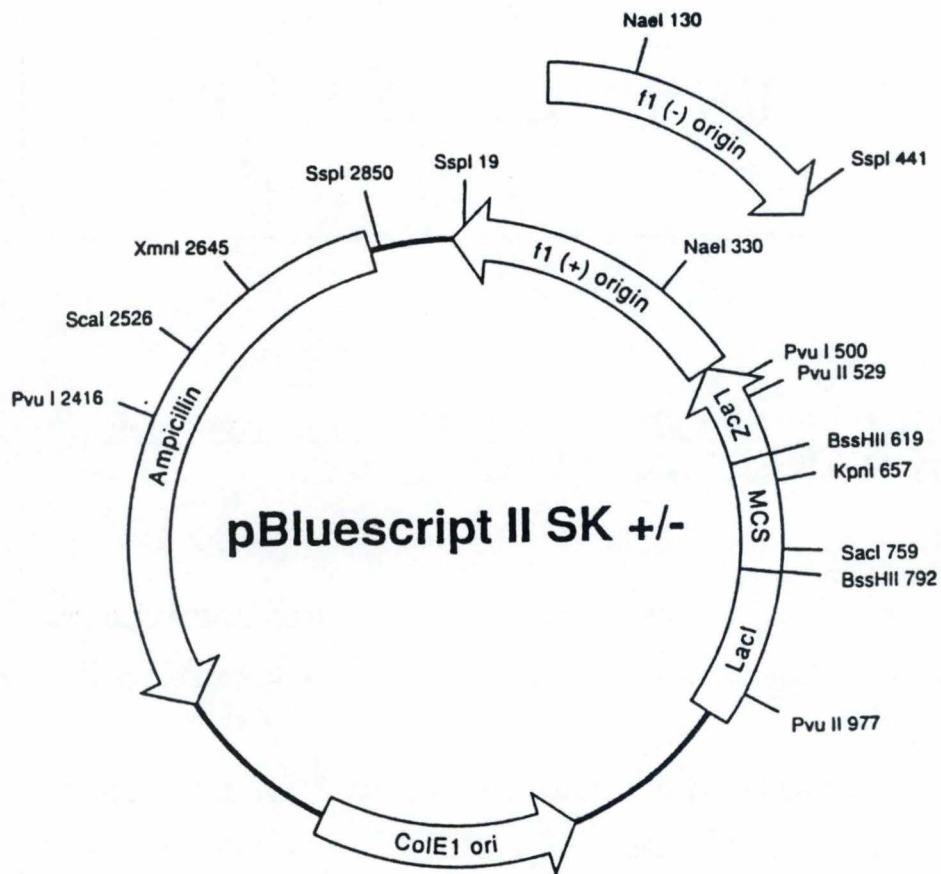


Figure 14 : Plasmide pBluescript II.

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

NB : La souche DH5 a de *E. Coli* se prête également au test blanc-bleu, et est utilisée dans nos expériences. Elle nous a été aimablement fournie par M. Jadot.

I. 4. Le plasmide bactérien.

Le vecteur utilisé est pBluescript SK⁻ (Stratagene). Ce plasmide de 2960 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 (figure 14).

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

I. 5. Principe du test blanc-bleu.

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 le 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.
2. 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.

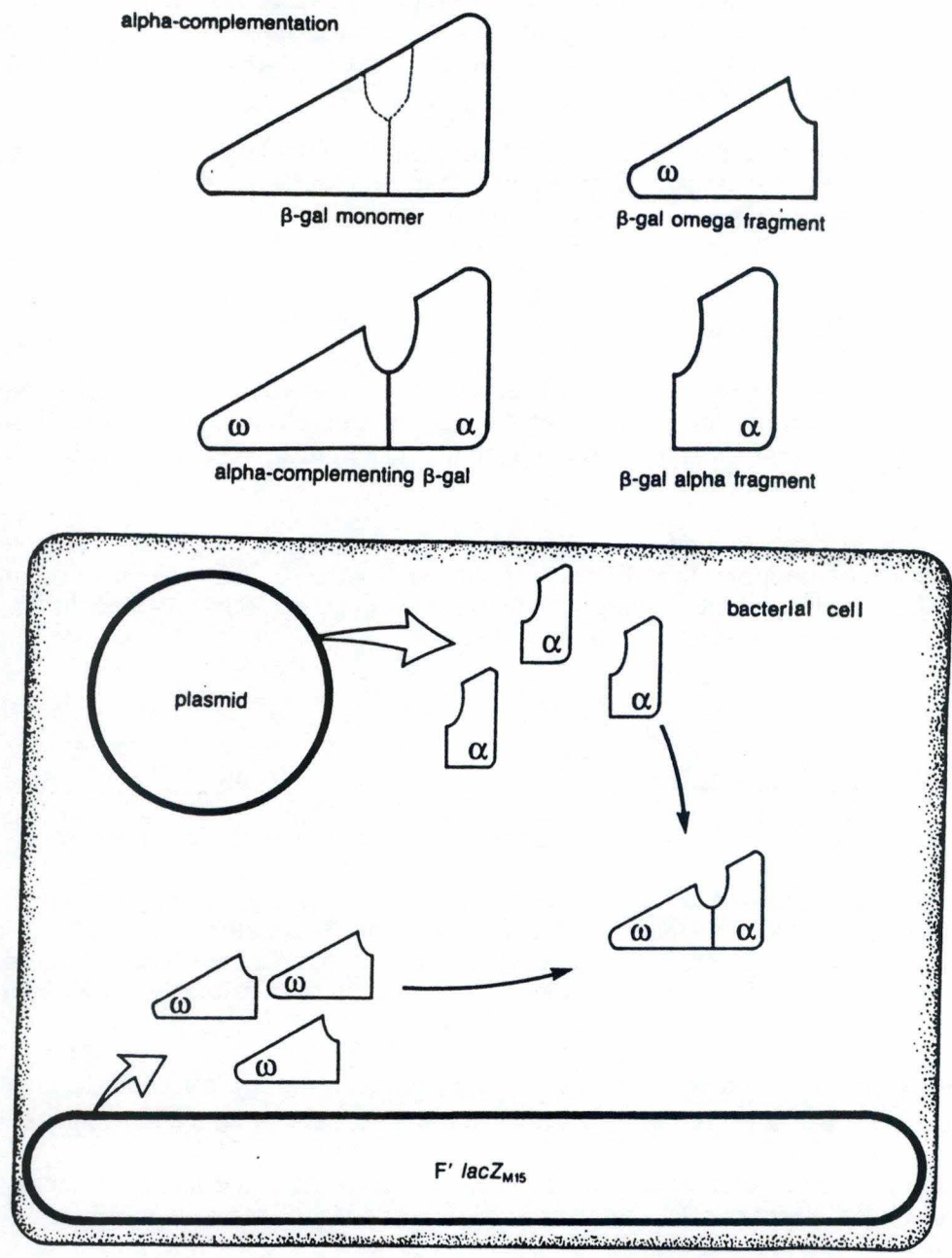


Figure 15 : Principe du test blanc-bleu ; α -complémentation intragénique.

L'association des fragments α et ω permet la reconstitution d'une β -galactosidase active (figure 15 : α -complémentation intragénique).

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 et en 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.

I. 6. Préparation des cellules compétentes.

Nous suivons le protocole décrit en 1.8.4 de Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, 1993).

I. 7. Transformation.

Toutes les transformations sont effectuées par électroporation à l'aide d'un appareil Cellject basic. Un protocole d'électroporation est décrit en 1.8.5 de Current protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, 1993).

I. 8. Miniprep de DNA plasmidique.

Nous suivons le protocole détaillé en 1.6.1 de Current protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, 1993).

I. 9. Maxiprep de DNA plasmidique.

Nous appliquons de façon routinière le protocole décrit en 1.7.1 de Current protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, 1993).

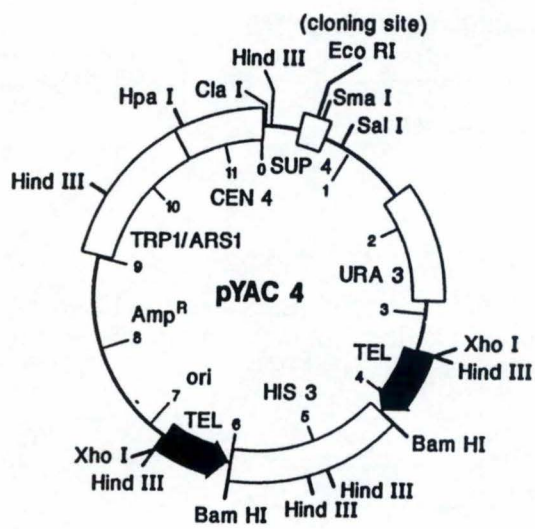


Figure 16 : Carte de restriction du vecteur pYAC 4 :

II. TECHNIQUES RELATIVES À LA MANIPULATION DE LEVURES.

II. 1. Milieux liquides et milieu solide contenant de l'agar.

Voir Current protocols in Molecular Biology : 13.1.2, 13.1.3, 13.1.4, 13.1.5 (Ausubel *et al.*, 1993).

II. 2. Souche de levure.

AB1380 : Mat a, ade 2-1, can 1-100, lys 2-1, ura 3, trp 1, his 5 (Burke *et al.*, 1987).

II. 3. Vecteur de clonage : pYAC 4.

Le vecteur de clonage pYAC 4 (figure 16) contient tous les éléments nécessaires à la réplication du vecteur en tant que chromosome artificiel linéaire, dans les cellules de levure (Burke *et al.*, 1987).

pYAC 4 contient un centromère (CEN 4) et deux télomères (TEL) du protozoaire *Tetrahymena*, une séquence de réplication autonome (ARS 1), et deux gènes (URA 3 et TRP 1) pour la sélection des levures transformées. Une origine de réplication bactérienne (ori) et un gène de résistance à l'ampicilline (Amp^r) pour la sélection de cellules bactériennes sont également présents.

Le petit fragment situé entre les séquences TEL peut être éliminé par digestion *Eco* RI et *Bam* HI, résultant en la production de deux bras dont l'extrémité cohésive *Eco* RI est disponible pour le clonage de grands fragments de DNA exogène.

II. 4. Préparation de DNA génomique de levure.

Le protocole appliqué au laboratoire est issu de Current Protocols in Molecular Biology, 13.11.1 et 13.11.2 (Ausubel *et al.*, 1993).

III. CONSTRUCTION D'UNE BANQUE DE cDNA.

III. 1. Isolement de RNA total.

Adapté de Chomczynski *et al.*.

Réactifs :

- Eau-DEPC et 0,5 % SDS-DEPC : traiter au diétylpyrocarbonate (DEPC, 1%), puis autoclaver.
- Citrate de sodium 0,75 M pH 7,0.
- Sarcosyl 10 % dans eau-DEPC.
- Solution D : thiocyanate de guanidinium 4 M / citrate de sodium 25 mM pH 7,0 / sarcosyl 0,5 % / β -mercaptoéthanol 0,1 M.

Solution stock : dissoudre 250 g thiocyanate de guanidinium (Fluka) en ajoutant directement dans la bouteille 293 ml d'eau-DEPC, 17,6 ml de citrate de sodium 0,75 M pH 7,0, et 26,4 ml de sarcosyl 10 %, à 65 °C. Cette solution stock peut être gardée au moins 3 mois à température ambiante.

La solution D est préparée en ajoutant à cette solution stock, 0,36 ml de β -mercaptoéthanol pour 50 ml de solution stock. Cette solution D peut être stockée 1 mois à température ambiante ou être congelée.

- Phénol aqueux : phénol saturé par de l'eau-DEPC, aliquoté par 50 ml et congelé.
- Acétate de sodium 2 M, pH 4,0 (NaAc) (16,42 g d'acétate de Na + 40 ml H₂O + 35 ml d'acide acétique glacial, ajuster à pH 4,0 et à un volume final de 100 ml).
- Chloroforme/alcool isoamylique (CIAA).

Procédure (pour 100 mg de tissu) :

1. Prélever le tissu et homogénéiser immédiatement sur glace dans 1 ml de solution D.
2. Ajouter 0,1 ml de NaAc 2 M et mélanger par inversion (sur glace).
3. Ajouter 1ml de phénol et mélanger (sur glace).
5. Agiter 10 secondes et laisser sur glace 15 minutes.
6. Centrifuger à 10 000 rpm, et à 4 °C pendant 20 minutes (Corex : 9000 rpm).
7. Reprendre la phase aqueuse (environ 1 ml) et y mélanger 1ml d'isopropanol. Laisser à -20°C au moins 1 heure.

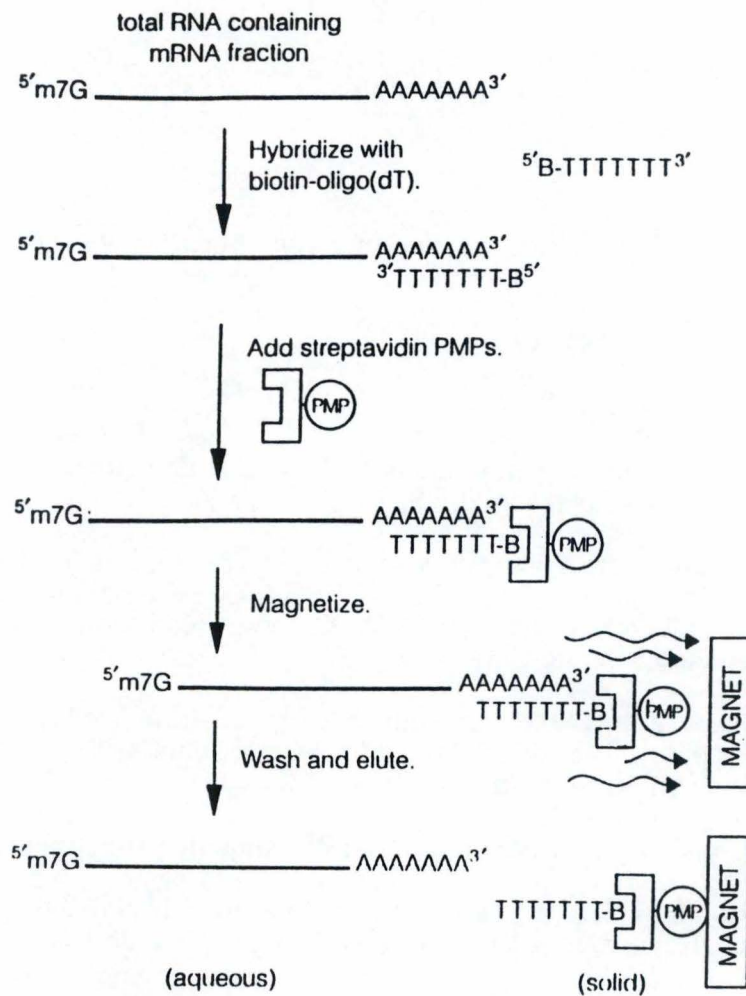


Figure 17 : Capture magnétique des messagers polyadénylés au moyen du système PolyAtract.

8. Centrifuger 10 000 rpm, 20 minutes, 4 °C.
(Une étape supplémentaire pour RNA de foie afin de diminuer les contaminations en glycoène : vortexer dans 4 M LiCl. Centrifuger à 5000 g pendant 10 min).
9. Reprendre le culot de RNA dans 0,3 ml de solution D, mettre en eppendorf et précipiter par 1 volume d'isopropanol à -20 °C pendant 1 heure.
10. Microfuger 10 minutes en chambre froide.
11. Suspendre le culot dans de l'alcool 75 %. Vortexer et laisser incuber 10 à 15 minutes à température ambiante. Cette étape est réalisée pour dissoudre les quantités résiduelles de contaminants guanidiques.
12. Microfuger 5 min à 10 000 rpm.
13. Sécher à la speedVac de 5 à 15 minutes.
14. Dissoudre dans 50 ml de SDS 0,5 % traité au DEPC ou avec de l'eau traitée au DEPC à 65 °C environ 10 minutes. Le culot se dissout mal au début, mais sans problème en chauffant.
15. Stocker à -70 °C ou dans de l'éthanol à -20 °C.

III. 2. Isolement des mRNAs. Système du PolyATtract (Promega).

Le protocole suivant permet l'isolement de mRNA à partir de 1 à 5 mg de RNA total (figure 17). Le RNA total doit être dissout dans de l'eau déionisée, "RNase-free" ou dans du SDS 0,5 %.

III. 2.1. Annealing de la sonde oligo(dT) biotinylée.

1. Dans un tube stérile "RNase free", mélanger 1 à 5 mg de RNA total et de l'eau "RNase free" jusqu'à un volume final de 2430 µl.
2. Placer le tube dans un bloc chauffant à 65°C pendant 10 minutes.
3. Ajouter 10 µl de sonde oligo (dT) biotinylée et 60 µl de SSC 20 X au mélange de RNA. Mélanger délicatement et incuber à température ambiante jusqu'à refroidissement complet.

III. 2.2. Lavage des billes paramagnétiques coatées à la streptavidine.

4. Resuspendre les billes paramagnétiques couvertes de streptavidine (SA-PMPs) jusqu'à dispersion complète, puis les capturer en plaçant le tube les contenant dans le collecteur magnétique. Décantier le surnageant délicatement. Ne pas centrifuger les billes.
5. Laver 3 X les SA-PMPs dans du SSC 0,5 X (1,5 ml par lavage) en capturant les SA-PMPs à l'aide du collecteur magnétique et en décantant le surnageant.
6. Resuspendre les SA-PMPs lavées dans 0,5 ml de SSC 0,5 X.

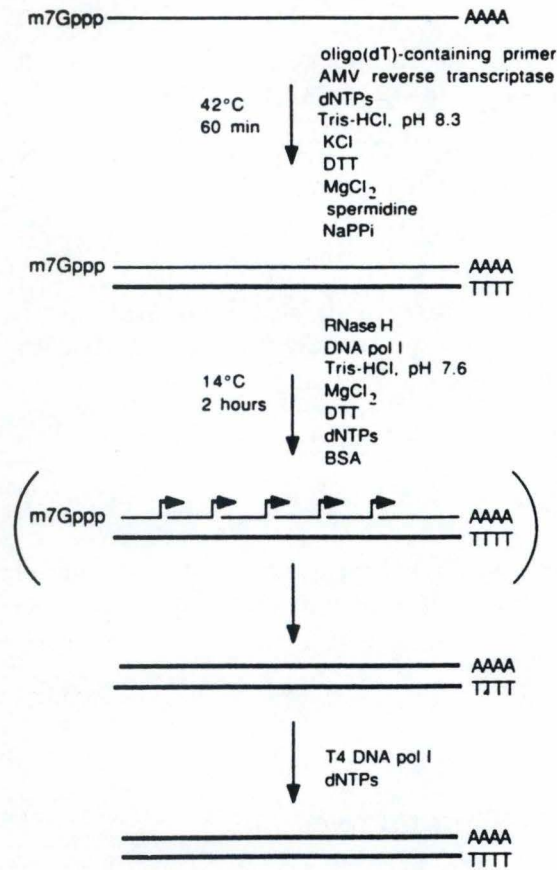


Figure 18 : Utilisation d'une amorce oligo dT pour initier la synthèse de cDNAs.

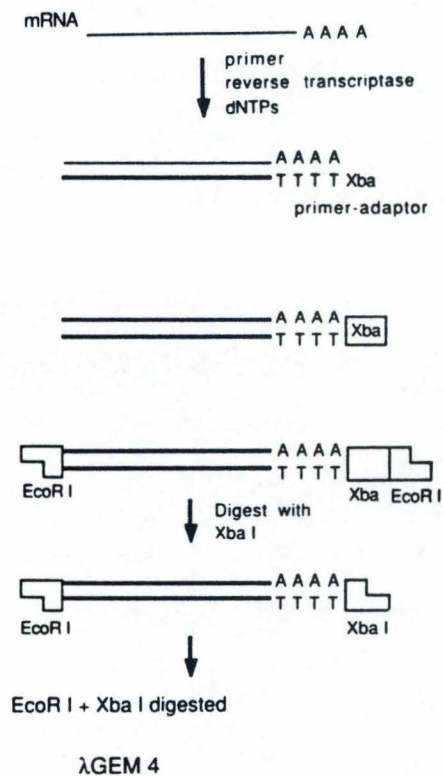


Figure 19 : Clonage directionnel de cDNAs dans les bras de lambda GEM 4.

III. 2.3. Capture et lavages des hybrides oligo(dT)-ARNm.

7. Ajouter le volume entier de la réaction d'annealing au tube contenant les SA-PMPs lavées.
8. Incuber à température ambiante pendant 10 minutes.
9. Capturer les SA-PMPs à l'aide du collecteur magnétique et décanter le surnageant sans toucher le culot de SA-PMPs. Il est sage de conserver les éluats de lavages jusqu'à ce que l'on soit certain que le binding et l'éluion des mRNAs ait bien eu lieu.
10. Laver les SA-PMPs 4 X dans du SSC 0,1 X (1,5 ml par lavage). Après le dernier lavage, capturer les billes et décanter la phase aqueuse que sans toucher le culot.

III. 2.4. Elution des mRNAs.

11. Pour éluer les mRNAs, resuspendre le culot de billes dans 1 ml d'eau "RNase free".
12. Capturer les billes et décanter la phase aqueuse contenant les mRNAs dans un tube frais "RNase free".

III. 3. Détermination de la concentration et pureté des mRNAs.

La concentration et pureté des mRNAs élués peut être déterminée par spectrophotométrie. Les mRNAs purs auront un rapport des absorbances A₂₆₀/A₂₈₀ supérieur ou égal à 2. Pour estimer la concentration, on peut considérer qu'une solution mRNA de 40 mg/ml aura une absorbance de 1 à 260 nm. La qualité du mRNA isolé peut être contrôlée par électrophorèse dénaturante en gel d'agarose : le mRNA doit apparaître tel un smear s'étendant depuis approximativement 8 kb jusqu'à approximativement 0,5 kb.

III. 4. Synthèse et clonage de cDNA.

Le clonage directionnel de cDNA dans le vecteur λ GEM 4 est réalisé grâce à un oligodéoxynucléotide amorce-adaptateur contenant un site *Xba*I en amont de la séquence oligodT servant à amorcer la synthèse du premier brin de cDNA (figure 18). Après la synthèse du second brin et l'adjonction d'adaptateurs *Eco*RI, les molécules double brin sont digérées avec *Xba*I. Le cDNA est alors ligué dans les bras doublement digérés *Eco*RI-*Xba*I du vecteur λ GEM 4.

III. 4.1. Synthèse du premier brin.

Le protocole ci-dessous est conçu pour un volume total de 25 μ l. Ce volume est recommandé si le matériel mRNA de départ est inférieur ou égal à 2 mg. Pour chaque microgramme de mRNA additionnel, augmenter le volume réactionnel de 10 μ l. Après que tous les réactifs aient été ajoutés, un aliquot de 5 μ l est transvasé dans un tube contenant du (α^{32} P)dCTP comme traçeur, afin de suivre la synthèse du premier brin. Le reste de la réaction servira à la synthèse du second brin.

Les rapports amorce-adaptateur et transcriptase réverse contre mRNA devraient être maintenus à 0,5 μ g/ μ g et 15 U/ μ g respectivement.

1. Dans un eppendorf stérile "RNase free", ajouter l'amorce-adaptateur à l'échantillon mRNA. Employer 0,5 μ g d'amorce-adaptateur par μ g RNA dans un volume de 15 μ l et chauffer à 70 °C pendant 5 minutes. Laisser refroidir à température ambiante, microfuger, et ajouter les composants suivants selon l'ordre indiqué :

First strand buffer 5 X	5 μ l
rRNasin (inhibiteur de ribonucléases)	25 U
sodium pyrophosphate 40 mM	2,5 μ l
AMV transcriptase réverse	15 U/ μ g RNA
Eau nucléase free jusqu'à un volume final de 25 μ l	

2. Mélanger délicatement et transvaser 5 μ l dans un nouveau tube contenant 2-5 μ Ci de (α^{32} P)dCTP. Ce tube contient la réaction traqueur, qui sera employée pour mesurer la synthèse du premier brin par incorporation (TCA précipitation) et par électrophorèse alcaline en gel d'agarose.
3. Incuber les deux réactions à 42 °C pendant 60 minutes.
4. Placer les deux tubes sur la glace. Ajouter 50 mM EDTA à la solution traqueur jusqu'à un volume total de 100 μ l et placer sur la glace. Garder 10 μ l pour le test d'incorporation, le reste sera utilisé pour l'analyse sur gel après l'extraction.

III. 4.2. Synthèse du second brin.

La synthèse du second brin se réalise immédiatement après la synthèse du premier brin. Aucune extraction ou précipitation intermédiaires ne sont nécessaires.

Le volume de la réaction du second brin dépend de celui du premier brin. Une dilution 5 de la réaction du premier brin devrait être maintenue. Les quantités de réactifs sont rééchelonnées proportionnellement à celles données ci-dessous pour les 20 μ l de réaction du premier brin.

1. Ajouter les composants suivants selon l'ordre indiqué :

First strand reaction	20 μ l
Second strand 10 X buffer	10 μ l
<i>E. Coli</i> DNA polymérase I	23 U
<i>E. Coli</i> RNase H	0,8 U
Eau "nuclease free" jusqu'à un volume final de 100 μ l	

2. Mélanger délicatement. Si l'on désire une réaction traqueur pour le second brin, transvaser 10 μ l dans un nouveau tube contenant 2-5 μ Ci (α^{32} P)dCTP.
3. Incuber les deux réactions à 14 °C pendant 2 heures.
4. Ajouter 90 μ l de 50 mM EDTA à la réaction traqueur de 10 μ l. Les réactions traceurs peuvent être employées pour les tests d'incorporation et l'analyse sur gel.
5. Chauffer le tube contenant la réaction non marquée à 70 °C pendant 10 minutes, donner un coup de microfugeuse, et placer sur glace.
6. Ajouter 2 unités de T4 DNA polymérase par μ g de mRNA, et incuber à 37 °C pendant 10 minutes.
7. Arrêter la réaction en ajoutant 10 μ l de 200mM EDTA, et placer sur glace.
8. Pour extraire les cDNAs, ajouter un volume égal de TE saturé phénol/chloroforme, mélanger et microfuger à température ambiante pendant 2 minutes.
9. Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube, ajouter 0,5 volume d'acétate d'ammonium 7,5 M, mélanger et ajouter 2,5 volumes d'éthanol absolu froid. Laisser 30 minutes à -20 °C, puis centrifuger 5 minutes.
10. Décanter le surnageant et laver le culot à l'éthanol 70 %.
11. Dissoudre le culot dans 10-50 μ l de tampon TE. Le cDNA est maintenant prêt pour l'analyse sur gel et un fractionnement selon la taille, avant l'adjonction des adaptateurs. Dissoudre la réaction traqueur dans 10-20 μ l de tampon TE.

III.4.3. Test d'incorporation. (précipitation TCA).

1. Déposer 3 μ l d'échantillon provenant de la réaction traqueur diluée du premier et du second brin sur des "glass fiber filters", et laisser sécher à l'air. Ces échantillons représentent les cpm totaux dans les réactions.
2. Ajouter 3 μ l de ces mêmes réactions à des tubes contenant 100 μ l d'une solution de DNA carrier 1 mg/ml et mélanger. Ajouter 0,5 ml d'acide trichloroacétique (TCA) 5 % et vortexer. Laisser sur glace pendant 5-30 minutes.
3. Déposer les échantillons sur des "glass fiber filters", laver 3 fois avec 5 ml de TCA 5 %. Rincer les filtres avec 5 ml d'acétone ou éthanol, puis laisser sécher à l'air.
4. Compter les cpm totaux et incorporés (précipitation TCA), après avoir ajouté le fluide de scintillation approprié.

Les calculs du rendement des réactions de synthèse de premier et second brin sont exposés dans le chapitre "résultats".

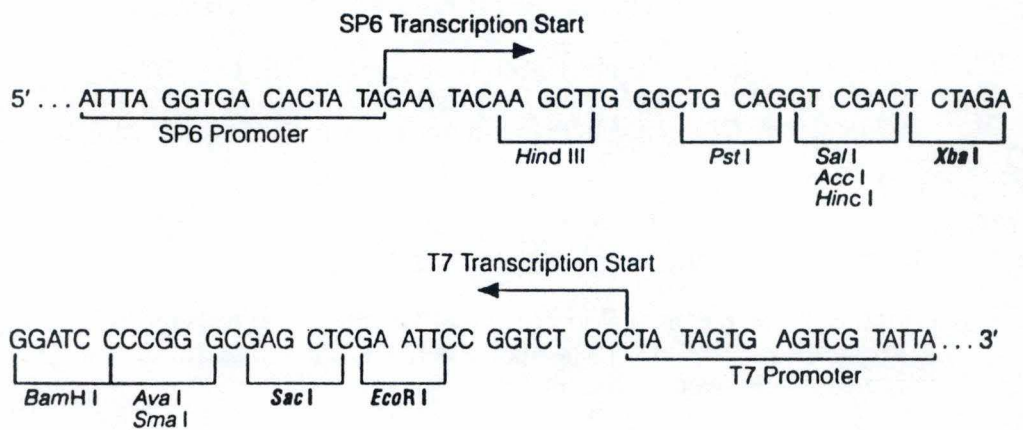
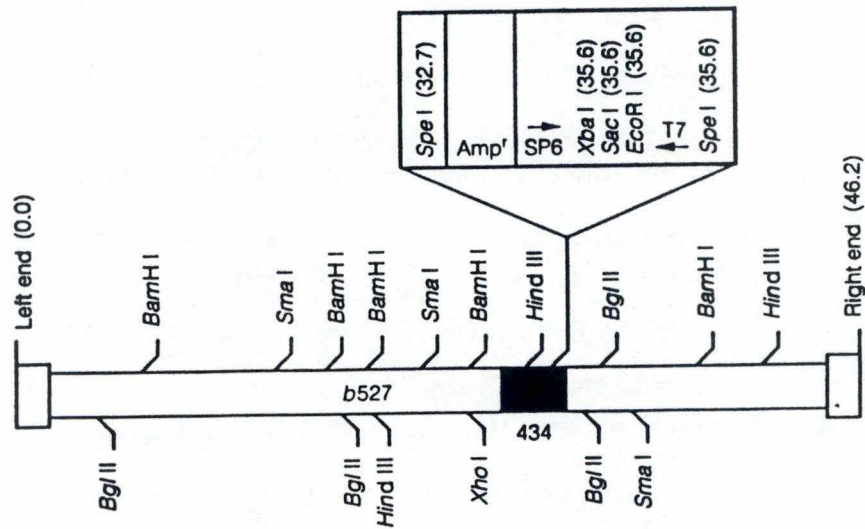


Figure 20: Carte structurale et site multiple de clonage du vecteur lambda GEM 4 non digéré.

III.4.4. Ligation des adaptateurs *Eco* RI.

Les cDNAs synthétisés à l'aide de l'amorce-adaptateur *Xba*I peuvent être clonés directionnellement dans les bras déphosphorylés *Xba*I-*Eco*RI de λ GEM 4 (Promega), après adjonction des adaptateurs *Eco*RI (figures 19 et 20). Ces adaptateurs consistent en une molécule duplex avec un bout franc pour la ligation au cDNA, et une extrémité cohésive *Eco*RI pour la ligation au bras de vecteur. La ligation des adaptateurs aux extrémités blunt end des cDNAs doit être suivie d'une réaction de phosphorylation si le vecteur de clonage est déphosphorylé. L'excès d'adaptateurs doit être éliminé par passage sur spin column.

1. Ligation des adaptateurs :

ligase 10 X buffer	3 μ l
bovine serum albumine 1mg/ml	3 μ l
DNA (100 ng/ μ l)	2,5 μ l
<i>Eco</i> RI adaptateur (excès molaire 20 X)	1 μ l
T4 DNA ligase	7,5 U
Eau jusqu'à un volume final de 30 μ l	

Incuber à 15° C pendant 6-18 heures

Inactiver la réaction en chauffant à 70 °C pendant 10 minutes.

2. Réaction de phosphorylation :

- Directement après la réaction de ligation, refroidir le tube sur la glace, et ajouter les réactifs suivants :

kinase 10 X buffer	4 μ l
0,1 mM ATP	2 μ l
T4 polynucléotide kinase	10 U
Eau jusqu'à un volume final de 40 μ l	

- Incuber la réaction à 37 °C pendant 30 minutes

- Une digestion *Xba*I doit être effectuée si l'on désire un clonage directionnel. La digestion peut être effectuée en même temps que la réaction de phosphorylation. Pour ce faire, remplacer le tampon kinase 10 X par le tampon de restriction 10 X et porter le temps d'incubation à 60 minutes.

- Ajouter 1 volume de TE saturé phénol/chloroforme. Vortexer 30 secondes et centrifuger à 12 000 g pendant 3 minutes.

- Transvaser la phase aqueuse dans un nouveau tube.

3. Elimination des adaptateurs non liés :

Appliquer l'échantillon au sommet de la spin column, et centrifuger à 800 g pendant 5 minutes. Les cDNAs élués peuvent être employés tels quels ou précipités à l'éthanol.

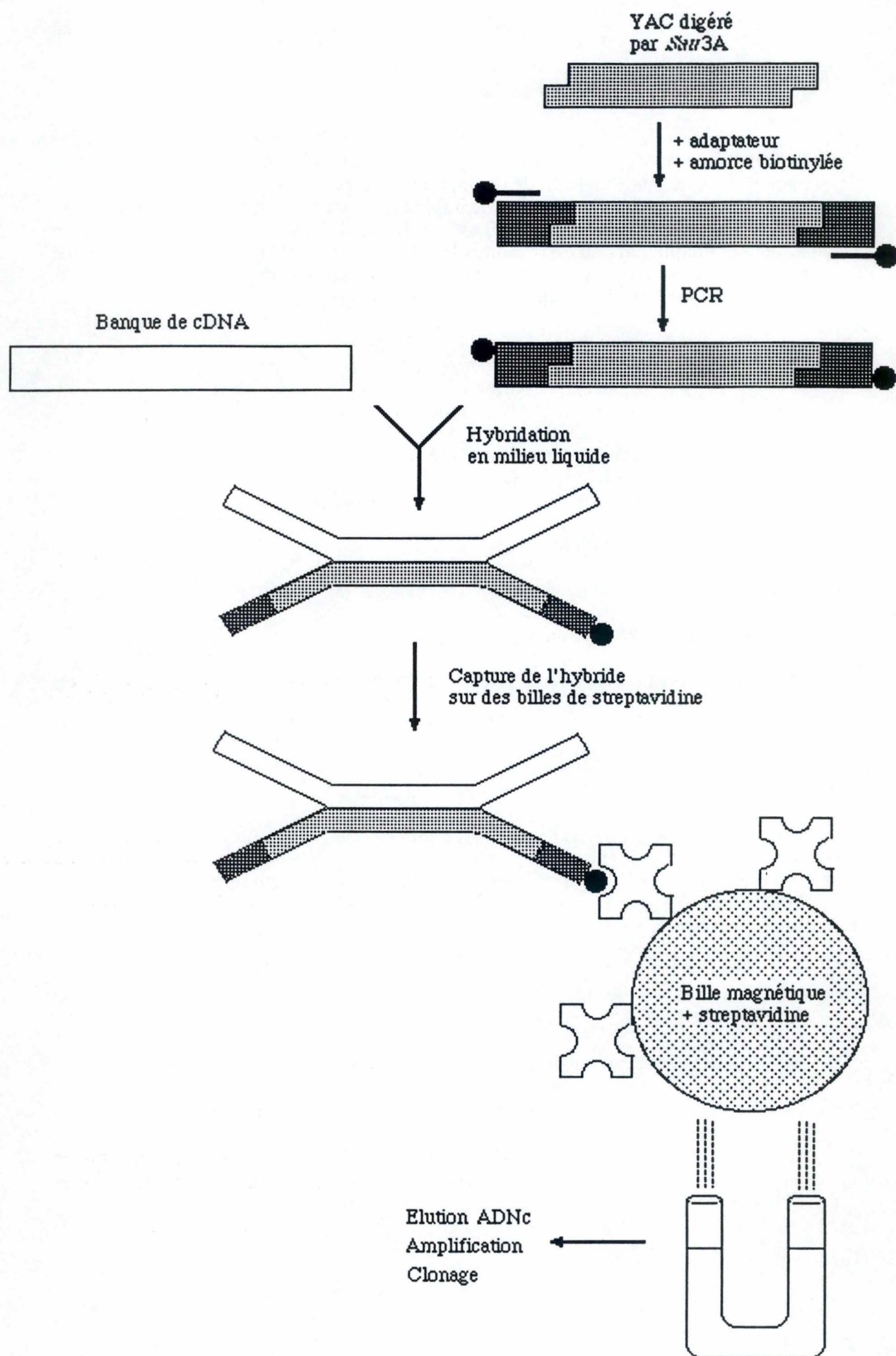


Figure 21 : Isolement de séquences codantes par capture magnétique.

III. 4.5. Ligation des cDNAs aux bras *EcoRI* - *XbaI* déphosphorylés de λ GEM4.

Les conditions optimales de ligation que nous avons établies au laboratoire sont les suivantes :

λ GEM 4 (0.5 μ g / μ l)	2 μ l
cDNA (10 ng / μ l)	1 μ l
Tampon ligase 10 X	1 μ l
Eau	5 μ l
T4 DNA ligase	2 U

Incuber la réaction 3 heures à température ambiante.

La banque de cDNA préparée de la sorte peut être amplifiée par PCR, en vue de produire suffisamment de matériel pour les expériences d'hybridation en solution ou sur filtre. La séquence des amorces, de même que les conditions de la réaction de PCR sont explicitées dans la rubrique IV.2.

III. 4.6. Etalement sur boîtes et transfert de librairies de bactériophages.

Un protocole est décrit en 6.1.1-6.1.4 de Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, 1993).

III. 4.7. Etalement sur boîtes et transfert de librairies de cosmides et plasmides.

Nous suivons le protocole de Current protocols in Molecular Biology, 6.2.1-6.2.3 (Ausubel *et al.*, 1993).

IV. CAPTURE MAGNÉTIQUE DE cDNAs ENCODÉS DANS DES YACs.

Le principe de cette technique a été exposé à la page 13, et est résumé à la figure 21.

IV.1. Préparation du DNA génomique biotinylé.

IV.1.1. Préparation de DNA de levure de très haut poids moléculaire en blocs d'agarose.

Les procédures standard pour la préparation de DNA ne permettent pas d'obtenir intactes les molécules de très haut poids moléculaire. Les très grandes molécules de DNA sont presque toujours clivées par des forces mécaniques lors de leur isolement. Pour empêcher le clivage de ces molécules, des cellules intactes incrustées dans de l'agarose sont lysées et déprotéinisées *in situ*. La matrice d'agarose protège le DNA incrusté des forces de cisaillement et fournit un moyen simple pour manipuler les échantillons (Rothstein, 1990). Les blocs d'agarose contenant le DNA peuvent être chargés directement dans les puits d'un appareil à gel pulsé.

1. Inoculer 100 ml de milieu déficient en uracile et tryptophane avec une colonie isolée. Incuber la culture pendant 2 à 3 jours à 30 °C, avec agitation (2 ml de culture permettent la fabrication d'un bloc d'agarose qui contiendra environ 2µg de DNA).
2. Centrifuger la culture à 3000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante, resuspendre le culot dans 10 ml de Tris-HCl pH 7,5/ EDTA 50 mM pH 7,5.
3. Centrifuger à 3000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante et resuspendre le culot dans 10 ml de SCE (sorbitol 1 M / citrate de sodium 0,1 M pH 5,8 / EDTA 10 mM pH 7,5).
4. Centrifuger 10 minutes à 3000 rpm à 20 °C, et resuspendre le culot dans le volume adéquat de SCE (40 µl par bloc). Ajouter un volume égal d'agarose SeaPlaque GTG (FMC) 1,5 % préparé dans du SCE et contenant 8 mg/ml de Novozyme (le tout conservé à 50 °C). Mélanger et verser rapidement 80 µl dans les moules, placés sur la glace. Laisser 15 à 30 minutes sur la glace.
5. Transférer les blocs dans une solution de SCE contenant 10 mM de DTT et incuber 2 heures à 37 °C.
6. Transférer ensuite les blocs dans une solution de lyse contenant 1 % lithium dodecyl sulphate, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8, et incuber 1 heure à 37 °C.
7. Remplacer par la même solution, et incuber une nuit à 37 °C.
8. Rincer les blocs 2 fois dans du TE à 50 °C, 2 fois dans du TE à température ambiante pour analyse en gel pulsé.
9. Conserver dans 10 mM Tris, 50 mM EDTA, à 4 °C.

Avant restriction, il faut laver les blocs 2 X dans TE à 50 °C, puis dans TE + PMSF (0,04 mg/ml) à 50 °C, et finalement 1 X dans TE à température ambiante.

IV.1.2. Electrophorèse en champ pulsé et extraction du DNA de YAC.

Les blocs d'agarose contenant les YACs d'intérêt sont soumis à une électrophorèse en champ pulsé dans des conditions séparant le YAC des chromosomes endogènes. Nous décrivons ci-dessous les dispositifs électrophorétiques mis en place pour séparer les YACs 24-5E, FAT-F4, et C13-G2.

A) Conditions pour la séparation du YAC 24-5E :

- Gel d'agarose Low Melting (SeaPlaque 1%) et tampon TBE 0,5 X.
- Durée des pulses : 60 secondes pendant 15 heures, suivi de 90 secondes pendant 8 heures
- Durée de l'électrophorèse : 23 heures, voltage : 200 Vet ampérage : 0,130 mA.

B) Conditions pour la séparation du YAC C13-G2 :

- Gel d'agarose Low Melting (SeaPlaque 1%) et tampon TBE 0,5 X.
- Durée des pulses : 20 secondes pendant 14 heures, suivi de 40 secondes pendant 12 heures
- Durée de l'électrophorèse : 26 heures, voltage : 200 V et ampérage : 0,130 mA.

C) Conditions pour la séparation du YAC FAT-F4 :

- Gel d'agarose Low Melting (SeaPlaque 1%) et tampon TBE 0,5 X.
- Durée des pulses : 90 secondes pendant 30 heures
- Durée de l'électrophorèse : 30 heures, voltage : 200 V et ampérage : 0,130 mA.

Le gel est coloré et le résultat de la migration est visualisé sous UV. La bande d'intérêt est découpée du gel et pré-équilibrée dans 0.5 ml de tampon de restriction *Sau3A* 1X pendant 30 minutes à température ambiante. Le tampon est ensuite retiré et la tranche d'agarose est fondue à 65 °C pendant 5 minutes. Chaque YAC est aliquote en eppendorf à raison de 35 µl par tube et stocké à -20 °C.

IV.1.3. Digestion du YAC et ligation des adaptateurs.

Pour chaque digestion de YAC, ajouter 4 µl de tampon de restriction 10X et 20 à 40 U d'enzyme par tube aliquote. Incuber de 4 à 6 heures à 37 °C. Après digestion, ajouter 5 µl de tampon ligase 10 X, 5 U de T4 ligase et un excès 10 à 100 molaires d'adaptateurs à chaque tube réactionnel. Les réactions sont incubées à t° ambiante pendant 15 heures, après quoi elles sont fondues à 65 °C et 5 µl sont prélevés pour la réaction de PCR.

IV.1.4. PCR biotinylée.

Une réaction de 100 µl utilisant 200-300 pmoles d'amorce biotinylée en 5', complémentaire à un des brins de l'adaptateur est réalisée dans les conditions suivantes :

- 95 °C pendant 4 minutes (1 X)
- 95 °C pendant 30 secondes (30 X)
- 60 °C pendant 30 secondes (30 X)
- 72 °C pendant 2 minutes (30 X)

L'amorce biotinylée utilisée a la composition suivante :

5' TGGTCTCACGAATTCGTCGA 3'

10 µl de la réaction sont analysés sur gel d'agarose 1,2 % et transférés sur filtre en vue d'effectuer diverses hybridations contrôles et estimer la qualité du matériel amplifié. Le DNA génomique biotinylé est précipité à l'éthanol, lyophilisé et resuspendu dans 20 µl de phosphate de sodium 0,120 M pH 7,0.

IV.2. Amplification et préparation des cDNAs.

Les inserts de la banque cDNA sont amplifiés à l'aide des amorces-vecteurs. La séquence de ceux-ci et les conditions de réactions sont reprises ci-dessous :

95 °C pendant 4 minutes (1 X)
95 °C pendant 1 minute (30 X)
55 °C pendant 1 minute (30 X)
72 °C pendant 2 minutes (30 X)
72 °C d'élongation pendant 10 minutes (1 X)

Les amorces utilisées ont la composition suivante :

Amorce 1 : 5' GGAGACCGGAATTCCGTTGCTGTCG 3'

Amorce 2 : 5' GCTTGGGCTGCAGGTCGACTCAGA 3'

Trois réactions de 100 µl sont effectuées par banque. Un aliquot de 10 µl est analysé sur gel d'agarose 1,2 %. L'excès d'amorces et les dNTPs non incorporés sont éliminés par précipitation à l'acétate d'ammonium. Les cDNAs sont repris dans du TE à une concentration finale de 1µg/µl.

IV. 3. Bloquage et hybridation.

De 100 à 200 ng de DNA génomique biotinylé sont utilisés par hybridation. Ceci représente de l'ordre de 200-300 pmoles de molécules de biotine, ce qui équivaut à la quantité minimale que peut lier 1 mg de billes magnétiques coatées à la streptavidine.

IV. 3.1. Bloquage des YACs.

Le bloquage des séquences correspondant aux éléments répétitifs de souris, aux séquences de levure, aux séquences de vecteur pYAC4 et aux séquences ribosomales est réalisé par l'adjonction au DNA biotinylé de 20 µg de DNA total de souris, 10 µg de DNA de levure soniqué, 2 µg de pBR322 digéré et 2 µg de rDNA digéré. Ensuite, 50 µl d'huile minérale sont ajoutés, puis la mixture est dénaturée et incubée à 65 °C pendant 2 heures.

IV. 3.2. Hybridation.

2 µg de cDNAs amplifiés sont dénaturés et ajoutés au DNA génomique bloqué. Le mélange réactionnel est incubé à 65 °C pendant 16-20 heures.

IV.4. Capture et élution des cDNAs spécifiques.

Les cDNAs spécifiques liés au DNA génomique biotinylé sont capturés à l'aide de billes paramagnétiques coatées à la streptavidine (Dynal). 100 µl de billes (1 mg) sont rincées 3 X dans du SSC 6 X et resuspendues dans 2 volumes de TE/NaCl 1M.