



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Approche moléculaire du syndrome humain de Waardenburg: clonage soustractif de gènes dérégulés dans le mutant murin correspondant SPLOTCH (Sp2H)

Van Helleputte, Françoise

Award date:
1994

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.

**Approche moléculaire du syndrome humain de Waardenburg
clonage soustractif de gènes dérégulés dans le mutant
murin correspondant, *Sp^{2H}*)**

Van Helleputte Françoise

Résumé

La mutation *Sp^{2H}* est une délétion de 32 nucléotides dans l'homéobox du gène Pax-3 chez la souris. Les souris homozygotes pour la mutation *Sp^{2H}* ne sont pas viables et avortent spontanément au 14ème jour de leur vie embryonnaire. Ces embryons ne sont pas viables suite à un défaut dans la fermeture de leur tube neural. La présence de séquences paired et homéobox dans le gène Pax-3 suggère que la protéine Pax-3 est un facteur de transcription. L'objectif de ce mémoire est de tenter de cloner, par une approche soustractive, les gènes dont l'expression serait modifiée dans le mutant *Sp^{2H}*.

La technique utilisée est celle qui opère la soustraction de molécules d'ADNc sur billes magnétiques (Coche, 1994). L'expérience de soustraction a été réalisée dans le sens sauvage moins *Sp^{2H}* et dans le sens inverse dans le but d'isoler, respectivement, les séquences qui seraient exprimées préférentiellement chez les souris sauvages ou homozygotes mutantes.. Cette approche nous a permis d'isoler des séquences qui sont apparemment exprimées de manière différentielle entre les deux types de souris. Il reste à démontrer que ces fragments de gènes sont impliqués dans la problématique de la fermeture du tube neural.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1994

Promoteur : J. Vandenhautte

Co-promoteur : M. Vekemans

"Le moment où une pensée arrive à notre conscience est une phase avancée de son développement : c'est son éclosion; toute sa période foetale et embryogénèse l'a précédée."

- Henry Frédéric Amiel

Au cours de cette année de recherche pour l'élaboration de ce mémoire, le Professeur J. Vandenhoute m'a accueillie, formée, pour finalement m'élancer dans le monde de la recherche scientifique et m'en faire apprécier ses différentes facettes. Je tiens à l'en remercier infiniment.

Un tout grand merci au professeur M. Vekemans sans qui ce mémoire n'aurait pas pu se faire.

Mes remerciements iront tout particulièrement au Docteur Thierry Coche qui m'a assistée, m'a fait bénéficier de toutes ses connaissances et a permis mon intégration dans son laboratoire de par sa sympathie.

Toute ma reconnaissance aux membres du laboratoire : Monique, Jean-Pol, Isabelle, Rose-Marie, ainsi que Nathalie, Matthieu et Dominique qui avec moi ont vécu les mêmes émotions au cours de cette année.

Merci à ma famille et mes amis pour le soutien moral qu'ils m'ont apporté tout au long de mes études.

A tous merci,

Françoise

Liste des abréviations

+/+ : Génotype 2 allèles sauvages

101/H : souche de souris

ADN : Acide désoxyribonucléique, *DNA* : *Deoxyribonucleotidic Acid*

ADNc : ADN complémentaire

ADNg : ADN génomique

ARN : Acide ribonucléique, *RNA* : *Ribonucleotidic Acid*

ARNm : ARN messenger

ARN_T : ARN total

BB : *Binding Buffer*, tampon de liaison

BET : bromure d'éthidium

C3H/HeH : souche de souris

DEPC : Diethyl Pyrocarbonate

dNTP : désoxyribonucléotides triphosphates

DO : densité optique

g : gramme

l : litre

M : Molaire

MCS : *Multiple Cloning Site*, Site Multiple de Clonage

mol : mole

n : nano ; μ : micro

pb : paire de base; kb : kilobase

PCR : *Polymerase Chain Reaction*, Réaction en Chaîne de Polymérisation

RDA : *Representational Differences Analysis*, Analyse des Différences de Représentations

RFLP : *Restricted Fragment Length Polymorphism*, Polymorphisme des Longueurs des Fragments de Restrictions

SNC : Système nerveux central

Sp/Sp : Génotype 2 allèles sauvages

U : unité d'enzyme

WB : *Washing Buffer*, tampon de lavage

TABLE DES MATIÈRES.

<u>A. Introduction</u>	1
1. Le développement embryonnaire chez la souris	1
2. Le système nerveux.....	3
2.1. Développement du tube neural.....	4
2.2. Développement du système nerveux central.....	4
3. Génétique du développement.....	5
4. Les différents modèles.....	6
4.1. Les invertébrés	6
4.2. Les vertébrés.....	7
4.3. L'étude des mutations	9
5. Notre modèle, la souris Splotch	9
5.1. Les gènes Pax	9
5.1.1. <u>Une famille de huit gènes</u>	10
5.1.2. <u>Le gène Pax-3</u>	11
<i>Les différentes mutations dans Pax-3</i>	11
<i>La mutation Sp2H</i>	12
<i>Conséquences de la mutation Sp2H</i>	12
5.2. Homologie avec l'homme.....	13
5.2.1. <u>Le syndrome de Waardenburg</u>	13
5.2.2. <u>Le gène HuP-2</u>	13
6. Méthodes de recherche	14
6.1. Le clonage soustractif.....	14
6.1.1. <u>Principes</u>	14
6.1.2. <u>Techniques</u>	14
6.2. Différentes méthodes.....	15
6.2.1. <u>Le criblage différentiel</u>	15
6.2.2. <u>Hybridation sur hydroxyapatite</u>	16
6.2.3. <u>Soustraction par nucléotides biotynylés</u>	16
6.2.4. <u>Analyse de Représentation Différentielle</u>	16
6.2.5. <u>Les billes magnétiques</u>	16
<i>Principe</i>	17
<i>Expériences déjà réalisées</i>	17
Validation.....	17
7. But du mémoire	17

<u>B. Matériel et méthodes.</u>	19
1. Les souris.....	19
1.1. Souche.....	19
1.2. Elevage.....	19
2. Souches et plasmides.....	19
2.1. Souche bactérienne.....	19
<u>2.1.1. Le géotype</u>	19
<u>2.1.2. Test blanc/bleu</u>	20
2.2. Le plasmide.....	20
2.3. Milieux de culture.....	21
<u>2.3.1. Milieu LB liquide</u> :.....	21
<u>2.3.2. Milieu LB solide</u> :.....	21
2.4. La transformation bactérienne.....	21
3. Techniques couramment utilisées.....	22
3.1. Digestion enzymatique.....	22
<u>3.1.1. Restriction</u>	22
<u>3.1.2. Ligation</u>	23
<u>3.1.3. Déphosphorylation</u>	23
3.2. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	24
<u>3.2.1. Généralités</u>	24
<u>3.2.2. Pour l'ARN</u>	24
<u>3.2.3. Extraction d'une bande</u>	25
3.3. Purification d'acides nucléiques.....	25
<u>3.3.1. Matrice d'affinité</u>	25
<u>3.3.2. Phénol-chloroforme</u>	26
3.4. Random priming.....	26
3.5. Quantification spectrophotométrique.....	27
<u>3.5.1. ADN</u>	27
<u>3.5.2. ARN</u>	27
4. Extraction d'ADN.....	28
4.1. ADN génomique.....	28
4.2. ADN plasmidique.....	29
5. Extraction d'ARN.....	29
5.1. Extraction proprement dite de l'ARN.....	29
5.2. Isolation d'ARNm suivie de la synthèse d'ADNc double brin.....	30
5.3. ADNc sur billes magnétiques pour soustraction.....	31
6. Techniques d'hybridation avec sondes radioactives.....	32

6.1. Les sondes	32
6.2. Southern	32
6.3. Dot blotting.....	33
6.4. Hybridation et lavages.....	34
7. Polymerase Chain Reaction (PCR).....	34
7.1. Principe	34
7.2. Aspects techniques.....	35
7.3. Intérêt et applications.....	36
8. Soustraction sur billes magnétiques.....	36
<u>C. Résultats</u>	41
1. Elevage.....	41
2. Génotypage.....	41
2.1. Méthodologie	41
2.1.1. Méthode par extraction d'ADNg.....	42
2.1.2. Méthode à partir d'ADNc	42
2.2 Résultats.....	42
3. Mise en évidence d'une différence d'expression entre un embryon sauvage (+/+) et un splotch (Sp/Sp)	43
3.1. Contrôle positif de la méthode.....	43
3.2. Obtention du matériel	44
3.2. Premier cycle de soustraction.....	44
3.2.1. Expérience	44
3.2.2. Résultats	45
3.3. Deuxième cycle de soustraction.....	45
3.3.1. Expérience	45
3.3.2. Résultats	45
4. Clonage du produit de soustraction	46
4.1. Restriction	46
4.2. Ligation.....	46
4.3. Transformation.....	46
4.4. Test blanc/bleu.....	47
4.6. Dot blot	47
<u>D. Discussion et conclusion générale</u>	50
<u>E. Références bibliographiques</u>	52

INTRODUCTION.

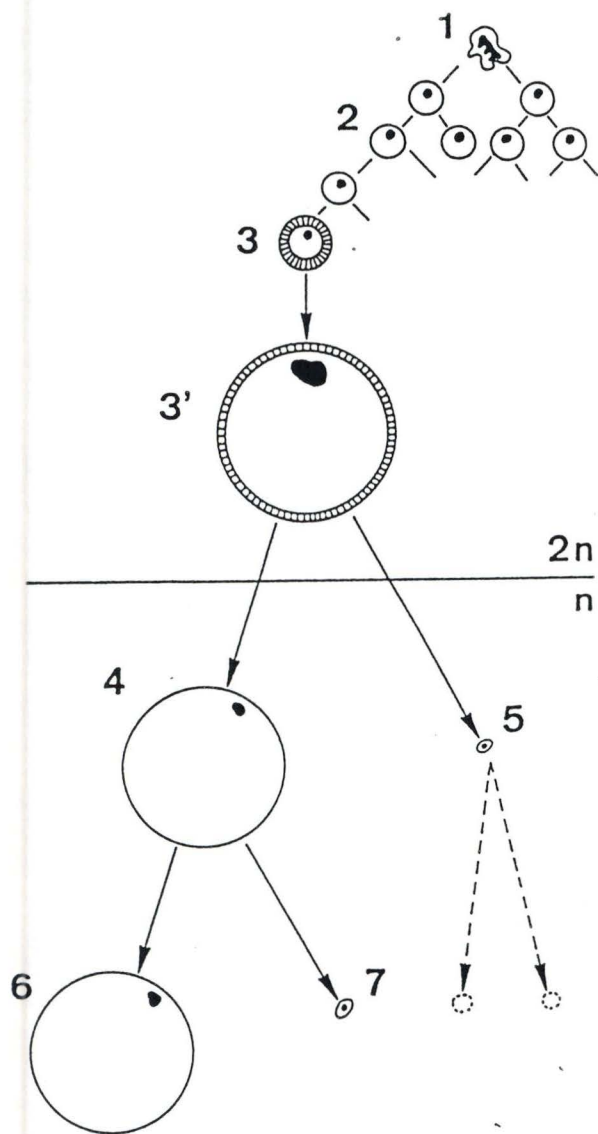
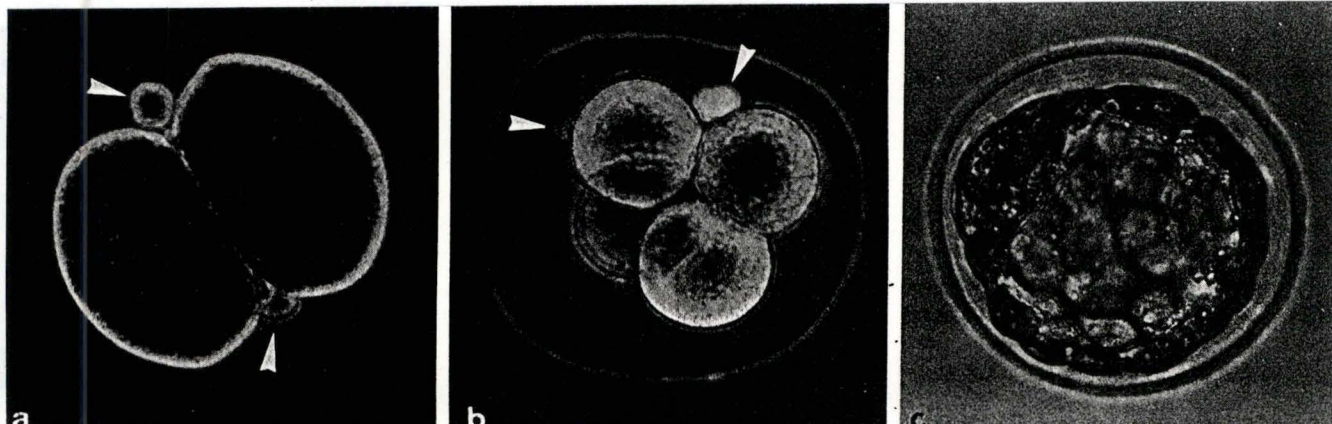


Figure 1.1 : L'oogénèse.

- (1) cellules germinales;
- (2) oogonies
- (3) oocyte de 1^{er} ordre
- (3') follicule : oocyte de 1^{er} ordre entouré de cellules non germinale avant la libération de l'oocyte de 2nd ordre
- (4) oocyte de 2nd ordre
- (5) 1^{er} globule polaire
- (6) ootide
- (7) 2nd globule polaire.

Figure 1.2 : Segmentation de l'oeuf de souris (100x). (Masson, 1980)

(a) stade 2 cellules; (b) stade 4; (c) jeune blastule; flèches : globules polaires.



A. Introduction.

1. Le développement embryonnaire chez la souris

Les embryologistes sont capables, aujourd'hui, de décrire avec précision comment un animal se développe à partir d'un oeuf. Cependant, très peu d'éléments sont connus quant aux mécanismes moléculaires qui président au déroulement harmonieux de cette histoire extraordinaire. L'embryologie moléculaire est une science jeune et son champ d'investigation est immense et fascinant.

Alors que la fécondation se produit tantôt dans l'eau, tantôt dans les voies génitales de la femelle, l'embryogenèse se déroule en milieu aqueux ou terrestre, à l'abri d'une coquille ou dans le corps de la mère.

Le développement embryonnaire présente des caractères qui sont à la fois communs et originaux à toutes les classes de vertébrés (Slack, 1985).

Ainsi, si nous considérons le modèle de la souris; nous constatons que ses embryons, comme ceux de tous les vertébrés, possèdent un territoire organisateur, le cordon mésoderme. Une partie de celui-ci induira la formation précoce d'une ébauche nerveuse dorsale dont la masse antérieure produit le cerveau alors qu'une autre préside à la formation des ébauches vertébrales.

Avant d'étudier les mécanismes de développement du système nerveux murin, nous allons aborder les différentes étapes nécessaires à la formation d'un organisme mammiféré.

L'oogenèse : Au cours de la première division méiotique, l'oocyte sort du follicule et produit deux cellules tout à fait inégales : l'oocyte de deuxième ordre et le premier globule polaire. Ces deux cellules sont haploïdes. Cette division réductionnelle est suivie d'une deuxième division, équationnelle pour les chromosomes et très inégale pour le cytoplasme. Il en résulte un ootide haploïde et un second globule polaire abortif. C'est sous la forme d'oocyte de deuxième ordre, haploïde, qu'est libéré l'oeuf (fig. 1.1).

La fécondation : chaque oeuf (oocyte de deuxième ordre) fusionne avec un seul spermatozoïde qui injecte son noyau dans l'ovocyte. L'oeuf répond par l'émission du second globule polaire suite à la deuxième division. La fusion des deux noyaux haploïdes, l'un correspondant à l'ootide, l'autre provenant du spermatozoïde, produit un zygote diploïde.

La segmentation : elle consiste en une succession de divisions mitotiques qui transforment l'oeuf fécondé en un embryon formé de plusieurs centaines de cellules, le blastomère (fig. 1.2). Cette phase libre est très longue chez les mammifères par rapport à la durée de segmentation chez les

Figure 1.3 : A : Blastocyste de souris (100x). (Masson, 1980)

B : Schéma (1) ectophylle (= ectoderme primitif); (2) entophylle (= endoderme primitif); (be) bouton embryonnaire; (tr) trophoctoderme.

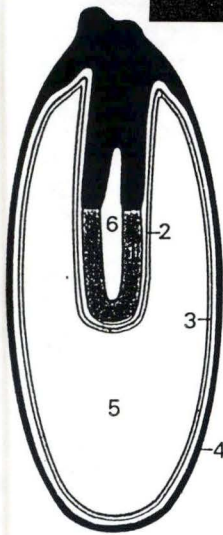
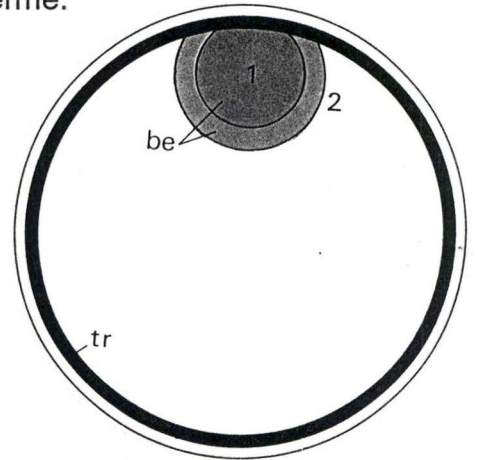
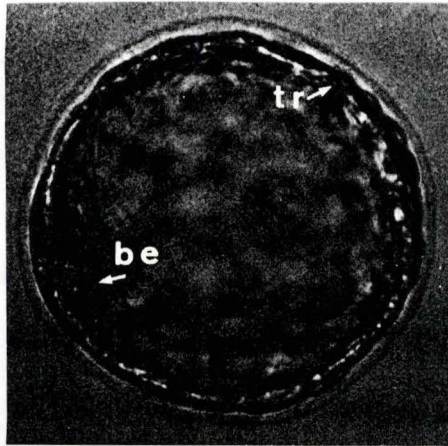


Figure 1.4 : Schéma d'un ovocylindre de souris.

(1) ectophylle; (2) endoderme viscéral; (3) endoderme pariétal; (4) trophoctoblaste; (5) lécithocèle; (6) fente pré-amniotique. (Masson, 1980)

Figure 1.5 : Schéma de la formation du céleme extra-embryonnaire et de la cavité amniotique. (Masson, 1980)

(1) céleme extraemb.;
(2) cavité amniotique;
(3) amnios;
(4) allantoïde;
(5) embryon;
(6) lécithocèle.

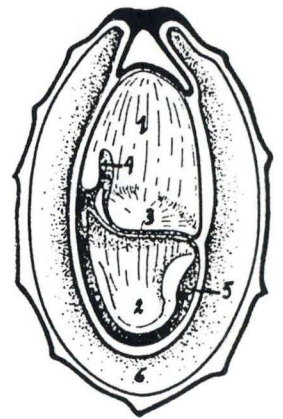


Figure 1.6 : Principaux types de placentas.

(1) schéma du degré d'érosion de l'endomètre par les villosités du placenta; (2) type histologique correspondants; (3) et (4) types anatomiques de placentas; (5) ordres de mammifère. (Masson, 1980)

1	2	3	4	5
	placenta épithelio-chorial	 cf. fig. 189a	placenta diffus	Pachydermes Cétacés Equidés Porcins
	placenta conjunctivo-chorial	 cf. fig. 189b	placenta cotylédonné	Ruminants
	placenta endothelio-chorial	 cf. fig. 189c	placenta zonaire	Carnivores
	placenta hémochorial	 cf. fig. 189d	placenta discoIdéal	Insectivores Chéiroptères Rongeurs Primates.

autres classes de vertébrés (environ un jour). Elle dure quatre jours et demi chez la souris.

En fin de segmentation, il s'est formé une blastula particulière, propre aux mammifères, le blastocyste. On y distingue un feuillet périphérique, le trophoctoderme et le bouton embryonnaire qui produira l'embryon et les annexes (fig. 1.3 A et B).

L'implantation : la fin de la segmentation coïncide avec l'arrivée du germe dans la cavité utérine. C'est l'éclosion ainsi que l'implantation sous la forme d'ovocylindre, stade typique de la souris. Le bouton embryonnaire et son pédoncule trophoctodermique s'allongent tout en devenant creux (fig. 1.4). L'entophylle s'étale sur tout le trophoctoderme et prend le nom de trophoctoblaste. La cavité est entièrement limitée par de l'endoderme entophyllien.

Les annexes : cette formation est particulièrement curieuse chez la souris. En fait, l'ectophylle forme deux cavités superposées, le coelome extra embryonnaire et la cavité amniotique, séparées par l'amnios (fig. 1.5). Le plancher de la cavité amniotique est constitué par l'embryon proprement dit, en forme de cupule. Son extrémité postérieure émet un diverticule, l'ébauche de l'allantoïde. La croissance de l'embryon provoque une brusque inversion de courbure. Celle-ci commence par la région céphalique. L'embryon s'enfonce dans la cavité amniotique qui à son tour pénètre dans le coelome extra embryonnaire. L'ensemble est entouré du lécithocèle. L'enveloppe extérieure du germe étant le chorion.

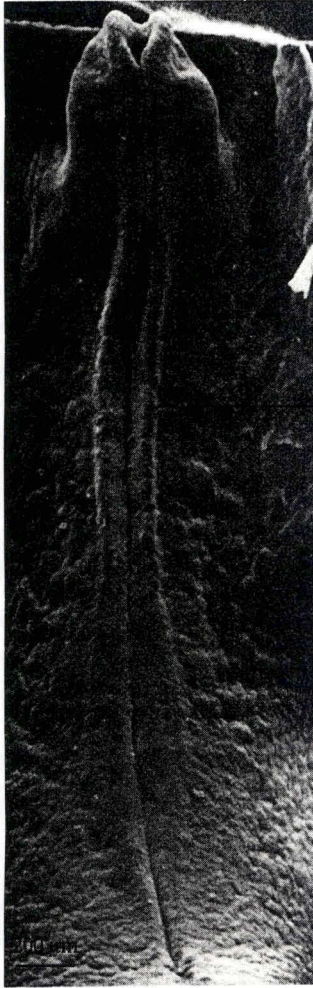
Le placenta : c'est dans l'endomètre de l'utérus que s'implante l'embryon et c'est là que se constitue le placenta. L'embryon y est relié via le cordon ombilical. Le placenta "foetal" dérive du trophoctoblaste et du mésoderme allantoïdien. Les tissus de l'endomètre qui sont entrelacés avec les villosités foetales constituent le placenta "maternel". On distingue aussi plusieurs types de placentas selon la nature du tissu maternel qui est en contact avec le chorion (fig. 1.6). Chez la souris ainsi que chez l'homme (rongeurs et primates), il s'agit d'un placenta hémochorial discoïdal.

L'embryon : la formation de l'embryon comprend trois stades.

Gastrulation : commence lorsque la cavité amniotique se sépare du coelome extra embryonnaire. Elle s'effectue le long d'une ligne primitive.

Neurulation : est contemporaine de l'inversion de l'embryon. Elle commence dans la région céphalique, alors que la ligne primitive régresse dans la partie postérieure de l'embryon. Les bords de l'ébauche cérébrale sont très développés alors que la gouttière neurale commence seulement à se creuser dans la partie plus postérieure (fig. 1.7).

Anterior



— Neural fold

Posterior

Figure 1.7 : Neurulation.
SEM d'un embryon durant le processus de neurulation. Dans la partie antérieure, dans la région de la tête, les crêtes neurales ont déjà fusionnés alors que dans la partie postérieure, le plateau neural vient à peine d'être formé. (Browder, 1991)

Métamérisation : contemporaine de ces événements, elle produit des somites.

Chez la souris, à neuf jours, les régions céphalique, troncale et caudale sont bien modelées. Le tube neural est toujours largement ouvert dans la région postérieure.

A dix jours, cette ouverture sera rétrécie au neuropore postérieur. L'embryon mesure alors de trois à quatre millimètres.

A onze jours, les bourgeons des membres sont bien apparents, ainsi que celui de la queue.

A quatorze jours, les somites ne sont plus visibles que dans la queue. L'embryon a déjà l'aspect d'un petit adulte, c'est un fœtus de onze à douze millimètres. L'extrémité des membres présente des doigts bien individualisés, l'histogénèse est en pleine évolution et la formation des vertèbres étrangle peu à peu la corde qui sera résiduelle le vingtième jour après la fécondation, c'est-à-dire à la naissance.

2. Le système nerveux

Après la gastrulation, l'ectoderme enveloppant l'embryon se sépare en trois populations de cellules à devenir tout à fait différents. L'ectoderme se divise ainsi en épiderme primaire, ectoderme neural (qui comprend le SNC) et crête neurale. A partir de cette dernière se formera une partie du système nerveux périphérique ainsi qu'une variété de cellules non nerveuses. Ce partage a lieu lors de la formation et du déplacement du tube neural dans le processus appelé neurulation.

Le développement du système nerveux des vertébrés (dont la formation du tube neural) requiert un processus permettant aux cellules de la plaque précordale d'acquiescer de nouvelles potentialités à la suite d'un contact avec les cellules ectodermiques non différenciées (cellules inductrices). Il s'agit de l'induction embryonnaire*. Ce même développement nécessite la détermination des axes dorso - ventral et antéro - postérieur. Récemment il fut rapporté que des facteurs diffusibles de transcription tel HNF-3 β * sont exprimés très tôt par les cellules primitives de la corde, la corde et la plaque précordale durant le développement de la souris (Sasaki & Hogan, 1993). Ces facteurs diffusibles interviennent dans la formation du tube neural (Sasaki & Hogan, 1994; Roelink, 1994) qui donnera la colonne vertébrale dans sa partie postérieure et le cerveau dans sa partie antérieure.

* Le processus semble dû à la présence de substances de nature protéique, capables d'activer l'ensemble des gènes de structure permettant la différenciation cellulaire.

* Les protéines de la famille de gène HNF-3 β ont un domaine de liaison avec le DNA bien conservé, ce domaine étant un variant du modèle hélice-tournant-hélice (Sasaki, 1994).

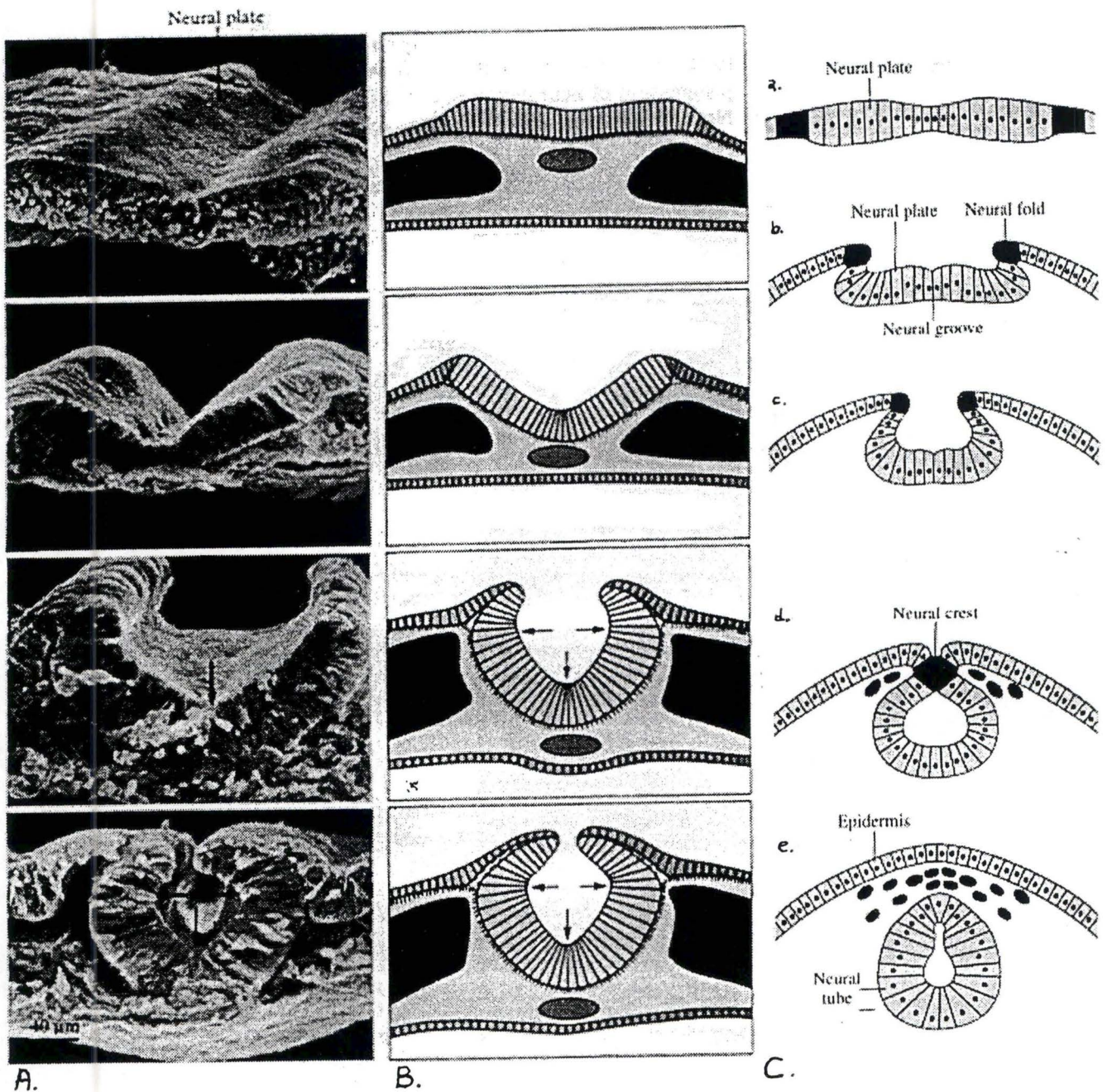


Figure 2.1 : Neurulation. Section transversale d'un embryon durant les différents stades du processus. A: SEM de la surface aux différents stades de la neurulation. B : Schéma représentant ces différents stades. (a) Initialement, l'ectoderme dorsal forme un fin plateau (neural plate), qui est en continuité avec l'ectoderme épidermique. (b) et (c) Les côtés du plateau se soulèvent alors pour former les crêtes neurales (Neural fold). (d) Les crêtes se rejoignent et fusionnent à leur sommet. C : (e) et (f) Après la fusion, une population de cellules non-cohésives émigrent de la crête. (Photo : Browder, 1991)

2.1. Développement du tube neural

L'aplatissement et l'épaississement de l'ectoderme dorsal pour former le plateau cordal indique le début de la neurulation (fig. 2.1). Les bords du plateau cordal commencent alors à croître pour former les crêtes neurales et une dépression appelée gouttière neurale. Les crêtes finissent par se rejoindre et fusionner pour former le tube neural. Lors de la fermeture, les cellules de ces crêtes vont migrer (fig. 2.2) latéralement et ventralement dans l'organisme et former une multitude de types cellulaires.

Ainsi, les cellules de la crête neurale, au niveau céphalique, sont connues pour donner naissance à une partie des ganglions et nerfs crâniens, à des cellules pigmentaires, à une partie du tissu conjonctif (derme de la face, oeil, ...) et une partie du squelette de la tête. Dans la partie thoracique, les cellules de la crête neurale donnent naissance aux systèmes nerveux périphériques (parasymphatique et orthosymphatique), au tissu conjonctif, à des cellules endocriniennes et à des cellules pigmentaires tels que les mélanocytes de la peau et des poils (cfr. le phénotype "Splotch" §5.1.2.). (fig. 5.3).

2.2. Développement du système nerveux central

La différenciation du tube neural dans les différentes régions du SNC a lieu simultanément à trois niveaux.

- Au niveau anatomique, le tube neural se contracte pour former les vésicules du cerveau et le cordon médullaire (partie nerveuse de la colonne vertébrale);

- Au niveau tissulaire, les populations de cellules de la crête neurale se réorganisent pour former les différentes régions fonctionnelles du cerveau et du cordon médullaire;

- Finalement, au niveau cellulaire, les cellules neuroépithéliales se différencient pour donner une multitude de types cellulaires.

Avant que la neurulation ne soit achevée, la portion antérieure du tube neural peut déjà être distinguée de la postérieure par des renflements correspondant aux trois compartiments primitifs du cerveau, le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale (fig. 2.3).

Plus tard, ceux-ci se différencient en cinq compartiments : le télencéphale, le diencephale, le mésencéphale, le métencéphale et le myélocéphale.

Le télencéphale va donner naissance aux hémisphères cérébraux et aux lobes olfactifs. Le métencéphale formera le cervelet et le pont (fig. 2.3).

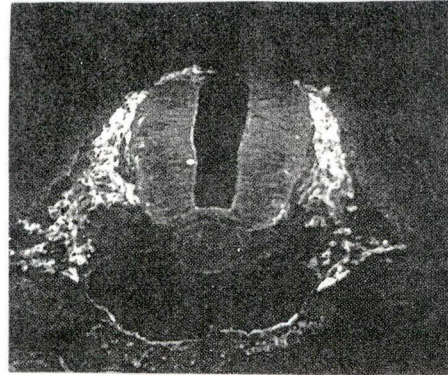
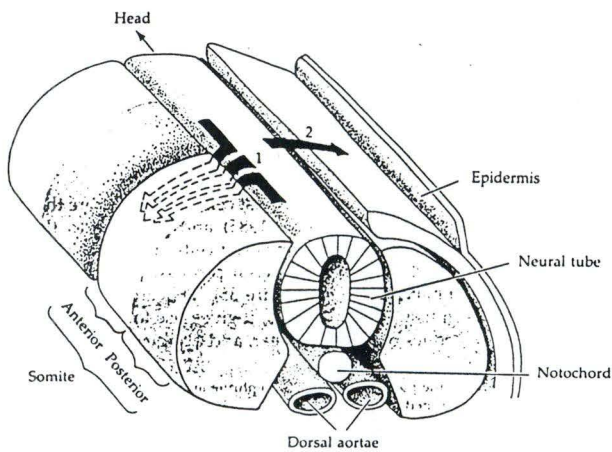


Figure 2.2 : A :Migration des cellules de la crête neural. B : Ces cellules peuvent être suivies dans leur migration en les ciblant avec un anticorps monoclonal fluorescent. (Scott, 1991)

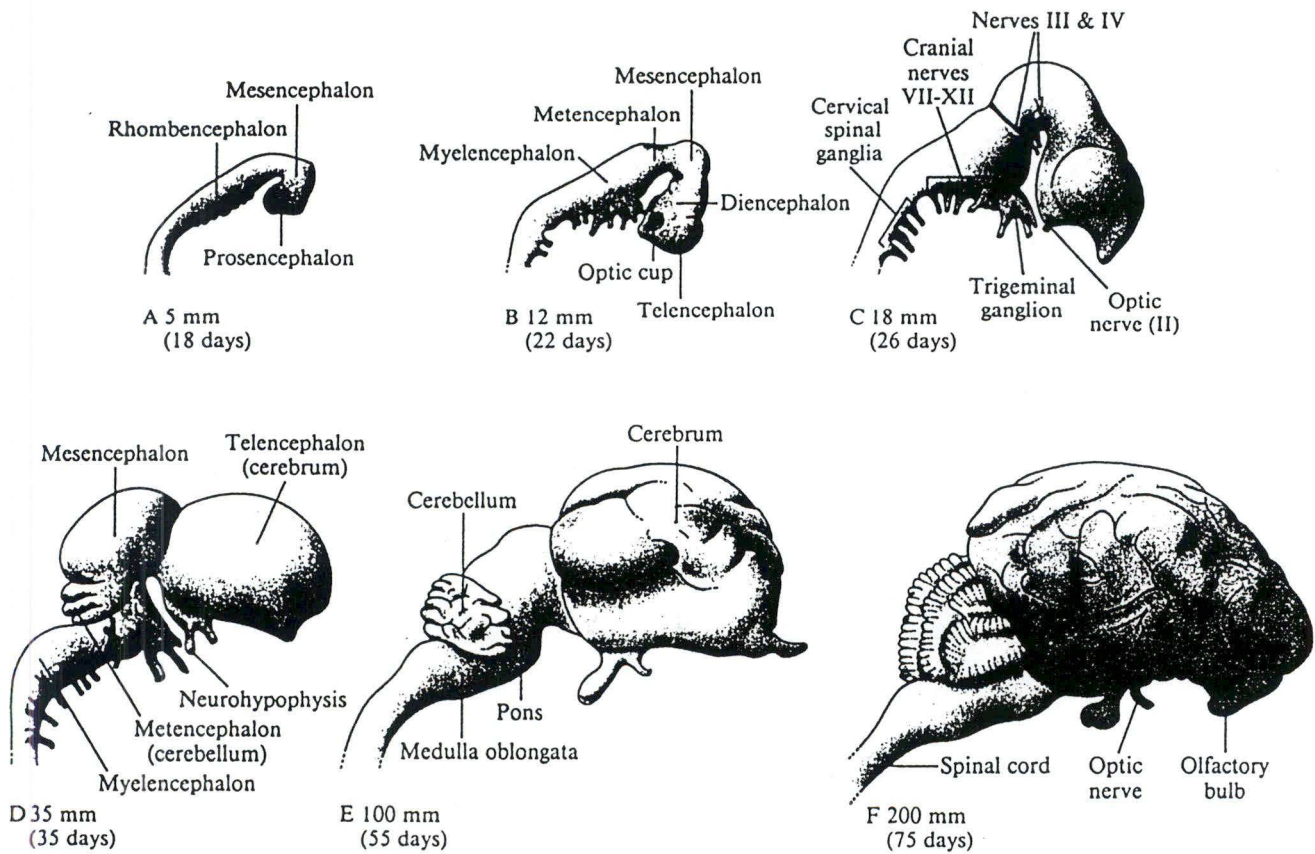


Figure 2.3 : Ce diagramme du développement du cerveau de cochon montre les différences dans la croissance relative des différentes régions du cerveau. (Browder, 1991)

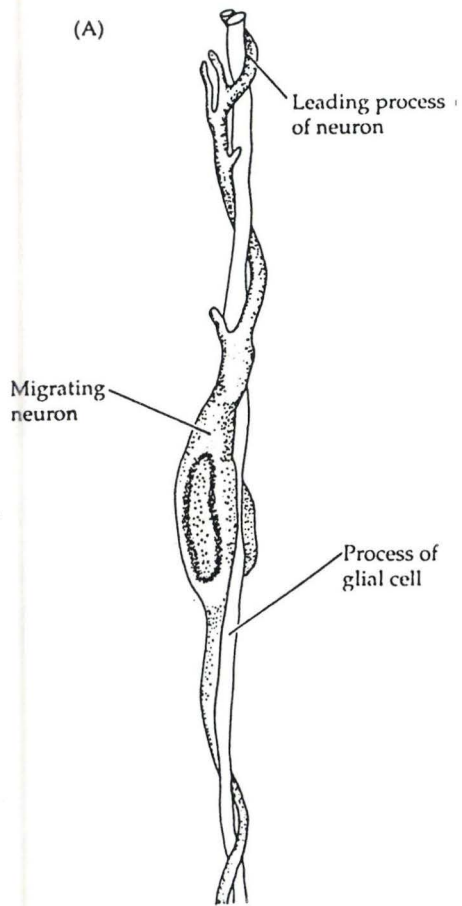
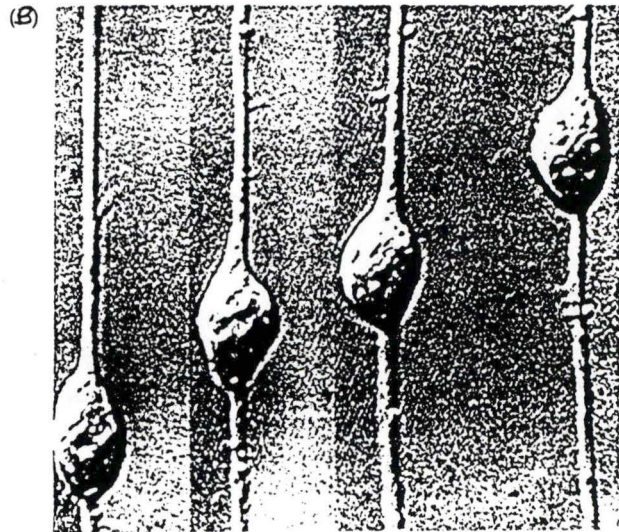


Figure 2.4 : Migration des cellules nerveuses aidée par les cellules de la glie. A : Schéma d'un neurone cortical migrant sur une excroissance d'une cellule gliale. B : Migration d'un neurone cérébral. Cette migration peut atteindre la vitesse de $60\mu\text{m}$ par heure.



La croissance du système nerveux fait appel à trois mécanismes complémentaires :

La prolifération des cellules nerveuses à partir de précurseurs provenant de la paroi du tube neural. Cette prolifération cesse rapidement, au treizième jour de gestation chez la souris.

La migration des cellules nerveuses aidée par les cellules de la glie (oligodendrocytes, astrocytes...). Cette migration est généralement radiale mais peut être aussi tangentielle dans certains cas. Le mécanisme d'interaction glie - neurone (appelé glial monorail) est encore inconnu* (fig. 2.4)

La différenciation des cellules nerveuses embryonnaires en neurones par l'apparition des axones, dendrites et connections entre cellules (Browder, 1991).

3. Génétique du développement

La formation d'un organisme complexe éveille la curiosité de l'homme depuis des siècles. La question «comment un oeuf apparemment sans forme peut-il évoluer vers un nouvel individu» est vite devenue primordiale pour les philosophes et les scientifiques.

La croissance, la division et la transformation d'un oeuf fécondé en un organisme composé voire complexe nécessite un programme élaboré contrôlant l'expression génétique de chaque cellule. Un tel programme doit enfin permettre d'assurer non seulement la spécialisation des cellules mais également leurs mouvements et leurs divisions, opérations déterminantes dans la conception de la forme d'un embryon. En effet, chez un embryon, la mise en place d'organes et de structures caractéristiques nécessite le déplacement et la division de cellules appropriées alors que d'autres, parfois voisines des premières, ne le font pas.

Lors de l'étude des cellules eucaryotes, les biologistes ont souvent perçu celles-ci comme des entités individuelles. Actuellement, de nombreuses recherches sont encore centrées sur ces cellules mais comme constituants d'organismes pluricellulaires en cours de développement.

Pour le biologiste moléculaire, le principal problème posé par l'embryogenèse se situe à un tout autre niveau. Il s'agit de la relation qui existe entre le contrôle de l'expression génétique, dans des types cellulaires particuliers, et les événements significatifs de la croissance des cellules, de

* Par exemple : une mauvaise migration des cellules occasionne une répartition anarchique des différentes couches cellulaires du cortex chez le mutant "reeler".

leurs divisions, de leurs mouvements ainsi que de leur différenciation de cellules pluripotentes en cellules spécialisées.

Il existe en fait deux centres d'intérêts aux recherches sur le développement :

- élaborer un modèle des mécanismes du développement et mettre en évidence les gènes le régulant;
- prévoir, prévenir et guérir les anomalies survenant lors de la grossesse et durant toute la vie.

Pour étudier le développement, les modèles animaux représentent un matériel de premier choix, chaque organisme ayant ses avantages et ses inconvénients.

4. Les différents modèles

Voici une liste des différents modèles employés le plus couramment.

4.1. Les invertébrés

- **L'oursin** qui a surtout servi à l'étude de l'embryogenèse est étudié depuis plus d'un siècle. C'est un des premiers invertébrés chez lequel les mouvements des cellules durant la gastrulation ont été analysés par des méthodes expérimentales modernes.

- La **drosophile** est le modèle fondateur de la génétique du développement (Nüsslein-Volhard, 1979). C'est en l'étudiant, via la technique de saturation du génome en mutation, qu'ont été trouvés les gènes HOX (McGinnis, 1984; Couly, 1994). Ces gènes sont très conservés entre espèces et codent tous pour un motif appelé homéobox. Ce motif qui ressemble au domaine "hélice - tour - hélice" des protéines régulatrices procaryotes, est un domaine de fixation spécifique sur certaines séquences d'ADN* . Furent également découverts les gènes à effet maternel (gènes du génome maternel

* Après la découverte des complexes Hox, on a tout d'abord pensé que ces gènes déterminaient toujours des structures répétitives, segments chez les insectes, rhombomères et vertèbres chez les vertébrés. Mais cette interprétation s'accorde mal à l'existence de complexes Hox observés chez des organismes comme l'hydre ou les nématodes où l'on ne trouve pas de structures répétitives. En fait, il apparaît que tous les animaux possèdent un complexe Hox. Celui-ci devait donc être déjà en place il y a un milliard d'années chez l'ancêtre commun à tous les animaux multicellulaires vivant aujourd'hui. On admet à présent que, plutôt que des structures spécifiques, le complexe Hox détermine les positions relatives des cellules au sein de l'organisme. Il y a vingt-cinq ans déjà, l'existence d'un tel système définissant des "valeurs de position", que savaient interpréter les cellules, avait été postulée par Lewis Wolpert . On aurait bien amusé les embryologistes et les généticiens si on leur avait dit, il y a vingt ans, que les mêmes gènes servent à installer le plan du corps chez une mouche, chez un nématode ou chez un mammifère. Car si l'on savait les constituants cellulaires très conservés à travers l'évolution, on n'avait aucune raison de croire qu'il en était de même pour les gènes de régulation (Jacob, 1994).

exclusivement traduits durant l'oogenèse) ainsi que les gènes zygotiques (gènes transcrits et traduits par le génome de l'embryon).

La drosophile présente plusieurs avantages :

- possibilité de manipuler les œufs en y introduisant des constructions générant des mutants (éléments P mobilisables (Bingham, 1982), ARN antisens, ...)
- une grande simplicité d'élevage,
- une prolificité élevée (cent œufs par jour et par femelle),
- une embryogenèse (neuf jours) ainsi qu'une croissance rapide et surtout,
- une carte génétique connue (Mahowald & Hardy, 1985).

Malheureusement, la drosophile a comme désavantage majeur pour ceux qui s'intéressent aux vertébrés supérieurs, son statut d'invertébré qui lui confère une structure anatomique très différente de la nôtre.

• **Caenorhabditis elegans** :

- la plupart des premières cellules de la larve ainsi que celles qui en dérivent se divisent selon un programme rigoureusement établi (destinée connue et fixée),
- sa transparence en fait un modèle de choix en biologie du développement (Plasterk, 1992).
- récemment des expériences de transgénèse par l'introduction de gènes reporters tels que lacZ, sous le contrôle de promoteurs du développement, sont en de bonne voie (Sasaki & Hogan, 1994).

Ce nématode est en partie à l'origine de la découverte de familles de gènes régulateurs du développement*.

4.2. Les vertébrés

• Le **xénope**, vertébré inférieur, est un amphibien possédant de gros œufs facilitant la micro injection. Il a permis de comprendre le mécanisme de mise en place du cycle de division cellulaire.

• Le poisson **Danio rerio** (zebrafish) est également un vertébré inférieur dont les avantages sont :

- une grande capacité de reproduction (quatre cents œufs par semaine et par femelle).
- la rapidité de l'embryogenèse et du développement (Un œuf donne un alevin libre en vingt-quatre heures et les poissons deviennent adultes en septante jours).
- simple à élever (de l'eau bien oxygénée; à 28,5° Celsius).

* Exemple : Famille des gènes POU : Pit-1 de la souris , Oct-1 de la drosophile et Unc-96 de Caenorhabditis (C.P. Verijzer & P.C. van der Vliet, 1993; Schöeler, 1991).

- transparent lors des deux premières semaines de son développement, dans et hors de l'œuf, ce qui permet d'étudier son anatomie.
- la possibilité d'obtenir des individus haploïdes (Driever, 1994), viables lors des quatre premiers jours du développement. C'est un grand avantage qui élimine les problèmes de dominance / récessivité.
- possibilité d'électroporer de l'ADN dans les œufs de ces poissons (Buono & Linsen, 1994), la micro injection a déjà été employée avec succès (Bayer & Campos-Ortega, 1992).
- carte génétique du Zebrafish (Postelwait, 1994) étudiée à partir de marqueurs anonymes (RADP).

Des efforts importants sont déployés actuellement pour saturer en mutations le génome du zebrafish et ceci au laboratoire de C. Nüsslein-Volhard, afin de dresser un inventaire des mutations du développement chez cet organisme (Kahn, 1994).

Ce modèle exceptionnel a cependant deux défauts non négligeables :

- c'est un vertébré inférieur et son cerveau, plus particulièrement son cortex*, est fort peu développé.
- une stratégie de mutagenèse dirigée, employant par exemple un transposon, n'est pas accessible actuellement car la présence d'un transposon fonctionnel chez le zebrafish n'est pas encore établie.

Par conséquent, il ne convient donc pas pour certaines études, notamment celles qui s'intéressent aux mécanismes du développement et de l'organisation du cortex.

• La **souris**. Ce modèle est employé depuis longtemps pour :

- sa simplicité d'élevage,
- son haut taux de reproduction (une portée allant de trois à douze souriceaux),
- un temps de gestation relativement court (21 jours),
- acquisition de la maturité sexuelle très rapide (après 21 jours),
- la création d'animaux chimériques via la micro injection.
- son état de mammifère au cerveau évolué, permettant des comparaisons plus directes avec l'homme.

Cependant, en tant que mammifère, ses gros désavantages sont que

- l'observation du développement des embryons ne peut pas se faire de manière directe et,
- un génome particulièrement complexe...

* La structure du cortex étant le phénotype permettant de reconnaître les hétérozygotes de certaines maladies du développement (reeler), il est clair qu' un tel modèle ne peut pas être utilisé dans tous les cas.

4.3. L'étude des mutations

Le mutant est un individu qui présente des caractères héréditaires différents de ceux de la majorité de la population à laquelle il appartient. Ce mutant, perçu comme "erreur de la nature" par la société, représente, au yeux du généticien, un trésor. En effet, l'analyse génétique serait impossible sans variants.

L'étude des mutants, dont le phénotype est dû à un mauvais fonctionnement cellulaire, permet de mettre en évidence des gènes. Ce trouble du fonctionnement est dû à des mutations altérant le génome, par modifications, insertions ou délétions de nucléotides.

On étudia avant tout les mutants spontanés (Morgan, 1927) que l'on tentait de faire reproduire. Ensuite avec les nouvelles techniques, ce fut au tour des mutants issus de mutagènes diverses.

5. Notre modèle, la souris Splotch

5.1. Les gènes Pax

Les gènes du développement de la drosophile contiennent des séquences homéos qui se retrouvent d'un gène à l'autre. Du caractère ubiquiste de ces séquences naquit l'idée que des gènes porteurs de séquences similaires pourraient être impliqués dans le développement d'organismes éloignés phylogénétiquement et, en conséquence, que les mécanismes du développement soient communs à des organismes aussi différents qu'une mouche, un nématode ou une souris (Delezoïde, 1993).

Cette conjecture s'est trouvée amplement confirmée en utilisant comme sonde des séquences d'ADN conservées dans les gènes du développement de la drosophile pour cribler des banques d'ADN génomique d'autres espèces.

Nombre de gènes portant ces séquences conservées ont été trouvés chez des organismes d'espèces très éloignées; le cas le mieux représenté étant celui du domaine homéotique (McGinnis, 1984) présent dans les gènes de tous les eucaryotes étudiés jusqu'ici. Cependant, d'autres gènes du développement ont également été découverts en adoptant la même stratégie : c'est le cas d'une famille de huit gènes de la souris isolés sur la base d'une homologie avec le domaine "paired" (Gruss, 1992) trouvé à l'origine dans trois gènes de segmentation de la drosophile, dont le gène "Paired". Aussi ces huit gènes sont-ils appelés gènes Pax (pour "**paired box**").

Actuellement, des gènes de type Pax ont aussi été isolés chez le Zebrafish (Krauss, 1991).

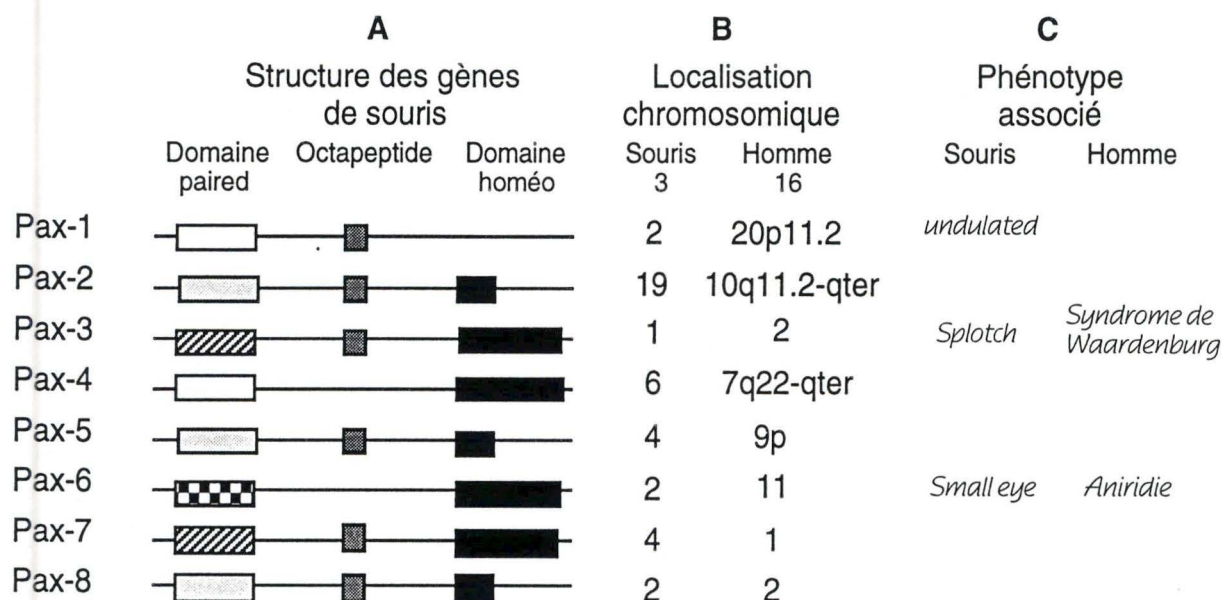


Figure 5.1 : Les gènes Pax. Structure, localisation et phénotypes associés. Les différents dessins des domaines paired indiquant que chaque gène Pax peut être classé dans un sous groupes en fonction des homologies relatives et de la présence de tel ou tel acide aminé à des positions particulières dans ces domaines. Les mutations connues de Pax-3 et Pax-6 sont létales à l'état homozygote.

Gènes	Embryon		Adulte
	période	site*	
<i>Pax-1</i>	j10-17	Mésoderme somitique : sclérotome	Non
<i>Pax-2</i>	j10-18	Rein en développement Tube nerveux, rhombencéphale, vésicule otique, vésicule optique	Non
<i>Pax-3</i>	j8,5-16	Certaines régions du cerveau, partie dorsale du tube nerveux, cellules de la crête neurale Dermomyotome	Non
<i>Pax-4</i>	ND	ND	ND
<i>Pax-5</i>	j10-14	Mesencéphale, tube nerveux Foie fœtal : lignage lymphocytes B	Rate, ganglions, lymphatiques, sang : lignage lymphocytes B Testicule
<i>Pax-6</i>	j8-18	Cerveau, antérieur et postérieur, hypophyse, épithélium olfactif, œil, tube nerveux (zone ventrale)	Non
<i>Pax-7</i>	j8-17	Groupe de cellules dans tout le cerveau, puis limité au mésencéphale, tube neural (zone dorsale) Somites : dermomyotome, myotome, muscle squelettique	Non
<i>Pax-8</i>	A partir de j11,5	Expression transitoire dans tout le tube nerveux et le myélinocéphale (j11,5 à j12,5) Thyroïde et rein en développement	Thyroïde, rein

Figure 5.2 : Tableau des profils d'expression des gènes Pax chez la souris. NO = non déterminé

5.1.1. Une famille de huit gènes

Plusieurs propriétés remarquables communes à l'ensemble des gènes de cette famille en font de bons candidats comme gènes du développement. Propriétés structurales : tous ont en commun un domaine appelé "paired" codant pour un motif protéique de 128 acides aminés, toujours présent dans la partie NH₂-terminale de la protéine et capable de se lier à l'ADN. Tous, sauf Pax-1, possèdent également une séquence apparentée à un domaine homéo (le domaine homéo de type "paired"), tronquée toutefois dans le cas de Pax-2, Pax-5 et Pax-8 (Fig. 5.1). Enfin, excepté Pax-4 et Pax-6, ils contiennent tous, entre les domaines "paired" et homéo, un motif octapeptide conservé (Babinet, 1993). L'analyse de séquence (faisant apparaître la présence de boîtes) suggère, par comparaison avec d'autres gènes dont la fonction est connue et qui possèdent les mêmes boîtes, une fonction "liaison à l'ADN ("DNA-binding") impliquée dans la régulation transcriptionnelle (i.e. facteurs de transcription). Bien que les rôles respectifs des différents domaines des protéines Pax ne soient pas encore élucidés, il a été montré dans plusieurs cas que celles-ci avaient effectivement une activité de stimulation transcriptionnelle*.

L'examen du profil d'expression des différents gènes Pax (fig. 5.2) est également très suggestif de leur implication dans le développement. Tous sauf deux, sont exprimés uniquement pendant l'embryogenèse; tous sauf Pax-1 sont exprimés au cours de la formation du système nerveux. Les gènes Pax s'expriment également en dehors du système nerveux. Ils ont des domaines d'expression visualisables dans les tissus dérivés du mésoderme, notamment les somites et le système excréteur rénal.

Cette expression dans des structures segmentées, rapprochée du fait que les gènes Pax ont été isolés sur base d'une homologie avec les séquences de gènes de drosophiles impliqués dans la segmentation, renforce l'idée d'une conservation fonctionnelle de certains gènes au cours de l'évolution.

Les résultats obtenus par Maulbecker et Gruss (1992) démontrent que les gènes Pax peuvent promouvoir l'oncogénicité dans un tissu de culture cellulaire ainsi que dans la souris. Ils peuvent donc être classifiés comme un nouveau groupe de proto-oncogènes. L'induction de la formation d'une tumeur dépend d'un domaine "paired" fonctionnel mais ne requiert pas la présence d'un homéodomaine. Les gènes qui en plus du domaine "paired"

* L'analyse comparée et détaillée de la structure et de la séquence codante de chacun de ces gènes rend très vraisemblable l'idée qu'ils seraient nés de duplications d'un gène ancestral suivies de divergences des gènes ainsi dupliqués (Walther, 1991).

Figure 5.3 : Tableau représentatif des dérivés de la crête neurale au niveau céphalique.

DÉRIVÉS DE LA CRÊTE NEURALE AU NIVEAU CÉPHALIQUE
<p>Dérivés méséctodermiques céphalique</p> <ul style="list-style-type: none"> • Squelette facial et de la voûte du crâne (os, cartilage) • Odontoblastes (dents) • Paroi arcs aortiques (III^e, IV^e, VI^e) • Derme de la face et du cou, muscles horripilateurs et calvarium • Conjonctif, thymus, parathyroïdes, thyroïde, glandes salivaires et lacrimales, hypophyse • Participation musculature faciale • Sclérotique, muscles ciliaires, choroïde • Méninges prosencéphaliques
<p>Cellules nerveuses</p> <ul style="list-style-type: none"> • Neuroblastes bipolaires (somato-sensible) <ul style="list-style-type: none"> • Ganglions rachidiens • Ganglions des nerfs crâniens (V, VII, X, XI) • Neuroblastes multipolaires
<p>Cellules gliales</p>
<p>Cellules pigmentaires</p>
<p>Cellules endocriniennes et para-endocriniennes</p>

contiennent un homéodomaine intact (Pax-3 et Pax-6) mais aussi ceux comprenant seulement un homéodomaine résiduel (Pax-2 et Pax-8) et ceux contenant un homéodomaine complètement tronqué (Pax-1) sont capables d'induire la transformation de tumeurs dans la souris (fig. 5.1). Le potentiel oncogénique des protéines Pax dépend en fait de la fonction "DNA-binding" du motif paired*. Dès lors, les produits des gènes Pax ne sont pas seulement impliqués dans le contrôle de l'embryogenèse mais pourraient également, si ils sont dérégulés, être impliqués dans la genèse de tumeurs telle que la celle de Wilms (Maulbecker, 1993).

5.1.2. Le gène Pax-3

Les arguments que nous venons d'indiquer militent en faveur de l'implication des gènes Pax dans le développement mais c'est la génétique qui a permis d'apporter une preuve directe pour trois d'entre eux (Pax-1, Pax-3 et Pax-6). En effet la localisation génétique de ceux-ci a fait apparaître qu'ils étaient très liés à des mutations connues chez la souris qui présente des anomalies dans les tissus où ces gènes s'exprimaient (Mancino, 1992). L'analyse moléculaire a ensuite montré que ces mutants possédaient une mutation dans un gène étant à l'origine d'un défaut de migration des cellules de la crête neurale*, notamment les mélanocytes (fig. 5.3).

Les différentes mutations dans Pax-3

Le mutant murin "spotch" (Sp) est un modèle établi pour l'étude des déficiences de formation du tube neural chez l'homme (Copp, 1990). Sp fut identifié au sein d'une colonie de souris comme étant un mutant spontané, et depuis, plusieurs allèles de Sp ont été isolés soit comme mutations spontanées (Sp^d) ou induites (Sp^{r*}, Sp^{1H} et Sp^{2H}). La mutation Sp a été classifié comme semi dominante et a été mappée près de la portion proximale du chromosome 1 de la souris (Epstein, 1991). Les caractéristiques phénotypiques des souris homozygotes porteuses des allèles Sp, Sp^{1H} et Sp^{2H} sont très similaires et comprennent hernies cérébrales, méningocèles et

* La protéine Un-Pax-1, porteuse d'une mutation dans le domaine intervenant dans la liaison au DNA, est aussi déféctueuse pour la formation de tumeurs.

* Il est à noter que l'expression de Pax-3 dans certaines cellules dérivées de la crête neurale et les défauts observés dans ces mêmes cellules chez les mutants murins spotch ou chez les malades atteints du syndrome de Waardenburg suggèrent très fortement un rôle de Pax-3 dans la fonction de ces cellules. A cet égard, Moase et Trasler (1991) ont mis en évidence, chez le mutant spotch, un retard de migration des cellules de la crête neurale. Ils ont en outre mis à jour chez ce mutant des altérations de la synthèse de la protéine d'adhésion N-CAM qui est, comme Pax-3 exprimée fortement dans le tube neural et qui pourrait être impliquée dans le processus de migration cellulaire à partir de la crête neurale. Il est donc tentant de supposer que l'un des rôles de Pax-3 serait de contrôler l'expression de N-CAM.

* Chez Sp^r on observe une délétion complète du gène Pax-3.

spina bifida ainsi qu'un défaut dans la genèse des cellules de la crête neurale. Ces homozygotes survivent approximativement jusqu'au quinzième jour de la gestation. Cela dépend de leur "background" génétique. Tous les hétérozygotes Sp et ses variants alléliques (Sp^{1H} et Sp^{2H}) sont caractérisés par une "tache blanche" sur l'abdomen, la queue, les pattes et la tête, phénotype probablement dû à une absence de migration des mélanocytes à ces endroits. (Douglas, 1991)

La mutation Sp^{2H}

Le clonage de Pax-3 a été effectué à partir d'ADNc d'embryons homozygotes splotch 2H (Sp^{2H}). Celui-ci fut restreint par BamHI et inséré au site correspondant dans le plasmide pGem7ZF', ce qui a permis d'identifier une délétion qui est responsable de la formation d'une protéine privée de toute sa partie COOH-terminale (Douglas, 1991; Epstein, 1993). La mutation Sp^{2H}, classifiée comme semi dominante et correspondant à la mutation originale, est une délétion de 32 nucléotides codant pour le segment alanine 237 - thréonine 248 du polypeptide Pax-3. Cette délétion est comprise dans l'homéodomaine "paired" hautement conservé de la protéine. En fait, Pax-3 est un gène de 2347 pb et la délétion 1010-1043 est responsable d'un changement de phase de lecture faisant apparaître un codon stop (TAG) en position 337 (337^{ème} aa). L'ARNm est entier bien qu'il lui manque de 32 nucléotides. La protéine est quant à elle tronquée.

Conséquences de la mutation Sp^{2H}

Vu la fonction putative de facteur de transcription de cette protéine Pax-3 (transactivatrice), l'expression des gènes sous son contrôle est modifiée. La mutation est classifiée comme semi dominante. Certains gènes qui normalement devraient être exprimés ne le sont peut-être plus et/ou certains gènes qui devraient être réprimés ne le sont peut-être plus; ce qui aurait comme conséquence de perturber le bon déroulement de l'embryogenèse. Si la quantité de protéine Pax-3 est limitante pour le contrôle de l'expression d'un gène, celui-ci, dans le cas d'un hétérozygote, subira les effets de la mutation comme chez l'homozygote mutant. Si par contre, la quantité de protéine Pax-3 n'est pas limitante, deux cas sont possible :

- soit il y a effet quantitatif et les gènes sont alors sousexprimés ou surexprimés.

- soit il n'y a pas d'effet quantitatif et les gènes sont régulés comme chez le sauvage.

L'ensemble de ces données montre que Pax-3 est impliqué de manière déterminante dans certains aspects du développement du tube neural. Cette

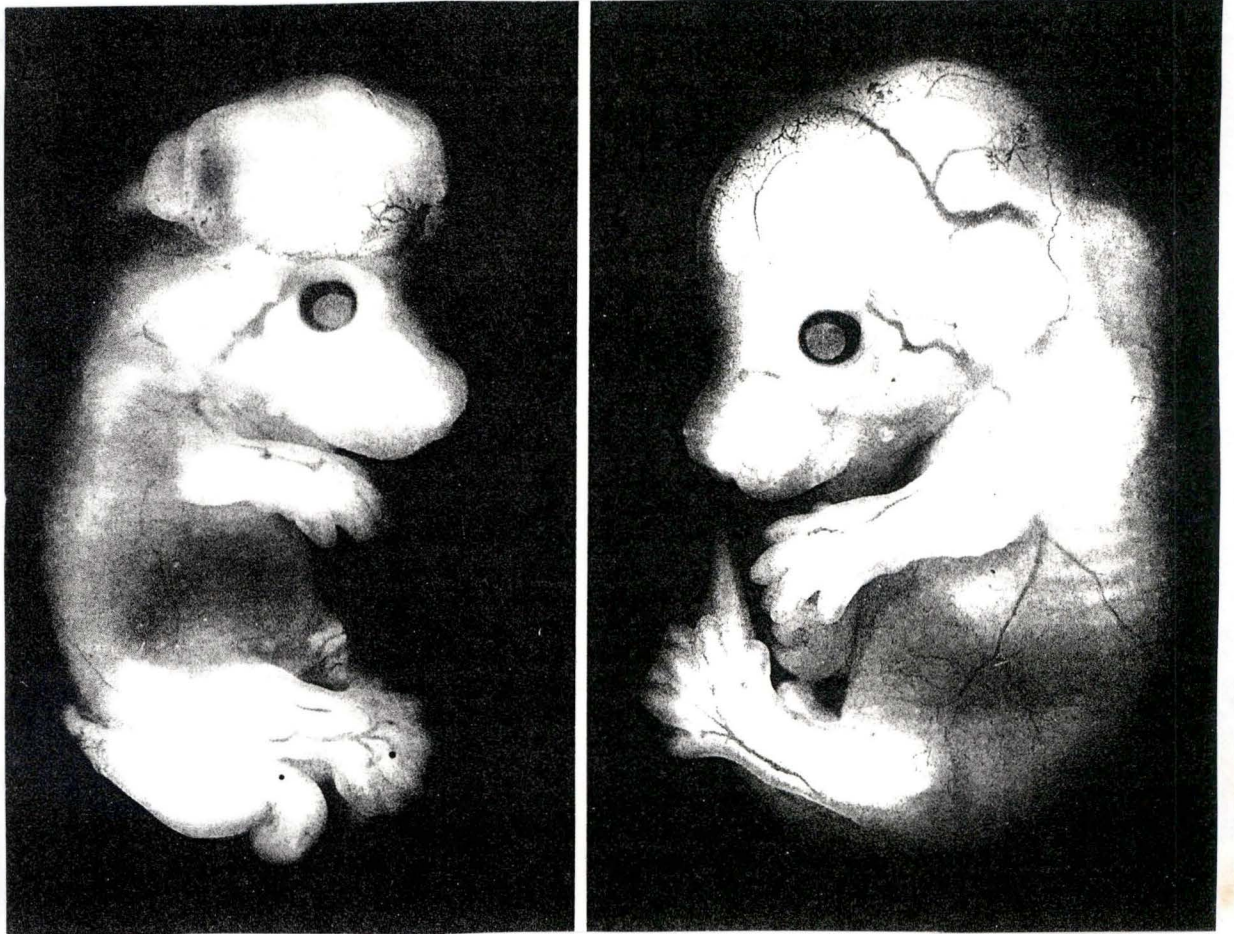


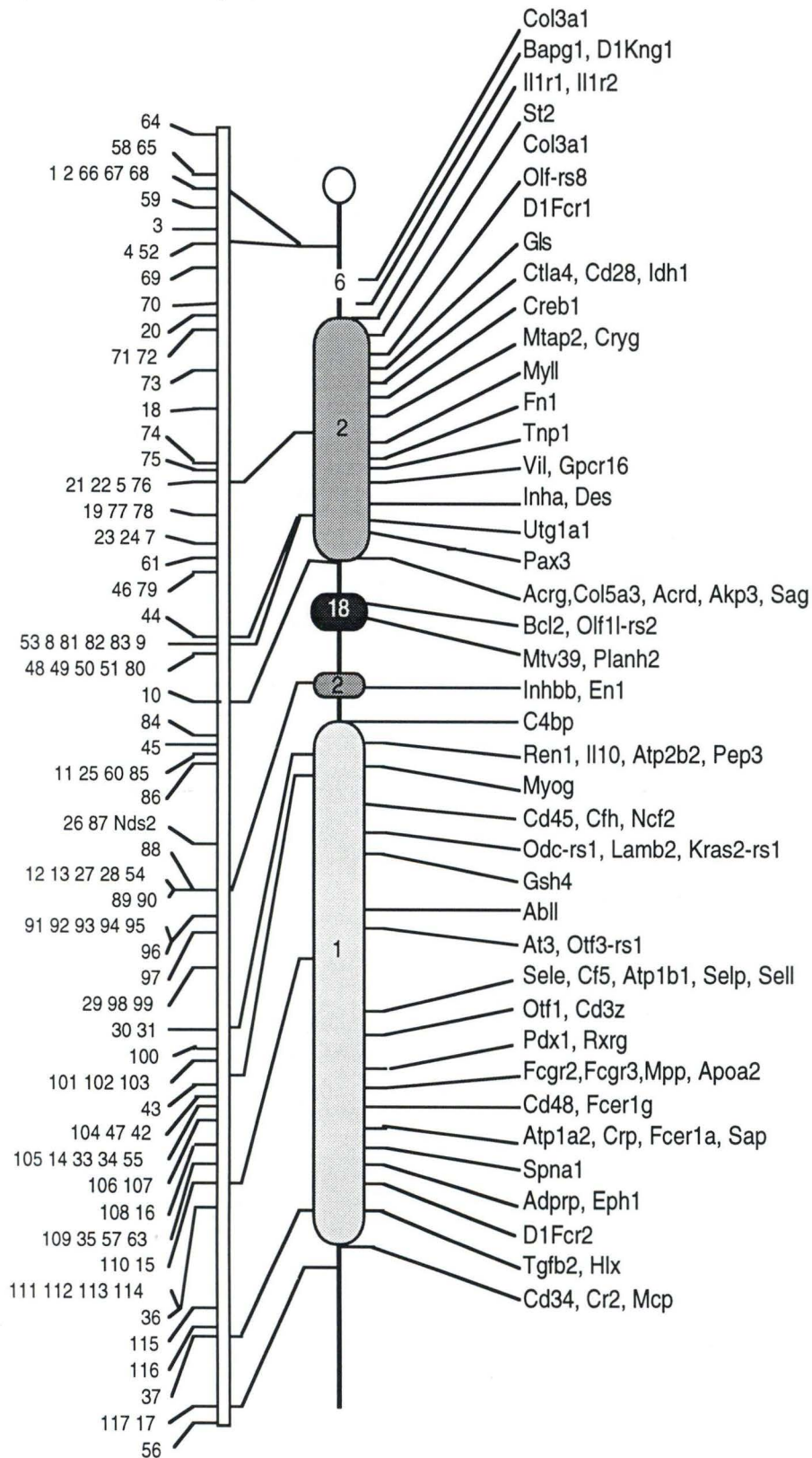
Figure 5.4 : Expression phénotypique de la mutation Sp chez l'homozygote Sp^{2H}/Sp^{2H} . Homozygote Sp^{2H}/Sp^{2H} (gauche) et sauvage (droite) au 14^{ème} jour de gestation. (Douglas, 1991)



Figure 5.5 : Personnes atteintes du syndrome de Waardenburg et présentant une dystopie du canthus. (Tassabehji, 1993)

Figure 5.6 :

Représentation schématique du chromosome 1 de la souris avec la localisation des gènes. L'homologie de la localisation de ces gènes sur les chromosomes humains est montrée via les boîtes colorées. Le numéro de ces boîtes correspond au chromosome humain dont les gènes qui sont représentés font partie.



conclusion est encore renforcée par l'étude génétique et moléculaire du syndrome humain de Waardenburg.

5.2. Homologie avec l'homme

5.2.1. Le syndrome de Waardenburg

Le syndrome de Waardenburg se classe parmi les anomalies pigmentaires de la peau causées par un (ou des) facteur(s) génétique(s). C'est une maladie génétique transmise suivant le modèle autosomique dominant avec une pénétrance et expressivité variable.

Elle est caractérisée par une surdité neuro-sensorielle congénitale associée à des anomalies de la pigmentation : iris hétérochromiques, mèche blanche (atteinte symétrique de la partie centrale du front, de la région ventrale du tronc, des zones médianes des extrémités supérieures et inférieures), ainsi que des défauts mineurs de la face : racine nasale large, une dystropie du canthus (fig. 5.5).

La pathogénie serait due à un défaut de migration des cellules dérivées de la crête neurale, ou la survivance de deux éléments dérivés de cette crête neurale (mélanocytes et cellules nerveuses auditives) ou encore l'échec des mélanoblastes à survivre ou à se différencier* (Harrison, 1990).

5.2.2. Le gène HuP-2

Pax-3 est localisé sur le chromosome 1 (fig. 5.6) de la souris dans une région correspondant à un fragment synténique que l'on trouve sur le bras long du chromosome 2 humain. Il était donc tentant de rechercher la présence dans cette région d'un gène humain de type Pax. Le gène humain HuP-2 contient un domaine paired strictement identique à celui de Pax-3 et constitue probablement son homologue humain (Baldwin, 1992). Plus tard, la cartographie montrait que HuP-2 était dans une région identique à celle où avait été localisé le déterminant génétique du syndrome de Waardenburg. L'analyse de plusieurs familles atteintes de ce syndrome a mis en évidence l'existence, chez les individus porteurs, de mutations dans le gène HuP-2 et plus particulièrement dans le "paired" domaine.

Nos objectifs sont d'utiliser le modèle Spotch pour comprendre par quels mécanismes, un gène peut réguler une étape cruciale dans le développement du tube neural.

* La perte de l'audition est causée par l'absence de mélanocytes des stries vasculaires de la cochlée où ils sont essentiels à la fonction d'audition. Pour la perte de pigmentation de l'iris, elle est d'origine tout à fait différente de l'albinisme où les mélanocytes sont présents mais non fonctionnels, habituellement due à une déficience en tyrosinase.

6. Méthodes de recherche

6.1. Le clonage soustractif

Les techniques de soustraction permettent de mettre en évidence les différences potentielles entre deux génomes ou entre deux bibliothèques d'ADNc.

La discordance entre l'expression de deux tissus (espace - temps - condition du milieu) s'exprime par une différence entre les ARNm de ces tissus. Ceux-ci, une fois récupérés et transformés en ADNc, peuvent servir à une expérience de soustraction.

Ces techniques sur l'ADNc sont utilisées pour l'étude des mécanismes moléculaires du contrôle génétique.

6.1.1. Principes

Une expression différente d'un tissu à l'autre entraîne deux populations d'ARNm différents, comprenant une partie commune, que l'on cherche à soustraire, et des ARNm spécifiques que l'on cherche à mettre en évidence. Dans le cas d'une mutation dans un gène régulateur (soit au niveau de sa séquence régulatrice, soit au niveau de sa partie codante), une expression différente entre mutant et sauvage pour un tissu identique au même moment devrait, en principe, être détectable. Cette différence se caractérise par une inhibition ou une surexpression de certains gènes.

6.1.2. Techniques

L'ADNc soustrayant (contenant les séquences à soustraire) est noté [-] et appelé "driver". L'ADNc soustrait (contenant les séquences recherchées) est noté [+] et appelé "tester".

Les techniques de soustraction sont basées sur quatre notions théoriques.

L'hybridation du "tester" au "driver" qui conduit à trois types de produits :

- le duplex "driver - driver"
- le duplex "tester - tester", molécule recherchée;
- l'hétéroduplex "tester - driver" (qui doit être éliminé).

La quantité de double brin formé dépendant de la concentration initiale en ADN et du temps. La formation des hybrides est directement proportionnelle à la concentration en driver, ce qui explique qu'elle soit plus rapide que la formation de l'homoduplex tester. L'efficacité de la réaction dépend de plusieurs facteurs physico-chimiques tels que la température, le pH, la concentration en ions monovalents et la présence de solvants organiques.

L'*effet de masse* du "driver". L'excès de "driver" conduit à l'épuisement des séquences communes contenues dans le "tester" (matériel contenant les séquences à isoler) et permet de faire ressortir les séquences spécifiques au "tester". Plus l'excès en "driver" est important, plus on a de chances de soustraire les séquences rares mais communes aux deux. Cet effet de masse augmente la sensibilité du test. La soustraction s'effectue généralement en plusieurs cycles de manière à enrichir de plus en plus le tester en fragments d'intérêts.

L'*enrichissement cinétique*. Si une population d'ADNc ("tester") est enrichie n fois en séquences cibles, après avoir été dénaturées puis renaturées les séquences cibles sous forme double brins se retrouvent n^2 fois enrichies. Ce qui signifie que pour un premier enrichissement d'un facteur 10, on aura enrichi 100 fois plus (Wieland, 1990).

La *discrimination* "driver" et "tester" est importante. Il doit être possible de discriminer ces produits afin de permettre une élimination du "driver" et des hybrides à soustraire, ce qui aboutit à un enrichissement en séquences cibles du "tester".

6.2. Différentes méthodes

Les méthodes de soustraction sont apparues vers le milieu des années 1980, elles se sont diversifiées et complexifiées, augmentant leur efficacité, avec le temps.

6.2.1. Le criblage différentiel

Ce n'est pas à proprement parler une méthode de soustraction. C'est une méthode qui permet de trouver une différence d'expression. En pratique, on synthétise une sonde marquée à partir de l'ADNc total d'un tissu et on la dirige vers une membrane sur laquelle se trouve une banque d'ADNc d'un autre tissu. De cette manière, les clones différents ne s'allument pas.

Le nombre de clones (n) nécessaires pour obtenir avec la probabilité P un clone particulier dépend de l'abondance relative de l'ADN recherché (α). Il peut être déduit de la relation :

$$n = \log(1 - P) / \log(1 - \alpha)$$

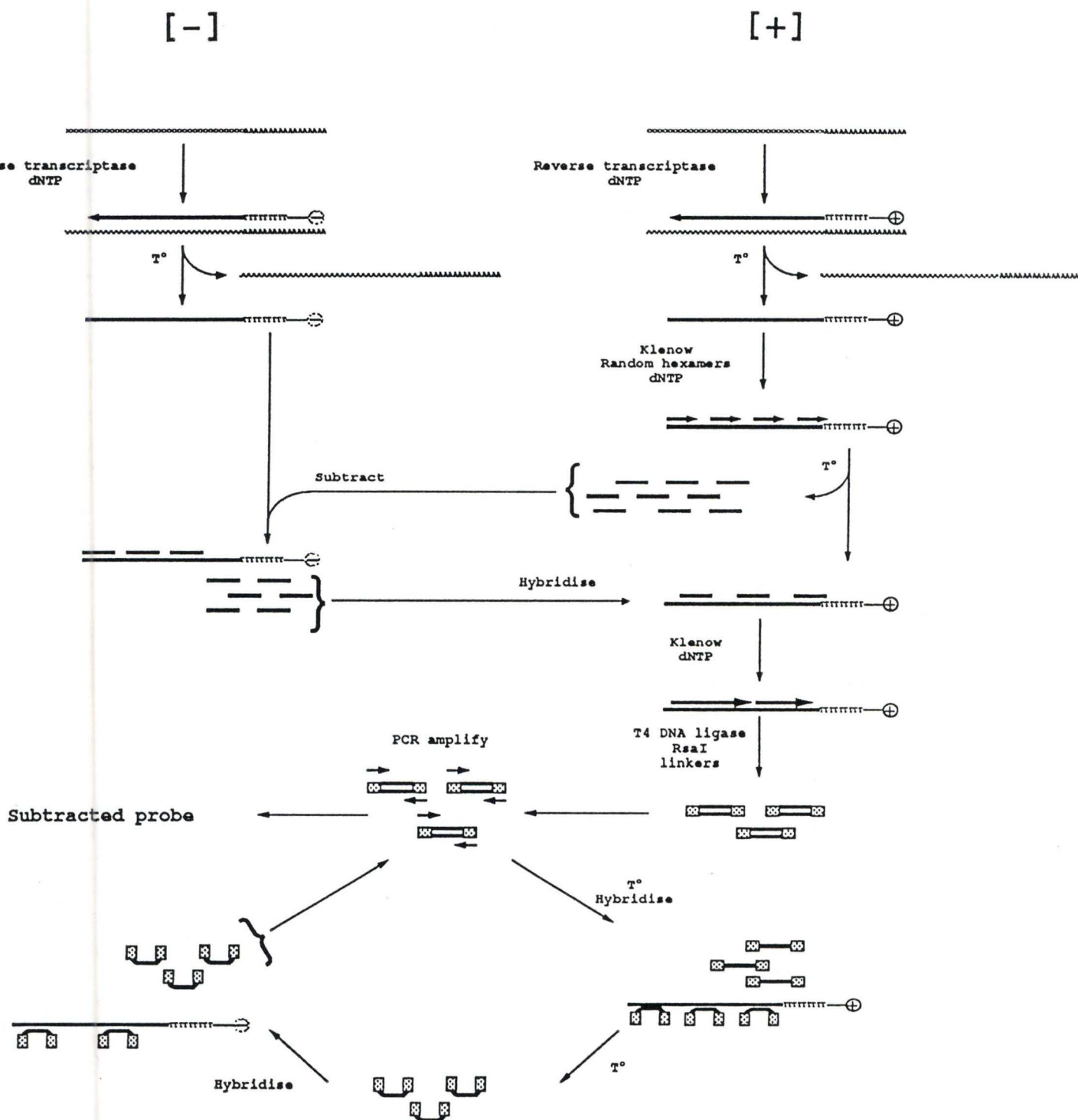
α , est l'abondance de l'ADN d'intérêt parmi l'ADN total
 $1 - P$, est la probabilité de ne pas trouver l'ADN
recherché. On la choisit très faible (0.005).
 n , le nombre de clones à cribler.

Par exemple, pour trouver un clone représentant un ARN présent à 1% dans l'ARNm total de la cellule, il faut cribler environ 500 clones (527).

Figure 6.1 : Technique de soustraction sur billes magnétiques (Coche, 1994).

[+] = "tester"

[-] = "driver"



La limite pratique de détection de cette méthode est à une abondance de 10^{-3} . Elle permet de trouver des clones abondants mais pas les clones rares.

6.2.2. Hybridation sur hydroxyapatite

L'hybridation sur hydroxyapatite (forme insoluble de phosphate de calcium) est une méthode plus sensible. L'hydroxyapatite se lie de manière plus forte à du double brin qu'à du simple brin. Leur élution s'effectue lors d'un lavage avec un tampon phosphate. En hybridant sur l'hydroxyapatite un mélange d'ADNc simple brin ("tester") avec de l'ARN ("driver") en excès, en conditions strictes, les doubles brins ADNc-ARN et ARN-ARN s'adsorbent sur la colonne alors que l'ADNc n'ayant pas retrouvé un homologue dans le driver passe dans le surnageant qui est récupéré. Après plusieurs cycles, l'ADNc sert à un criblage différentiel. (Sargent, 1987).

6.2.3. Soustraction par nucléotides biotynylés

Le driver est biotynylé, son homoduplex ou l'hétéroduplex (driver - tester) formé peut se fixer à l'avidine (ou la streptavidine). Si l'avidine se trouve sous forme libre, une extraction au phénol sépare la phase comprenant les fragments de "tester" n'ayant pas trouvé d'homologue de la phase formée par les protéines auxquelles sont liés les homoduplex "driver - driver" ou "driver - tester" (Lebeau, 1991). L'avidine peut également être fixée de manière covalente à des billes magnétiques. Il apparaît dès lors une phase solide (le driver et les séquences communes) et une phase liquide (les séquences cibles). Il suffit de récupérer le surnageant. (Straus & Ausubel, 1990)

6.2.4. Analyse de Représentation Différentielle

L'Analyse de Représentation Différentielle (Representational Differential Analysis, RDA) permet de trouver des différences uniques entre génomes. Après quelques cycles de soustraction par PCR, un produit majoritaire peut se dégager et servir de sonde ou être cloné (Lisitsyn, 1993).

Les auteurs de cette méthode (Lisitsyn, 1993) sont parvenus à isoler des RFLP sur le génome humain ainsi qu'à prouver que la RDA est une technique permettant de trouver des "linkages" chez la souris (Lander, 1993). Pour l'instant, la RDA est utilisée pour mapper des gènes du modèle murin de la maladie "polycystic" des reins (Aldous, 1994). A part cela, aucun résultat via cette méthode n'a encore été publié.

6.2.5. Les billes magnétiques

L'avantage principal de cette soustraction est sa simplicité technique et son degré d'adaptation (fig. 6.1).

Principe

Le produit [+] (équivalent au "tester") ainsi que le produit [-] (ADNc simple brin équivalent au "driver") sont synthétisés à partir d'ARN lié à des billes polyT (Dynabeads® oligo dT), par une reverse transcriptase. Le brin d'ARN ayant servi de matrice est alors écarté. Le "tester" est soumis à un "random priming", et les fragments constitués, marqués au P₃₂, sont dirigés vers les billes [-] (ADNc simple brin sur billes). Les fragments communs s'hybrident, les fragments différents restent dans le surnageant. Ces fragments sont utilisés comme sonde sur une librairie d'ADNc (Rodriguez & Chader, 1992).

L'inconvénient de cette approche est la quantité de matériel récupéré après soustraction. Celle-ci s'avère être limitante pour le screening voire insuffisante pour permettre plusieurs cycles de soustraction.

Pour augmenter l'efficacité, cette méthode a été modifiée (Coche, 1994). Les fragments issus du "random priming" ne sont plus marqués. Les fragments différents, restés dans le surnageant sont dirigés vers les billes [+] et sont soumis à une élongation par la Klenow pour augmenter leur taille. Ensuite, après avoir été restreints et flanqués d'adaptateurs, ces fragments intéressants et uniquement eux sont amplifiés par PCR avant de servir de sonde.

Des cycles supplémentaires sont réalisés en hybridant le produit de la PCR sur du tester pour retrouver une stœchiométrie correcte en fragments [+]. Ces fragments sont repris et réhybridés sur des billes [-]. Le surnageant, récupéré, est à nouveau amplifié et sert soit à un nouveau cycle soit comme sonde de criblage d'une banque génomique ou d'ADNc.

Expériences déjà réalisées

Cette méthode fut expérimentée au laboratoire pour isoler des séquences différentiellement exprimées lors du développement du cortex cérébral de souris entre les jours onze et quatorze du développement (Coche, 1994).

Validation

Ce protocole a permis au laboratoire d'isoler des séquences du cerveau qui sont régulées en amont, tel que le gène de la phosphoprotéine p19.

7. But du mémoire

En cette fin de siècle, de nombreux chercheurs s'intéressent aux gènes du développement. Le gène Pax-3 fait partie de ceux-ci et est l'objet de nombreuses recherches.

Nous allons étudier l'expression différentielle des gènes dont la régulation dépend de Pax-3, et ceci par la technique sur billes magnétiques décrite précédemment.

Dès le huitième jour de gestation, Pax-3 est exprimé. Chez le mutant, des anomalies sont rapidement recensées. L'absence de protéine Pax-3 correcte engendre une différence du modèle d'expression et ceci dès le huitième jour (cfr. § 5.1.2). Une étude de la différence d'expression peut être effectuée à partir de ce jour. Dans notre cas, nous avons choisi d'étudier cette expression différentielle entre Sp/Sp et +/+ le jour quatorze, stade où l'embryon Sp/Sp meurt.

Notre recherche consistera donc à cloner, grâce à une méthode de soustraction sur billes (Rodriguez, 1992) améliorée au laboratoire (Coche, 1994), les gènes dépendants de Pax-3; c'est-à-dire les gènes dans l'expression desquels Pax-3 intervient d'une manière directe ou indirecte.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

B. Matériel et méthodes.

1. Les souris

1.1. Souche

Les mutants murins Sp^{2H} employés proviennent de *McGill University, Montreal, Quebec, Canada*.

La souris originale a été trouvée dans la progéniture mâle d'un croisement C3H/HeH avec 101/H après irradiation dans l'unité de radiobiologie *Chilton (Harwell), Angleterre*.

Les souris hétérozygotes mutantes présentent une tache blanche sur l'abdomen (fig. 1.1). S'il y a doute, une vérification peut être effectuée par PCR direct ou sur matériel génomique.

1.2. Elevage

Un élevage de souris requiert une certaine attention.

Ces animaux de laboratoire demandent une température relativement constante (22°C), une humidité relative élevée (65%), une hygiène et une alimentation parfaites afin d'éviter les maladies.

Le moindre manque d'eau pendant une nuit (12 heures) peut être fatal. Trop de va-et-vient dérange le bon déroulement de l'élevage et occasionne d'importantes pertes de nouveaux nés dues au stress.

Les souris sont placées dans des cages pouvant contenir quatre adultes ou un couple et sa progéniture jusqu'à l'âge de trois semaines.

Le local, bien aéré, est chauffé en permanence et un humidificateur d'air y est installé.

2. Souches et plasmides

2.1. Souche bactérienne

Nous avons utilisé la souche XL1-Blue de *Escherichia coli*, commercialisée par la firme Stratagène (figure 2.1). Cette souche est rec A1, end A1, gyr A96, thi, hsd R17, rk-, mk+, sup E44, rel A1, λ-, lac-. L'épisome F' qu'elle contient est pro AB, laq 1^qZΔM15, Tn10 (tetR).

2.1.1. Le génotype

- Au niveau chromosomique : une délétion de l'opéron lactose rend XL1-Blue incapable de métaboliser le lactose (*lac-*), condition requise pour la sélection blanc/bleu (cfr. B 2.1.2).

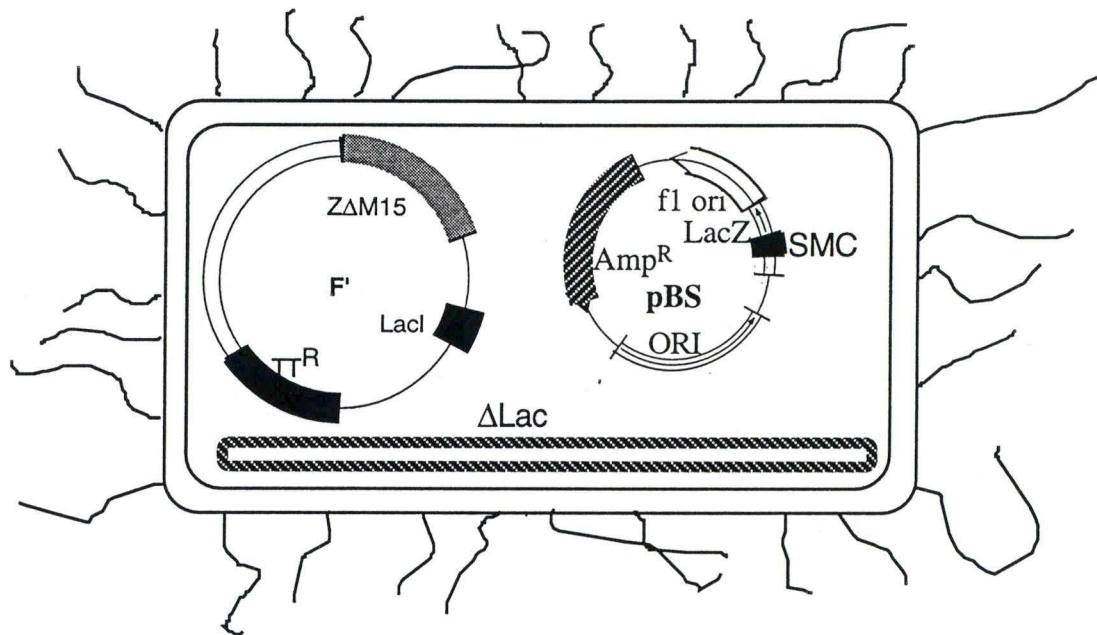


Figure 2.1 : *E. coli* XL1 blue.
 Marqueurs présents dans la bactérie *Escherichia coli* de souche XL1-blue.

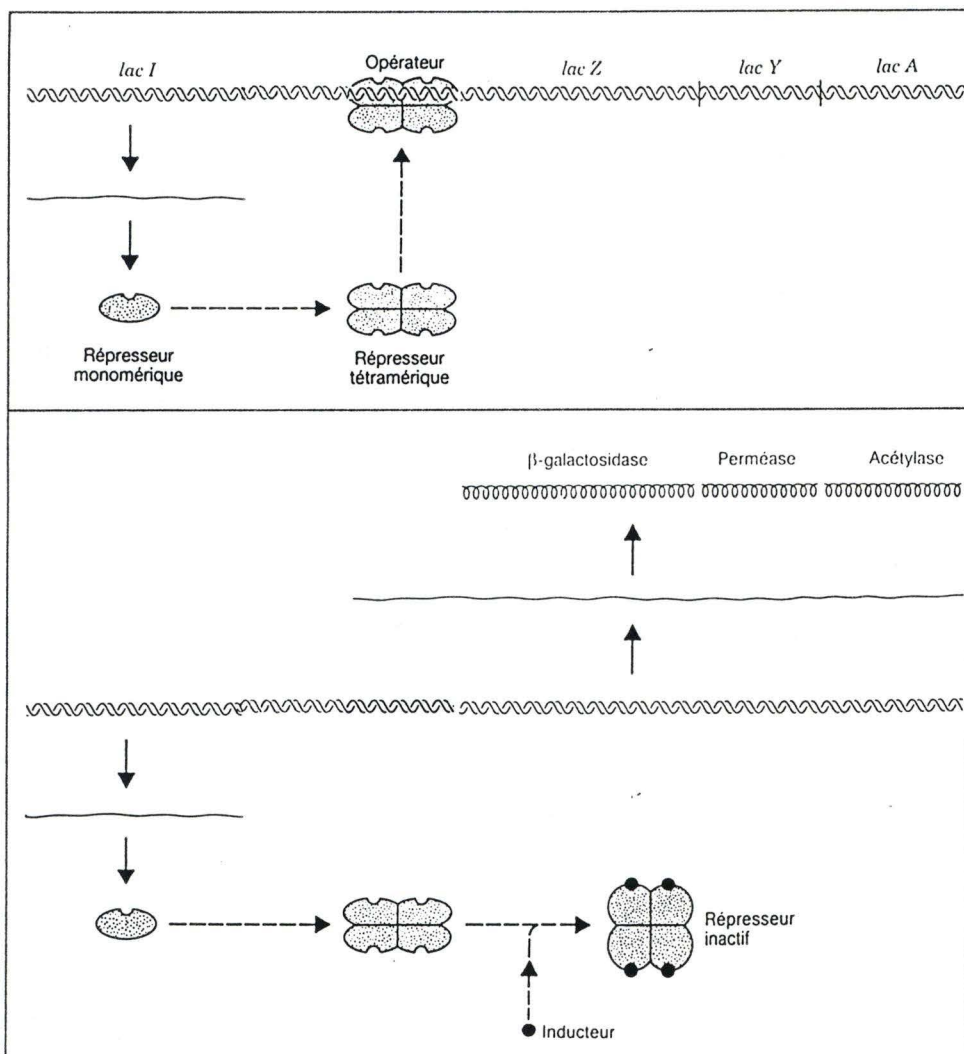


Figure 2.2 : Description de l'opéron lactose. (Lewin B., 1990)

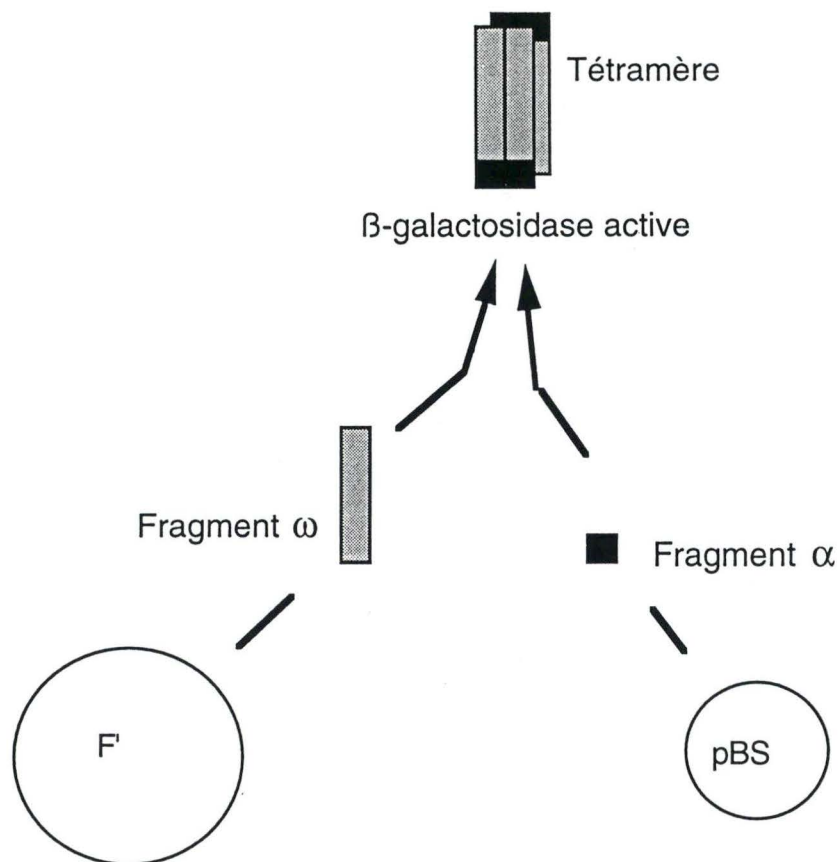


Figure 2.3 : Système de complémentation intragénique permettant le test blanc/bleu dans XL1-blue.

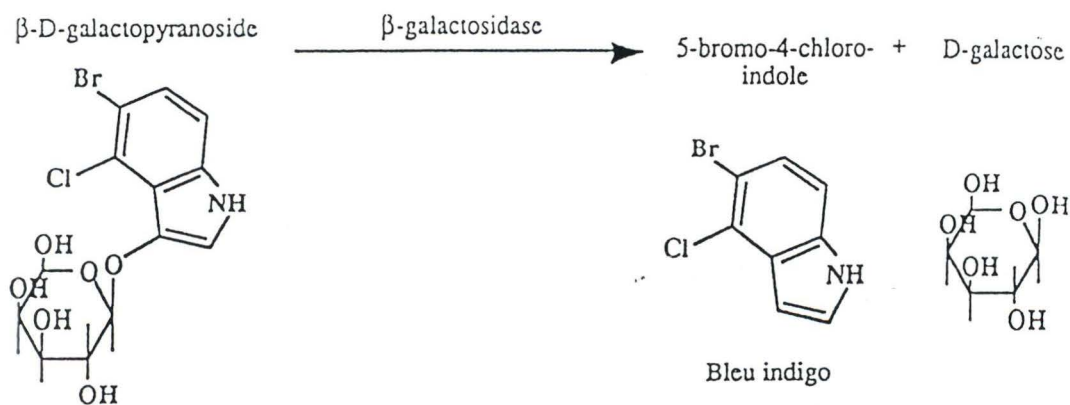


Figure 2.4 : Activité de la β -galactosidase sur le 5-bromo-4-chloro-3-indol- β -D-galactopyranoside (X-gal).

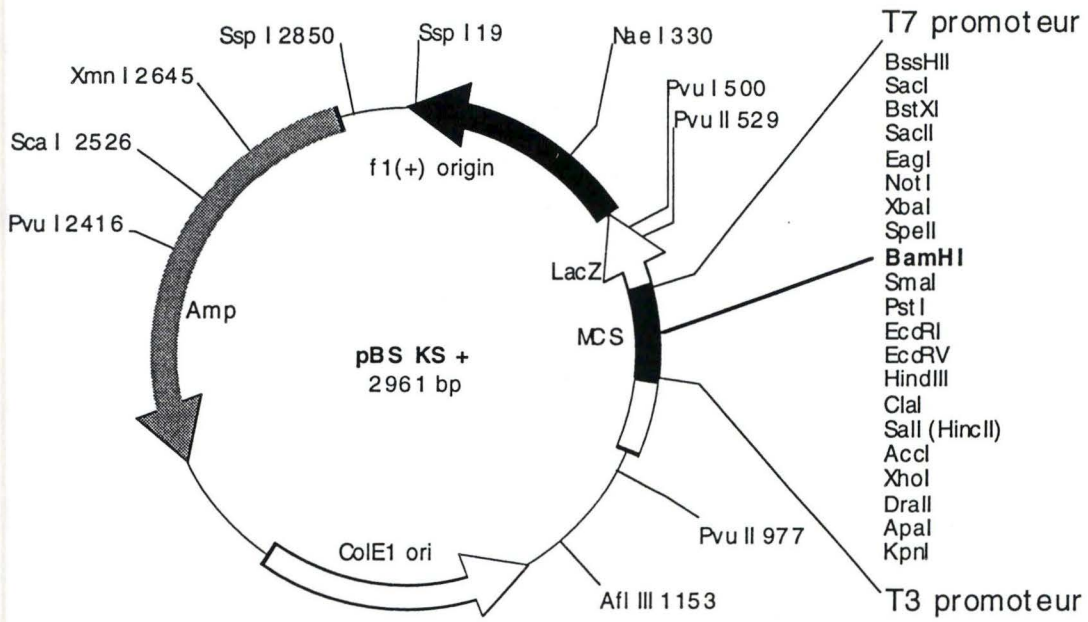


Figure 2.5 : Carte de pKS+. Site de restriction BamHI en position 689 dans le site multiple de clonage (MCS).

Les gènes de structure de l'opéron lactose (gène Z, Y, A) assurent le métabolisme de ce dernier.

Ces gènes sont contrôlés par une régulation négative. Le régulateur empêche l'expression du gène de structure. Il est codé par le gène *LacI*. Cette protéine se lie à l'ADN en un site opérateur empêchant ainsi l'initiation de la transcription de l'opéron *LacZ* en bloquant l'accès à l'opérateur. En conditions naturelles, l'inducteur (le lactose ou un β -galactoside chimiquement semblable) se fixe sur le répresseur pour former un complexe ne sachant plus se lier à l'opérateur et la transcription peut alors s'initier (figure 2.2).

- Cette souche contient l'épisome F' responsable de la présence de pili sexuels en surface de la bactérie. Il contient un fragment Tn10 porteur du marqueur de résistance à la tétracycline. L'ajout de cet antibiotique dans le milieu permettra la sélection des bactéries possédant F'. L'épisome permet la sélection blanc/bleu des clones portant un plasmide recombinant ou non introduit dans la cellules par électroporation ou par une autre méthode.

2.1.2. Test blanc/bleu

Pour ce test, nous utilisons comme inducteur l'IPTG (isopropyl- β -thio-galactopyranoside) un analogue du lactose. L'épisome F' permet à la souche de synthétiser un fragment du gène *lacZ* de la β -galactosidase (le fragment ω). Par complémentation intragénique, avec un plasmide non recombinant (par exemple pSK) amenant un autre fragment du gène (fragment α), la β -galactosidase devient active et donne une coloration bleue à la colonie (fig. 2.3). Cette coloration est due à la dégradation d'un chromogène tel que X-gal (fig. 2.4). Par contre, la colonie sera blanche si le plasmide introduit est recombinant, c'est-à-dire si la partie codant pour le fragment α est disruptée par l'insertion d'un fragment d'ADN.

2.2. Le plasmide

Le plasmide pBluescript[®] (fig. 2.5), que nous avons utilisé (pSK+), est un hybride entre un phage et un plasmide. Il est constitué de 2961 paires de bases. Il porte une origine de répllication d'*E. coli* (ORI) et une origine de répllication phagienne (f1). Il possède un gène de résistance à l'ampicilline. Celui-ci permet la sélection des colonies comprenant le vecteur. Outre ce gène de résistance, le fragment codant pour le peptide α de la β -galactosidase (appelé *lacZ'*) est présent. Il assure l'obtention, par complémentation intragénique, d'une β -galactosidase fonctionnelle chez XL1-

Blue. L'activité β -galactosidase est mise en évidence par le test coloré blanc/bleu.

Au sein de l'extrémité N-terminale du gène *lacZ'* a été introduit un site multiple de clonage où sont localisés 21 sites de restriction unique. Cette insertion n'altère en rien la capacité de complémentation excepté lorsque, au cours d'un clonage à un de ces sites uniques de restriction, un fragment d'ADN vient s'y insérer.

2.3. Milieux de culture

2.3.1. Milieu LB liquide :

Tryptone	10g/l
NaCl	5g/l
Yeast Extract	5g/l

Une fois porté à volume avec de l'eau distillée, on autoclave (20' à 120°C). Les cultures liquides se font à 37°C généralement dans des bouteilles universelles sous agitation modérée.

2.3.2. Milieu LB solide :

De même composition que le LB liquide, il contient 1.6% d'agarose. Ce milieu, une fois autoclavé et refroidi à 55°C est coulé dans des boîtes de Pétri. Elles seront conservées à 4°C après solidification.

La culture sur milieu solide se fait également à 37°C.

- Milieu LB sélectif :

On aura ajouté au milieu LB standard autoclavé et refroidi de l'ampicilline, à la concentration finale de 50 μ g/ml ainsi que la tétracycline à la même concentration.

- Milieu LB "blanc/bleu" :

C'est le milieu requis pour la mise en évidence de l'activité de la β -galactosidase. Au milieu autoclavé refroidi (55°C) on ajoute 800 μ l de X-gal 2% (20 mg/ml d'N,Ndiméthylformamide) et 1.6 ml d'IPTG 100 mM pour 400 ml de milieu et cela en plus de la tétracycline et de l'ampicilline. Ce milieu est également appelé milieu AXI.

2.4. La transformation bactérienne

La transformation bactérienne consiste à faire rentrer de l'ADN exogène (plasmide) dans un microorganisme (bactérie).

La membrane d'une cellule placée dans un champ électrique se polarise et lorsque la différence de potentiel transmembranaire atteint une valeur critique, il se forme des pores de quelques nanomètres de diamètre dans la

double couche lipidique par lesquels l'ADN pénètre dans les cellules. C'est l'électroporation. Le phénomène est réversible si la durée d'exposition au champ électrique est suffisamment brève. Sinon les lésions irréversibles entraînent la mort cellulaire.

L'**électroporation** est une méthode de transformation d'*E. coli* plus efficace que les méthodes chimiques. On obtient couramment 10^9 à 10^{10} transformants par μg de vecteur avec diverses souches et de nombreux plasmides.

Protocole :

- préparer une solution SOC :

Bactotryptone	2%
Bactoyeast extract	0.5%
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glucose	20 mM

- Ramener les cellules compétentes à température ambiante en les plaçant sur glace. Refroidir la cuvette d'électroporation (cuvette de 0.2 cm).
- Mélanger dans un tube stérile, 100 μl de cellules compétentes et 1 μl de mélange de ligation (attention jamais plus de 20 ng de plasmide).
- Placer le tout 1' sur glace.

Régler le Gene Pulser sur 2.5 kVolts, 25 μFarad et le pulsor controller sur 200 Ω . Ceci produit un pulse de 4.5 à 5 msec.

- Transférer la suspension de cellules et d'ADN dans la cuvette d'électroporation sans faire de bulles; placer la cuvette dans la chambre de l'électroporateur. Appliquer le pulse.
- Retirer la cuvette et ajouter immédiatement 1 ml de milieu SOC froid, resuspendre délicatement avec une pipette pasteur. Transférer dans un eppendorf et placer 1 heure à 37°C.
- Etaler les transformants sur des milieux de sélection.

3. Techniques couramment utilisées

3.1. Digestion enzymatique

3.1.1. Restriction

Les endonucléases de restriction (utilisées en laboratoire) sont des enzymes qui reconnaissent une séquence précise dans l'ADN bicaténaire et

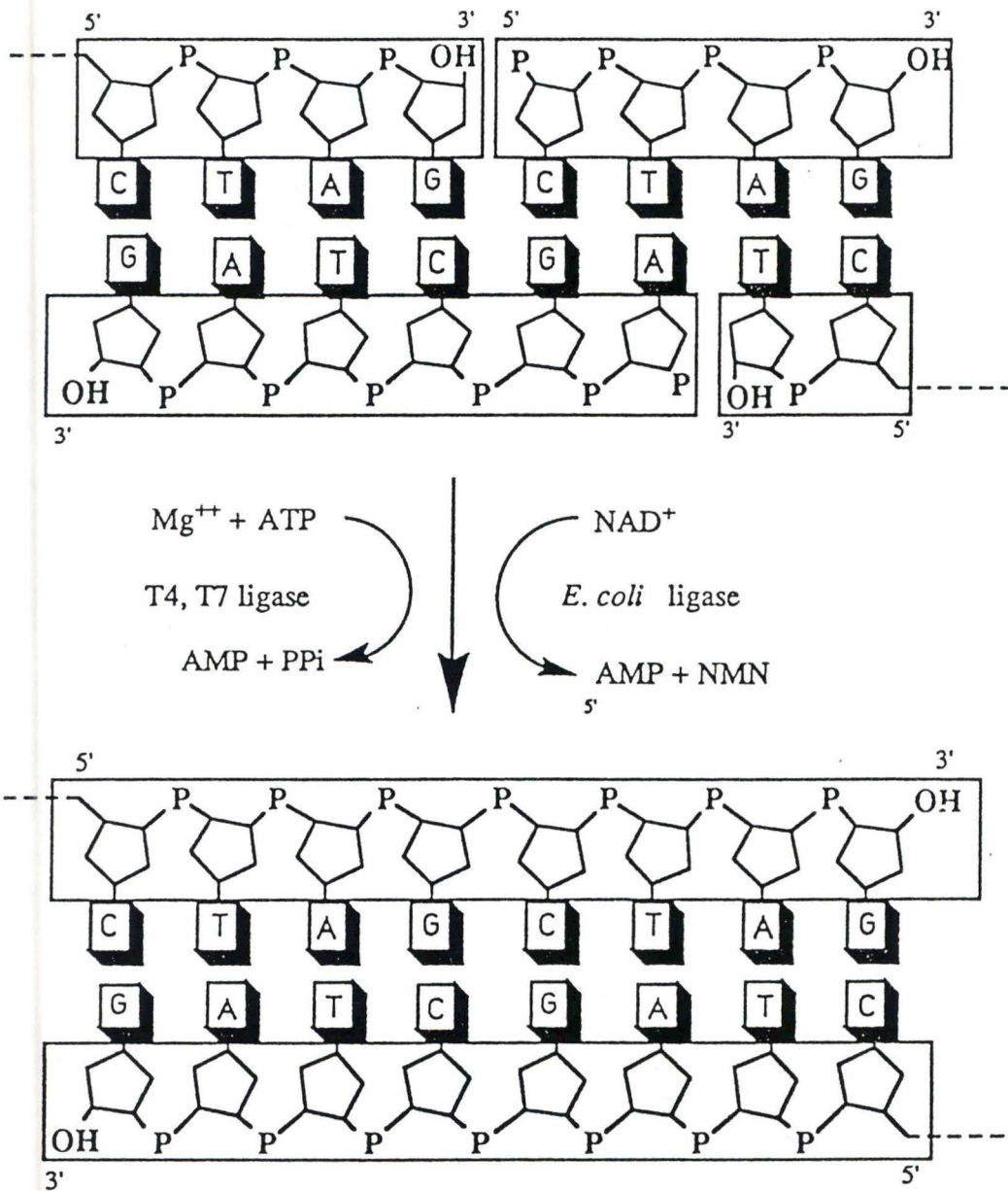


Figure 3.1 : Activité de la ligase sur des extrémités cohésives.
(Maniatis, 1990)

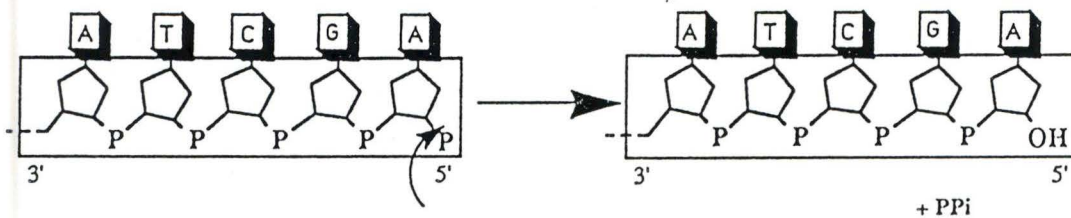


Figure 3.2 : Action de la phosphatase alcaline.
(Maniatis, 1990)

qui coupent à un endroit déterminé dans cette séquence de reconnaissance ou, pour certains enzymes, à proximité.

Les enzymes utilisées sont commercialisées par les firmes Gibco-BRL, Boehringer, Pharmacia et Biolabs. Conservées à -20°C , elles sont utilisées aux conditions de température et dans le tampon recommandé par le fabricant (souvent livré avec l'enzyme) ou les manuels ad hoc (Sambrook, 1989).

Protocole :

- Placer l'ADN à digérer dans un tube eppendorf stérile.
- Ajouter $2\mu\text{l}$ de tampon 10x.
- Ajouter une unité enzyme par μg d'ADN à digérer.
- Porter à $20\mu\text{l}$ avec de l'eau distillée.
- Incuber pendant 2 à 3 heures à 37°C (ou autre température spécifique de l'enzyme et précisée par la firme).

La réaction est arrêtée soit par l'ajout d'EDTA à concentration finale de 10 mM, soit en inactivant l'enzyme par chauffage (si elle est thermosensible) pendant 15' à 65°C ou encore par extraction au phénol (voir plus loin).

3.1.2. Ligation

La ligation de molécules d'ADN clivées à "bouts francs", même par des enzymes différentes, est toujours possible, tandis que des molécules d'ADN à "bouts collants" ne peuvent être assemblées que si les nucléotides protrudants forment des extrémités cohésives (anticomplémentaires).

La ligation est réalisée grâce à l'activité de l'enzyme ADN ligase du phage T4. Cette enzyme catalyse la formation de lien phosphodiester entre le phosphate 5' d'une molécule et une extrémité hydroxyle 3' (fig. 3.1). L'enzyme requiert de l'ATP et des ions Mg^{++} pour être active.

Protocole : T4 DNA ligase (BRL)

- $1\mu\text{l}$ de T4 DNA ligase ($1\text{U}/\mu\text{l}$). Suffisant pour liguer $5\mu\text{g}$ d'ADN.
- $2\mu\text{l}$ de tampon de ligation 10x.
- $17\mu\text{l}$ d'ADN en solution (maximum $5\mu\text{g}$).
- Incuber 14 heures à 14°C pour les bouts collants et 2 heures pour les bouts francs. La ligation à bouts francs est souvent moins efficace, il est nécessaire d'augmenter de 10 à 100 fois la quantité d'enzyme.

3.1.3. Déphosphorylation

Afin qu'un plasmide restreint par une enzyme ne se referme pas sur lui-même lors d'une ligation avec un autre fragment, il est utile de déphosphoryler les extrémités 5' de l'ADN ouvert (fig. 3.2).

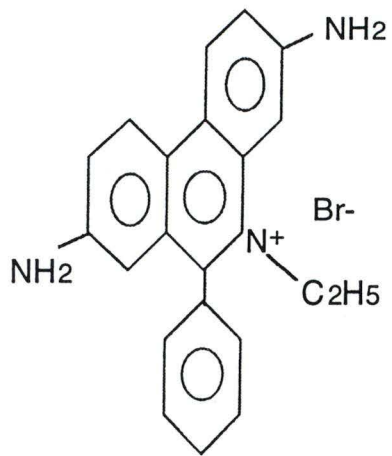


Figure 3.3 : Structure du Bromure d'éthidium.

Protocole : Phosphatase Alcaline (BRL)

- 50 pmoles d'ADN sont incubées avec 1 unité de phosphatase alcaline à 37°C pendant 1 heure dans le tampon adéquat.

3.2. Electrophorèse sur gel d'agarose

3.2.1. Généralités

L'électrophorèse sur gel d'agarose est utilisée

- soit à des fins analytiques : pour séparer et analyser des fragments d'ADN, pour déterminer leur taille, pour en estimer la quantité;
- soit à des fins préparatives : pour purifier un fragment d'ADN de taille connue.

Les fragments d'ADN sont facilement détectés sur le gel grâce à un colorant fluorescent, le bromure d'éthidium BET (fig. 3.3). On peut ainsi visualiser en lumière UV des quantités très faibles d'ADN (de l'ordre de 5 à 10 ng). Attention, le BET est cancérigène.

On peut estimer la taille des fragments ainsi que leur concentration si et seulement si dans un puits voisin des échantillons on a fait migrer simultanément un marqueur de poids moléculaires de concentration connue. On peut également estimer la concentration en comparant la fluorescence émise par une bande et celle d'une des bandes du marqueur de concentration connue.

3.2.2. Pour l'ARN

Il faudra laver tout le matériel avec une solution de NaOH 0.1M et laisser agir avant de rincer avec de l'eau traitée au DEPC. La préparation d'un tampon de migration ARN 10x et d'un alourdisseur ARN 10x est également requise.

La préparation du gel se fera sous hôte (vapeurs de formaldéhyde).

Protocole : (Sambrook, 1989)

Pour un gel 1.2% de 50 ml :

- 0.6g d'agarose auquel on ajoute 36 ml d'eau distillée traitée au DEPC
- Chauffer et refroidir jusqu'à environ 55°C
- Ajouter 5 ml de tampon de migration 10x et 9 ml de formaldéhyde 37% désionisé pH 4
- Le tampon de la cuvette sera du tampon de migration 1x.
- Préparation de l'échantillon :
 - 3µg d'ARN_T dans 2µl
 - 5µl de formamide
 - 2µl de formaldéhyde
 - 1µl de tampon de migration 10x

1µl de BET (400µg/ml)

Chauffer 10' à 65°C, mettre sur glace, faire un "quick-spin" et ajouter 2µl d'alourdisseur ARN 10x

- Faire circuler le tampon dans le circuit extérieur et faire migrer pendant deux heures. Le voltage sera de 3 volts par cm.

3.2.3. Extraction d'une bande

Il existe plusieurs méthodes pour extraire une bande d'ADN d'un gel d'agarose. Sont décrites ici les méthodes "millipore" et "électroélution".

Millipore : cette technique est basée sur la fragilité des gels. Le gel est disrupté par une succession de congélations décongélations. Ensuite, les fragments d'ADN, étant libérés sont élués par centrifugation.

Protocole : UltraFree-MC (Millipore)

- Exciser le(s) bloc(s) d'agarose comprenant les fragments intéressants et le(s) mettre dans un eppendorf.
- Mettre l'eppendorf 10' à -70°C, ensuite 10' à 37°C. Répéter 3x.
- Ecraser le gel et le transférer dans la cupule surmontant l'eppendorf UltraFree-MC.
- Centrifuger 20' à 5000g (c'est à dire 6500 rpm) maximum.
- Resuspendre l'agarose dans 200µl de TE, incubé 20', écraser à nouveau.
- Centrifuger de nouveau 20' à 10000 rpm maximum.

L'agarose est retenu par le filtre alors que les fragments d'ADN sont retrouvés dans l'eppendorf UltraFree-MC. Il suffit maintenant de précipiter.

Electroélution : (system Bio-Rad) cette technique, plus rapide que la précédente, consiste à mettre le bloc d'agarose d'un côté d'une double cupule et d'y appliquer un courant Une membrane de nitro-cellulose est placée dans la cupule côté anodique. Les fragments d'ADN sélectionnés migrent vers cette cupule (côté anode) où ils sont retenus par la membrane. Ceux-ci sont remis en suspension à l'aide d'une solution NaCl molaire.

3.3. Purification d'acides nucléiques

3.3.1. Matrice d'affinité

(Prep-A-Gene, Magic Promega ou équivalent).

Voyons le cas d'un PAG sur un produit PCR :

Protocole : kit Bio-RAD, prep-A-gene DNA purification matrix.

- Ajouter à 80µl de produit PCR, 15µl de matrice PAG et 290µl de BB.
- Incuber sur table 10 minutes

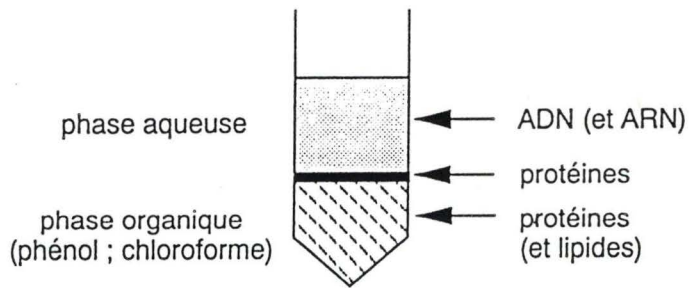


Figure 3.4 : Extraction au phénol ou/et chloroforme des protéines.

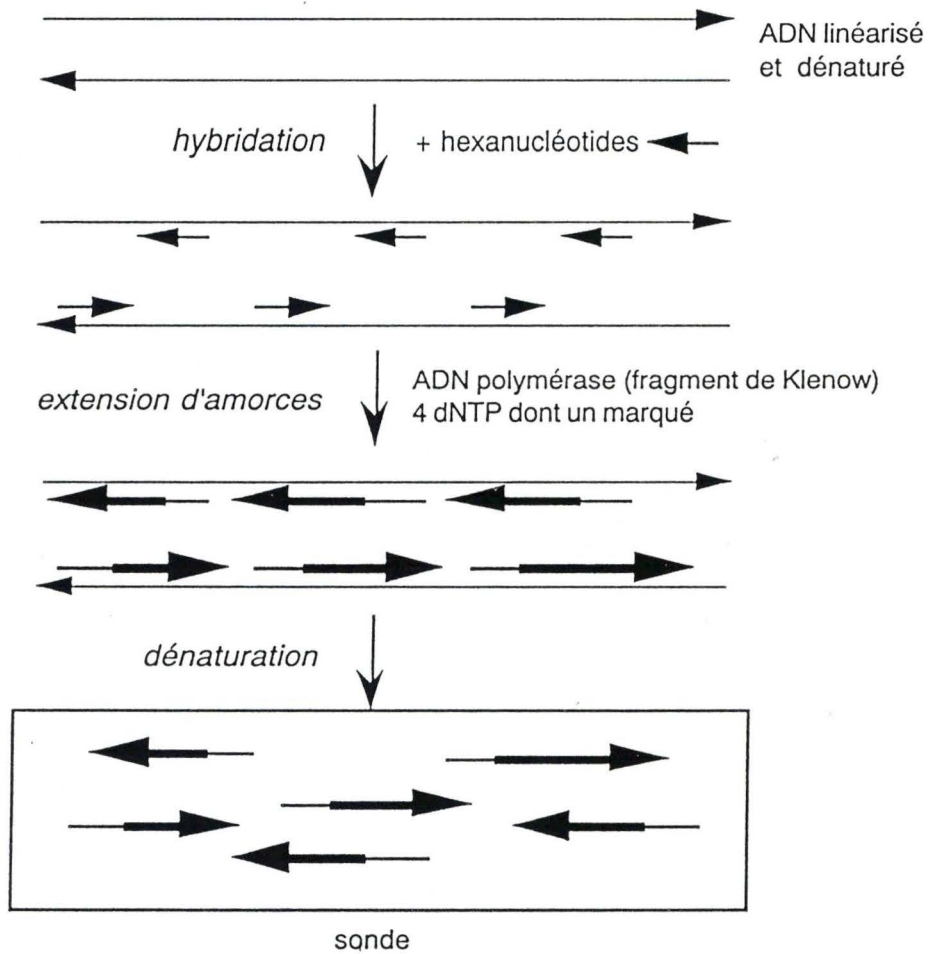


Figure 3.5 : Marquage par multi-amorçage aléatoire (random prime).

- Laver 2x avec 750µl de BB et 2x avec 750µl de WB
- Sécher au speed-vac
- Eluer avec 2x 15µl de TE à 50°C pendant 5 minutes

Les matrices d'affinité ne retiennent pas les molécules de petite taille, ce qui permet d'éliminer les amorces et les adaptateurs.

3.3.2. Phénol-chloroforme

Cette technique (fig. 3.4) permet d'éliminer les protéines d'une solution d'ADN. Le phénol et le chloroforme sont des solvants organiques qui dénaturent les protéines. Ils sont non miscibles à l'eau et de densité supérieure à celle-ci. Le phénol est mélangé avec la préparation à purifier dans des conditions qui favorisent la dissociation des protéines de l'ADN. Après centrifugation, on obtient deux phases : une phase aqueuse contenant les acides nucléiques et une phase organique contenant les protéines. Le chloroforme aide à l'élimination des traces de phénol. Le phénol est utilisé à pH 8, l'ADN passant dans la phase organique à pH acide. L'ADN est ensuite récupéré par précipitation à l'éthanol en présence d'ions monovalents.

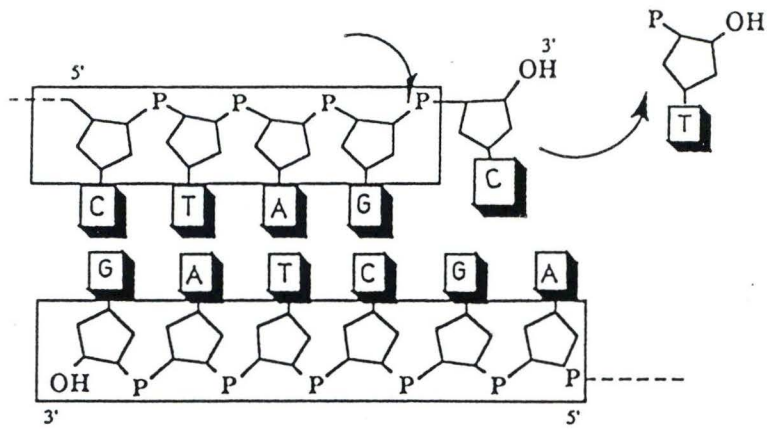
Protocole : (Sambrook, 1989)

- Ajouter 1 Volume égal de phénol à la préparation à purifier.
- Mélanger. Ajouter 1 volume égal de CIAA. Mélanger.
- Centrifuger 5' à environ 10000 rpm.
- Récupérer la phase aqueuse et ajouter 2 volumes d'éthanol absolu froid ainsi que : soit 0.1 Volume de NaAC 3M ou 0.25 volume d'NH₄AC 10M.
- Placer une nuit à -20°C ou une heure à -70°C.
- Centrifuger 20' à 15000 rpm et à froid (4°C).
- Décanter et rincer le culot avec de l'éthanol 70% froid.
- Centrifuger de nouveau 10' à 15000 à froid et décanter.
- Faire sécher au speed-vac.
- Resuspendre dans un volume adéquat de TE ou d'eau distillée.

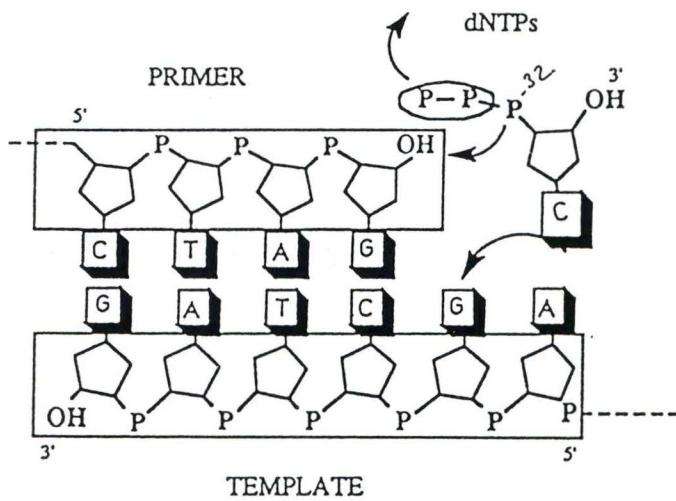
3.4. Random priming

Cette technique, qui permet d'obtenir des sondes très sensibles, est à l'heure actuelle très utilisée (kit BRL, Random primers DNA Labelling System).

La figure 3.5 illustre la méthode. Une mixture contenant un mélange d'hexanucléotides synthétisés au hasard est mise en présence de l'ADN à marquer préalablement dénaturé. Cette mixture contient toutes les séquences possibles, permettant ainsi une hybridation des amorces tout le long du brin "patron", en fonction de leur séquence. Un brin complémentaire



a/ activité exonucléase 3'-->5' du fragment Klenow



b/ activité polymérase 5'-->3' du fragment Klenow

Figure 3.6 : Activités du fragment Klenow de l'ADN polymérase d'*E. coli*. (Maniatis, 1990)

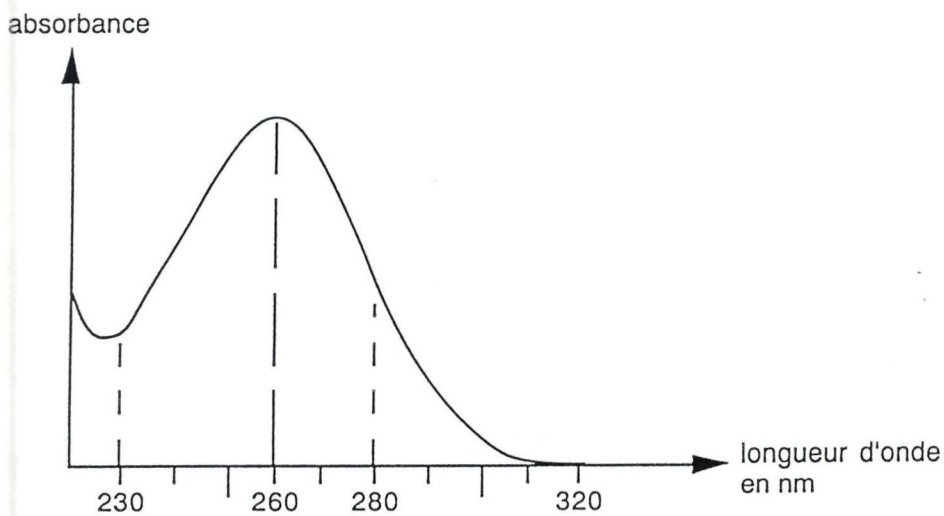


Figure 3.7 : Spectre d'absorption de l'ADN dans l'UV.

est synthétisé par le fragment Klenow de l'ADN polymérase d'*E. coli*, à partir de l'extrémité 3'-OH libre des amorces hybridées aux séquences complémentaires du brin patron (figure 3.6).

Cette synthèse est utilisée en utilisant un dNTP marqué α -(P-32) dCTP et les trois autres dNTP non marqués.

Protocole : kit BRL

- environ 25 ng de matériel (ADN, ADNc double brin ou ADNc simple brin couplé à des billes)
- 4 μ l dATP 0.5 mM
4 μ l dGTP 0.5 mM
4 μ l dCTP 0.5 mM
4 μ l dTTP 0.5 mM
30 μ l Random Prime Mix
- ajouter de l'eau distillée jusqu'à 48 μ l
- Incuber 15 minutes à 37°C et placer sur table.
- Ajouter 2 μ l de Klenow (6U/ μ l).
- Incuber 1 heure sur table.
- Ajout de 5 μ l de tampon stop afin d'arrêter la réaction.

3.5. Quantification spectrophotométrique

La mesure d'absorbance (DO) à 260 nm permet de calculer la concentration des acides nucléiques.

$$\text{Concentration } \mu\text{g/ml} = \text{DO}^{260} \times \text{dilution} \times \text{DO}_{\text{unitaire}}$$

3.5.1. ADN

Une absorbance à 260 nm égale à 1 correspond à une concentration de 50 μ g d'ADN par ml. Le rapport entre les absorbances à 260 nm et 280 nm permet une estimation de la pureté de l'ADN. Des préparations pures ont un rapport $\text{DO}^{260}/\text{DO}^{280}$ de 1.8. S'il y a contamination de la solution par du phénol ou des protéines, ce rapport sera inférieur et une quantification exacte de l'ADN ne sera pas possible par cette méthode (fig. 3.7).

3.5.2. ARN

Pour l'ARN, la cuvette devra d'abord être lavée avec une solution de NaOH 0.1M pour dégrader les RNases. Une absorbance à 260 nm égale à 1 correspond à 37 μ g d'ARN par ml.

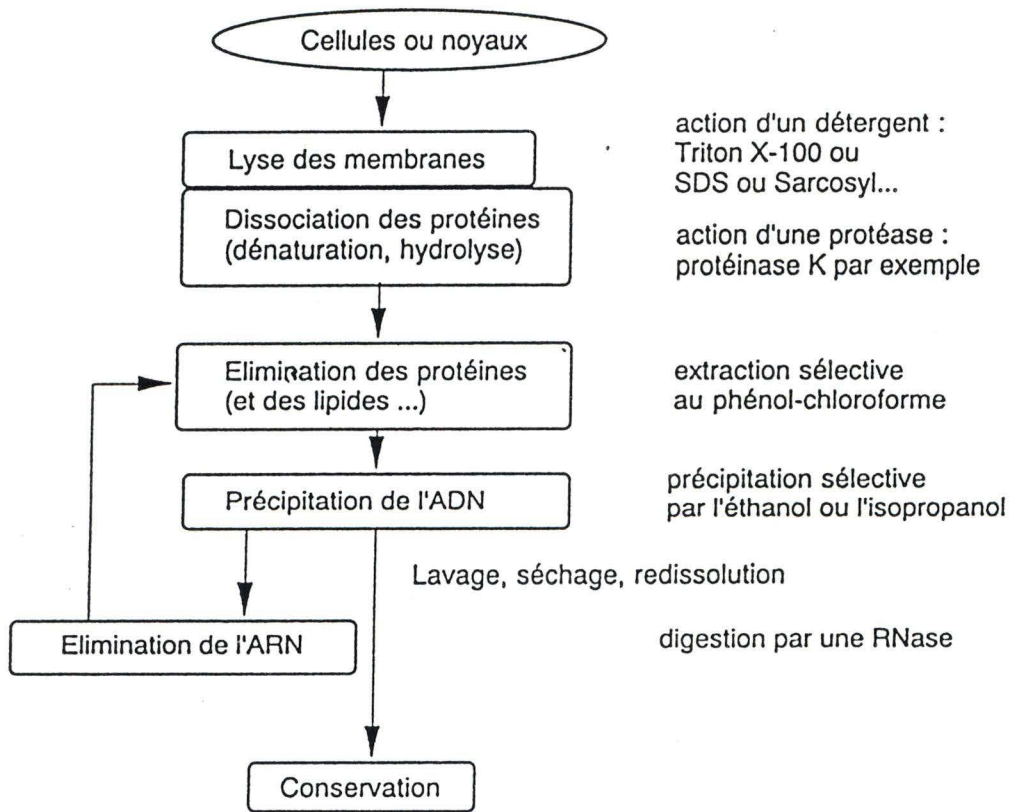


Figure 4.1 : Méthode classique d'extraction de l'ADN.

4. Extraction d'ADN

4.1. ADN génomique

La démarche générale est résumée dans la figure 4.1. La lyse met en jeu un détergent qui désorganise la double couche de phospholipides des membranes. La dissociation des protéines est réalisée en utilisant un détergent dénaturant comme le SDS (sodium dodécylsulfate) et/ou en faisant agir une protéinase K, active jusqu'à 65°C, même en présence de SDS. L'élimination des protéines est classiquement réalisée par extractions successives au phénol-chloroforme. La précipitation de l'ADN par l'éthanol permet d'obtenir celui-ci sous forme solide pour le laver et ainsi éliminer les sels, de le sécher et de le redissoudre dans un petit volume.

L'élimination de l'ARN peut être effectuée avant ou après la phase phénolique. On utilise une RNase "DNases free". L'ADN est conservé à 4°C.

Protocole : (Sambrook, 1989)

Il faut porter des gants pendant toute la procédure. Il faut avoir préparé la solution d'homogénéisation (25 ml par gramme de tissu) ainsi que la RNase.

- Transférer le tissu dans un Dounce (refroidi dans la glace) avec 1 ou 2 gouttes d'eau distillée et le réduire en pâte avec le piston.
- Ajouter 5 ml de solution d'homogénéisation (cfr. référence) et homogénéiser.
- Transférer dans un Falcon de 50 ml. Rincer avec 5 ml de solution d'homogénéisation.
- Incuber le Falcon avec les 10 ml d'homogénat sur la roue tournante à l'étuve à 55°C toute la nuit.
- Digérer l'ARN par la RNase ajoutée à la concentration de 100µg/ml, à 37°C pendant 1 heure, avec agitation occasionnelle.
- Ajouter 10 ml de phénol et 10 ml de CIAA, envelopper de papier aluminium et agiter à température ambiante pendant 30'.
- Centrifuger 15' à 2600 rpm à température ambiante.
- 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 purs contaminants.
- Ajouter 2 Volumes d'éthanol et récolter l'ADN avec une pipette pasteur bouchée. Rincer avec de l'éthanol 70%, bien égoutter, sécher 10' au speed-vac et resuspendre dans du TE sous agitation modérée pendant au moins 24 heures.
- Après resuspension, estimer la concentration, aliquoter et visualiser sur gel.

4.2. ADN plasmidique

Protocole : Nucleobond AX (Machery-Nagel).

Après une culture d'une nuit, prélever 1.5 ml de milieu.

- 1.5 ml de milieu dans un eppendorf
- centrifuger 10' à 14000 rpm retirer le surnageant.
- resuspendre dans 300µl de solution P1 + RNase (conservée à 4°C), ajouter 300µl de solution P2 et attendre 5' sur table.
- Ajouter 300µl de solution P3, mélanger délicatement et attendre 10' sur glace (pour une meilleure précipitation).
- Centrifuger 15' à 14000 rpm à 4°C. Récupérer le surnageant.
- Ajouter 720µl d'isopropanol.
- Centrifuger 15' à 4°C (14000 rpm), ôter le surnageant, sécher au speed-vac.
- resuspendre dans 20µl d'eau et vérifier la récupération sur gel.

5. Extraction d'ARN

5.1. Extraction proprement dite de l'ARN

Il est recommandé de prendre toutes les précautions possibles vis-à-vis des RNases.

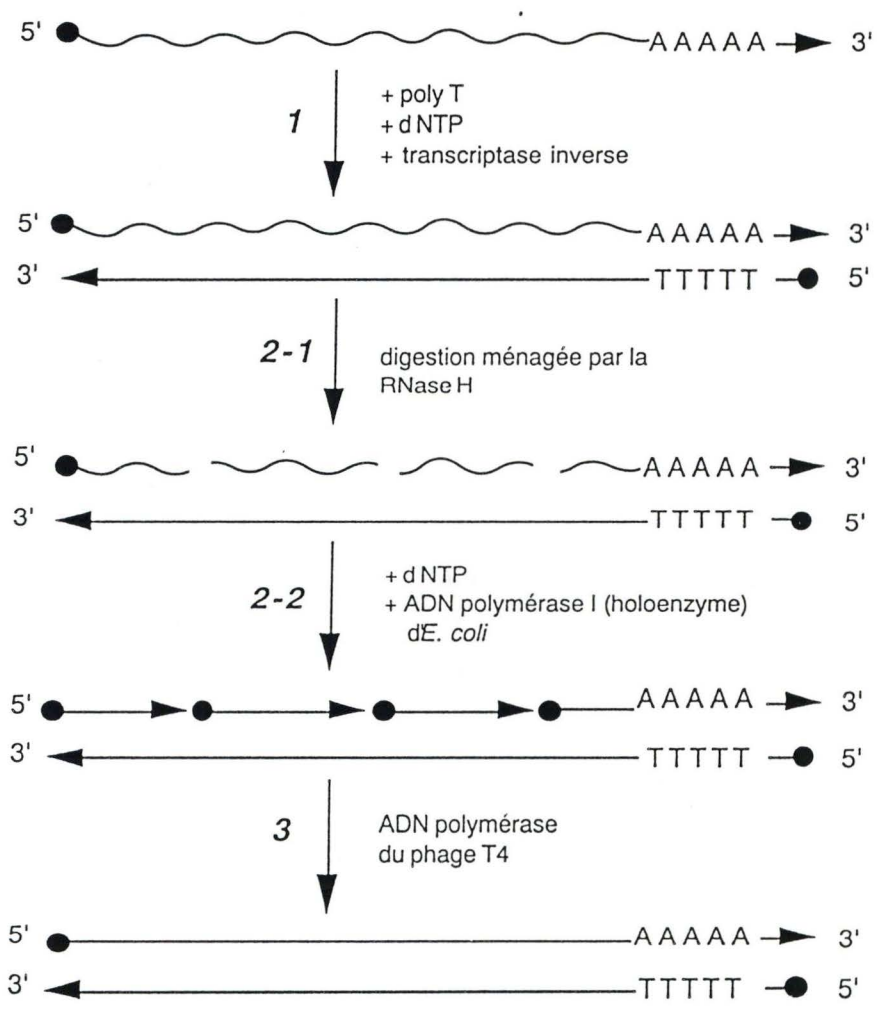
Protocole : Trisolv (Biotecx).

Comme pour toute manipulation avec de l'ARN il faut traiter le matériel au DEPC. Mettre des gants et utiliser des réactifs "RNase free". Nous utilisons le Trisolv comme solution d'homogénéisation.

Pour 0.4g de matériel :

- Ajouter au 0.4g de matériel déposé dans un potter traité au DEPC 5 ml de Trisolv. Bien homogénéiser et laisser 5' sur table.
- Pour extraire, ajouter 1 ml de chloroforme, vortexer 15", laisser 2' sur la table
- centrifuger 15' à 10000 rpm à froid, récolter la phase supérieure (aqueuse) où se trouve l'ARN_T.
- Précipitation classique d'ARN à l'isopropanol.
- Quantification classique.

Pour concentrer l'ARN, pooler la quantité nécessaire (maximum 700µl par eppendorf). Ajouter 1 Volume d'isopropanol et 0.1 Volume de NaAC 3M. Mettre à -70°C pendant 10 minutes, centrifuger à 10000 rpm pendant 10'. Resuspendre dans 1 ml d'éthanol 75%, centrifuger de nouveau à 10000 rpm pendant 10 minutes, sécher au speed-vac. Resuspendre avec de l'eau DEPC dans (au maximum) la moitié du volume précédent. Refaire une lecture de DO. Il est bien évident que les produits utilisés sont traités au DEPC ou "RNases free".



1 : synthèse du premier brin 2 et 3 : synthèse du second brin

Figure 5.1 : Synthèse d'ADNc.

5.2. Isolation d'ARNm suivie de la synthèse d'ADNc double brin

L'ARNm représente 1% de l'ARN_T. Il faut donc pour obtenir 10µg d'ARNm 1 mg d'ARN_T.

Protocole (Dyna)

1) Isolation de l'ARNm :

- 1 mg d'ARN_T dans 500µl, chauffer 10' à 65°C, ajouter 3µl de Biotinyl (dT) et 13µl de SSC 20x.
- Mélanger gentiment et laisser refroidir sur table pendant environ 10'.
- Pendant ce temps préparer une solution SSC 0.5x (30µl de SSC 20x + 1170µl d'eau traitée au DEPC) et une solution SSC 0.1x (7µl de SSC 20x + 1393µl d'eau traitée au DEPC).
- Resuspendre les billes gentiment. Laver 3x avec 300µl de SSC 0.5x, resuspendre dans 100µl de SSC 0.5x. Ajouter l'ARN_T (avec oligo dT) aux billes, incuber 10' à température ambiante, capturer les billes et sauver le surnageant car on ne sait jamais.
- Laver les billes 4x avec 300µl de SSC 0.1x et sauver également le surnageant. Les différents surnageants seront éliminés si la récupération d'ARNm a bien eu lieu.
- L'éluion de l'ARNm se pratique en resuspendant les billes dans 100µl d'eau traitée au DEPC et en récupérant le surnageant comprenant l'ARNm.
- Resuspendre à nouveau dans 150µl, récupérer le surnageant et le pooler avec le premier. Dès lors, on a 250µl d'ARNm

2) Synthèse de l'ADNc.

Elle ne peut être faite que pour une quantité inférieure à 5µg d'ARNm. Si la quantité est supérieure, faire la manipulation en double. De plus, cette réaction se fait dans 20µl et il faudra parfois réduire le volume comprenant les 5µg jusqu'à 7µl. Schéma figure 5.1.

Protocole : SuperScript (BRL)

1) First strand.

- Prendre les 5µg d'ARNm dans 7µl, y ajouter 1µl d'Oligo (dT) faire chauffer 10' à 70°C et mettre immédiatement sur glace.
- Ajouter 4µl de tampon premier brin 5x
 - 2µl de DTT 0.1M
 - 1µl de dNTP 10 mM ea.
- mélanger doucement au vortex, faire un "quick-spin" incuber 2' à 37°C.
- Ajouter 5µl de SuperScript II (200U/µl, BRL) incuber une première fois 30' à 37°C, une deuxième fois 30' à 40°C et une troisième fois à 45°C.
- Mettre sur glace en attendant le Second Strand.

2) Second Strand.

- Ajouter : 92.3µl d'eau
32µl de tampon second brin 5x à température ambiante
3µl de dNTP 10 mM ea
6µl de DTT 0.1M
2µl de *E. Coli* DNA ligase (10U/µl)
4µl de *E. Coli* DNA polymérase I (10U/µl)
0.7µl de *E. Coli* RNase H (2U/µl).
- Incuber de 2 heures à une nuit à 16°C.
- Ajouter enfin 7 unités de T4 DNA polymérase par µg de premier brin.
- Laisser agir 1 heure à 16°C et ajouter 20µl d'EDTA 250 mM pour stopper la réaction.

Cette étape sera suivie des méthodes de purification précipitation traditionnelles.

5.3. ADNc sur billes magnétiques pour soustraction

La méthode que nous employons pour la synthèse de l'ADNc fait appel aux billes magnétiques (Dynabeads[®] oligo dT, Dynal), cette solution contient 5 mg de billes par ml. La capacité de ces billes est de 2µg/mg; il faut donc un minimum de 60µl de billes pour lier 600 ng d'ARNm.

Protocole :

En admettant que 1% de l'ARN_T est du ARNm, 60µg d'ARN_T contient 600 ng d'ARNm.

- Amener 60µg de ARN_T à 100µl en ajoutant de l'eau traitée au DEPC.
- Chauffer l'ARN_T 3 minutes à 70°C
- Laver 100µl de billes 2x avec 100µl de 2x BB; les resuspendre dans 100µl de 2x BB.
- Mettre 100µl de billes lavées dans chaque tube de l'ARN_T chaud.
- Incuber 10 minutes sur table.
- Laver les billes 2x avec 100µl de 1x WB; éliminer le surnageant.
- Laver les billes 2x avec 50µl de 1x Tampon RT; éliminer le surnageant.
- Mélanger dans un tube DEPC :
 - 11µl eau traitée au DEPC
 - 4µl 5x Tampon RT
 - 2µl DTT 0.1M
 - 1µl dNTP 10 mM ea
 - 1µl RNAsin (40U/µl)
- Ajouter 19µl de ce mélange dans chaque tube et préchauffer 3 minutes à 37°C
- Ajouter 1µl SuperScript II (200U/µl, BRL) et incuber :

15 minutes à 37°C

45 minutes à 42°C

15 minutes à 50°C

Si on souhaite arrêter à cette étape, ajouter 2µl EDTA 250 mM et placer à -20°C. On dispose à présent d'hybrides ADNc-ARNm sur billes

6. Techniques d'hybridation avec sondes radioactives

6.1. Les sondes

Une sonde est une séquence monocaténaire de désoxyribonucléides : complémentaire d'une partie de la séquence recherchée (ADN cible) et capable de s'hybrider avec elle, marquée de manière radioactive ou non. Une sonde permet donc de révéler spécifiquement après hybridation, une séquence d'ADN particulière, de la repérer et éventuellement de la quantifier.

Les sondes les plus employées sont les sondes d'ADN :

Le marquage d'une sonde radioactive ou non est effectué par incorporation enzymatique de précurseur(s) marqué(s) de manière uniforme, sur toute la longueur, pour les sondes de grandes tailles et en position terminale pour les oligosondes.

Le marquage classique fait appel à la radioactivité et on obtient ainsi des sondes "chaudes". L'isotope utilisé est généralement le P-32 dont l'énergie d'émission élevée confère à la sonde une haute sensibilité.

Les sondes froides, obtenues en utilisant un précurseur non radioactif, permettent d'éviter les inconvénients liés à la manipulation, dangereuse, de la radioactivité. Il s'agit dès lors d'un système enzymatique.

6.2. Southern

Après séparation de fragments d'ADN selon leur taille en gel d'agarose, il est possible d'effectuer la révélation spécifique d'une séquence particulière. Une empreinte "blot" du gel est effectuée sur une membrane de nylon chargée (Hybon-N⁺) par un courant capillaire ascendant ou descendant de tampon. L'ADN monocaténaire a la propriété de s'adsorber sur ce genre de membrane. Après adsorption, la fixation de l'ADN cible est rendue irréversible par chauffage (2 heures à 80°C) et l'hybridation peut être réalisée. Ensuite les bandes d'ADN recherchées sont visualisées après hybridation avec une sonde (fig. 6.1).

Protocole (1): Hybon-N⁺ (Amersham)

- Le gel est d'abord laissé 2x 30' dans une solution de dénaturation puis 2x 15' dans une solution de neutralisation.

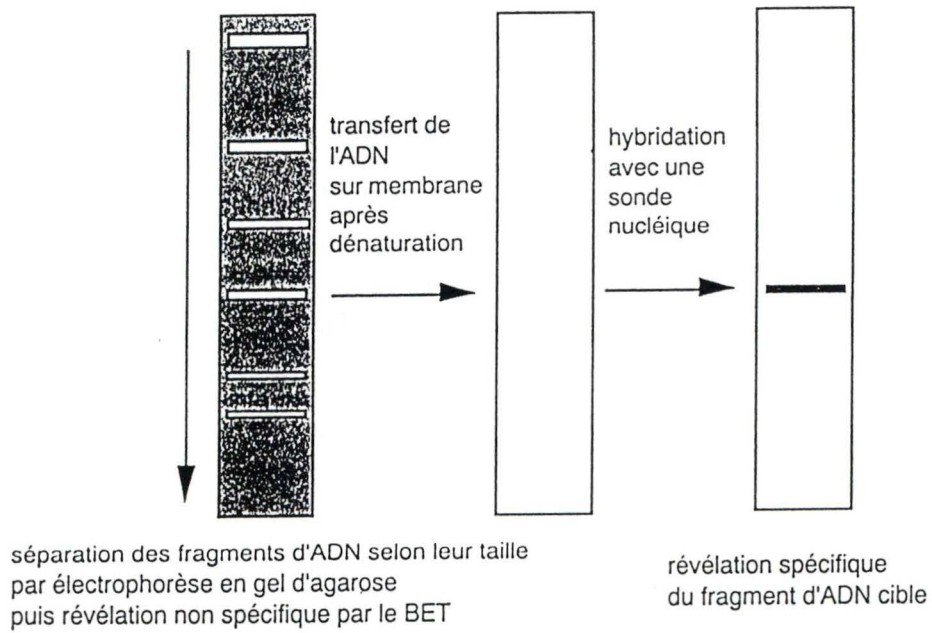


Figure 6.1 : Révélation spécifique d'un fragment d'ADN par la méthode de Southern.

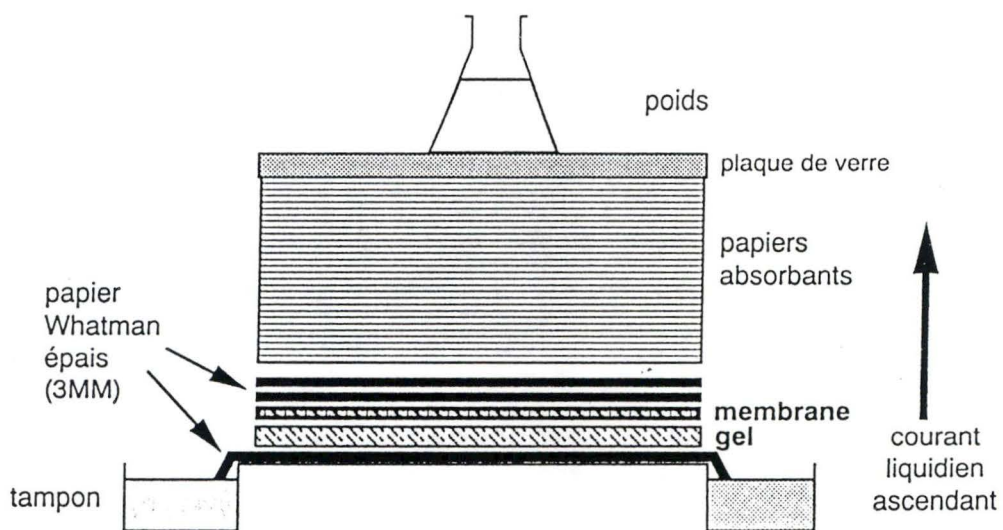


Figure 6.2 : Dispositif de transfert par capillarité.

- Montage du dispositif suivant la figure 6.2. Papier, membrane et gel doivent être de même dimension pour éviter les courants parasites hors du gel.
- Le tampon de transfert est le SSC 20x.
- Une languette de papier filtre épais (Whatman 3MM), saturée de tampon recouvre la plate-forme et trempe dans les bacs de tampon. Au-dessus de cette languette, on place 2 feuilles de papier filtre imbibées de tampon.
- Le gel est placé au-dessus, puis la membrane (Hybon-N⁺), en évitant les bulles d'air puis trois feuilles de papiers épais. La membrane et les deux premières feuilles sont préalablement mouillées avec du tampon SSC 2x afin d'initier le courant ascendant.
- On dispose ensuite une certaine épaisseur de papier absorbant sur laquelle est déposée une plaque de verre et un poids afin d'exercer une pression régulière.
- On laisse le transfert s'effectuer durant toute la nuit (de 2 à 24 heures). Ne pas oublier de faire un repère sur la membrane pour son orientation.
- Mettre la membrane 2 heures à 80°C.

Protocole (2): (Chomczynski, 1992)

Identique au premier, le système descendant est beaucoup plus rapide. Deux heures suffisent amplement (figure 6.2).

6.3. Dot blotting

C'est une technique qui consiste à déposer sur la membrane, à l'aide d'une pipette ou d'un dispositif commercialisé (blotteur BRL), des volumes définis de solution d'ADN cible dénaturé. Rapide, elle est aussi semi-quantitative, car elle permet d'estimer la quantité d'ADN cible déposé.

L'ADN est préalablement dilué dans du SSC 20x coloré. Le colorant permet la visualisation des blots.

Protocole : Hybon-N⁺ (Amersham)

Pour obtenir 2 duplicats :

- Resuspendre l'ADN des minipreps dans 50µl de TE
- Dénaturer 5' à 95°C et mettre sur glace
- Ajouter 50µl de SSC 20x bleu
- Spotter sur chaque filtre pré-imbibé de SSC 2x, 45µl de solution d'ADN
- Rincer les puits du blotteur avec 50µl de SSC 10x
- Dénaturer sur un papier "Whatman 17 Chr" imbibé de solution dénaturante (cfr. gel avant Southern) pendant 5 minutes
- Neutraliser pendant 1 minute
- Sécher à l'air et faire cuire une heure à 80°C.

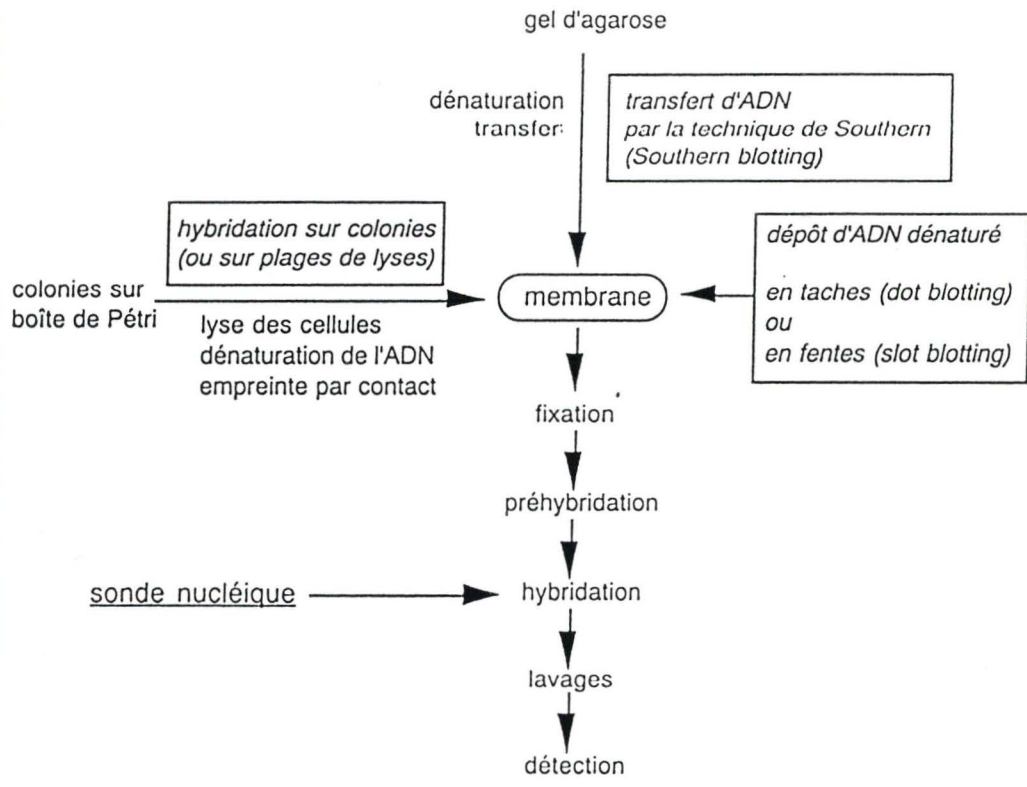


Figure 6.3 : Les différentes étapes des méthodes d'hybridation d'ADN sur membrane.

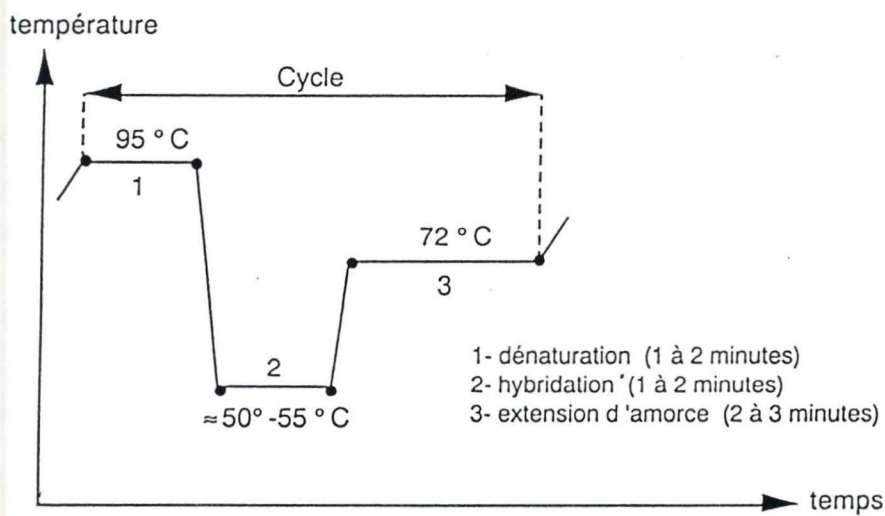


Figure 7.1 : Variations thermiques lors d'un cycle PCR.

6.4. Hybridation et lavages

L'hybridation proprement dite est toujours précédée d'une préhybridation, pour éviter par la suite la rétention non spécifique de la sonde sur la membrane. La solution de préhybridation contient des composés qui vont s'adsorber sur la membrane partout où l'ADN transféré est absent. Un résumé de la situation est proposé à la figure 6.3.

Protocole : Hybon-N+ (Amersham)

- Préhybrider 1 heure à 68°C.
- Ajout de la sonde (dénaturée à 95°C pendant 5'). Elle est laissée en contact avec la membrane pendant une nuit à 68°C pour éviter les hybridations non spécifiques

Pour l'hybridation, on dispose de peu d'ADN marqué. Or celui-ci doit être en concentration élevée pour augmenter la vitesse d'hybridation. Le volume de solution de préhybridation sera donc faible. Des lavages successifs sont alors effectués en augmentant si besoin est la température et en diminuant la force ionique, de manière à éliminer les éventuelles hybridations non spécifiques.

- Les deux premiers lavages dans une solution (1) SSC 1x, 0.1% SDS et d'une durée de 15 minutes.
- Les deux seconds lavages dans une solution (2) SSC 0.25x, 0.1% SDS et d'une durée de 10 minutes.
- Les derniers lavages se font dans une solution (3) SSC 0.1x, 0.1% SDS. Si besoin est on effectuera ces lavages à température plus élevée.

Il est courant que les derniers lavages n'aient pas lieu.

7. Polymerase Chain Reaction (PCR)

La PCR consiste à amplifier sélectivement une séquence particulière d'ADN par action répétée d'une ADN polymérase. Le fragment d'ADN à amplifier est compris entre deux séquences qui doivent être connues et sa longueur ne peut excéder 10 kb.

7.1. Principe

A l'ADN à amplifier sont ajoutés des dNTP, deux amorces oligonucléotiques, complémentaires chacune d'une séquence de l'un des brins, de part et d'autre de la région à amplifier.

Le mélange est placé dans un thermocycleur, appareil assurant automatiquement des variations cycliques de température.

Chaque cycle comprend trois étapes caractérisées par 3 températures différentes comme le montre la figure 7.1.

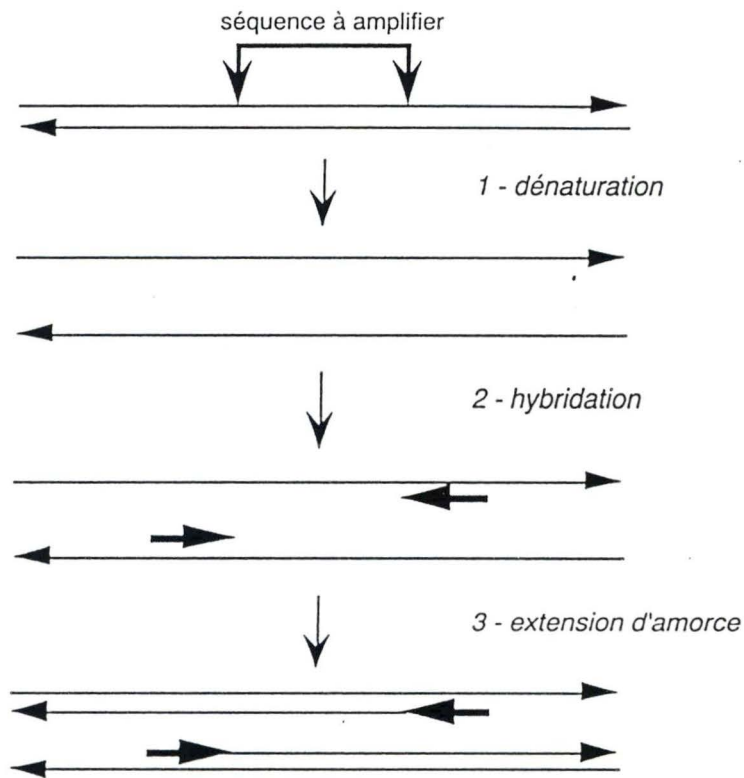


Figure 7.2 : Étapes du premier cycle PCR.

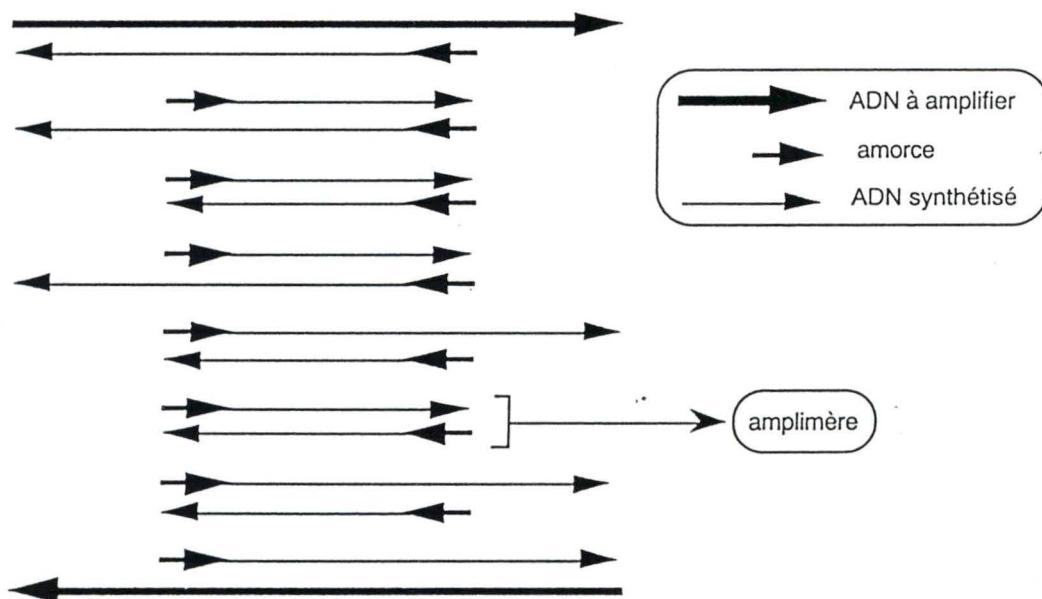


Figure 7.3 : Résultats de l'amplification après trois cycles.

Pour le premier cycle : dénaturation de l'ADN bicaténaire à 95°C.
 hybridation des amorces
 extension d'amorce par la Taq polymérase à 72°C.

Les séquences d'ADN synthétisées au premier cycle servent à leur tour de matrice pour le cycle suivant. L'ADN dont la longueur correspond à la distance entre les extrémités des deux amorces est appelé amplimère et constitue le produit PCR (figure 7.2 et 7.3). Le nombre de copies de ce fragment est doublé à chaque cycle et augmente exponentiellement. En moyenne, de 20 à 30 cycles sont effectués. En théorie, après 20 cycles, une molécule d'ADN est amplifiée 2^{20} fois, soit environ un million de fois. En pratique, l'amplification n'est pas exponentielle, surtout après 20 cycles, par suite de la consommation des amorces et de dénaturation thermique de la polymérase.

7.2. Aspects techniques

Une pré-dénaturation de l'ADN à amplifier est effectuée avant le premier cycle (Hot start). La durée de l'étape d'extension d'amorce du dernier cycle est allongée, si le matériel est amplifié en vue de clonage.

Le choix des amorces est particulièrement important pour la spécificité de l'amplification. Leur longueur, voisine de 20 nucléotides, doit permettre une hybridation rapide avec une séquence unique*. Les amorces ne doivent pas posséder entre elles de complémentarité. La température d'hybridation des amorces est égale à la T_f^* des amorces -5 à -10°C. A cette température, près de 90% des amorces sont hybridées. Le passage ultérieur à 72°C, température d'élongation, supprime les hybridations non spécifiques éventuelles.

La durée de chaque étape du cycle nécessite généralement une optimisation préalable en fonction de la longueur à amplifier et des amorces utilisées.

La puissance de la PCR a un effet pervers : la contamination par amplification d'un ADN cible de même nature. Des précautions doivent donc être prises telles que des contrôles positifs et négatifs.

* Ainsi pour un 17 mères (polymère de 17 bases), il existe 4^{17} ($17 \cdot 10^9$) séquences différentes possibles et l'on est quasi certain qu'une séquence de 17 bases sera unique dans le génome humain ($3 \cdot 10^9$ pb).

* Rappelons que l'on définit comme température de fusion T_f , la température à laquelle deux brins d'ADN sont associés par 50% de leurs séquences complémentaires. La T_f d'un appariement dépend de plusieurs facteurs : elle augmente avec la longueur et le pourcentage et GC de l'association. Ainsi, la T_f de l'hybridation d'une oligosonde peut être donné approximativement par la relation :

$$T_f = (4^\circ\text{C} \times \text{nbre paires GC}) + (2^\circ\text{C} \times \text{nbre de paires AT}).$$

Elle diminue lorsque le pourcentage de non appariement augmente et varie dans le même sens que la force ionique (Loncle, 1993).

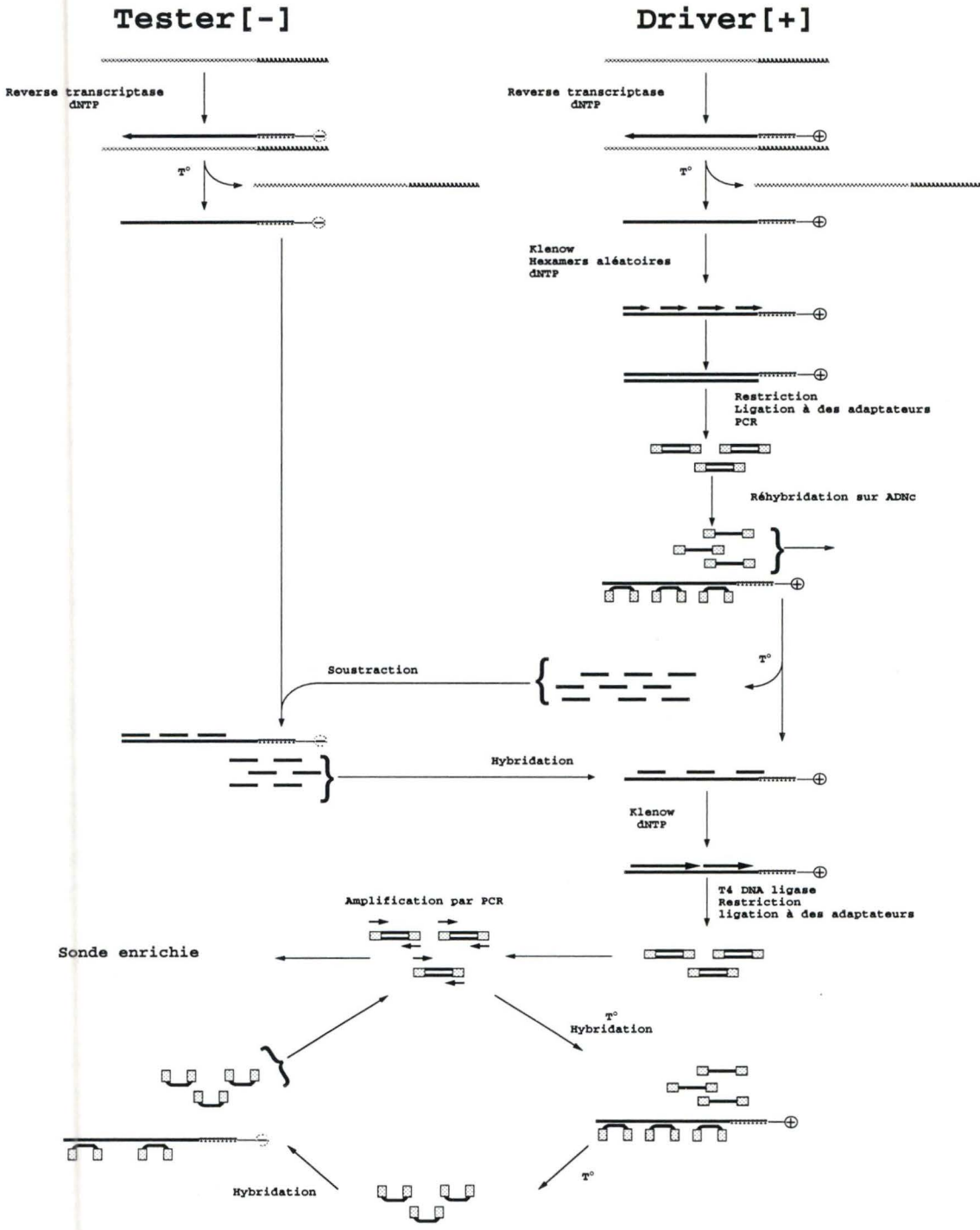


Figure 8.1 . Schéma de la soustraction sur billes comprenant les dernières modifications apportées.

7.3. Intérêt et applications

La PCR est de loin la méthode la plus efficace et la plus rapide d'amplification d'un ADN cible, c'est pourquoi elle est largement utilisée. Elle permet de mettre en oeuvre les techniques habituelles de génie génétique même si l'on ne dispose au départ que de très peu de matériel.

Protocole : Taq polymérase (BRL)

La quantité d'ADN à amplifier peut varier de 0.2µg à 2µg.

- Amener de préférence 1µg d'ADN à 10µl par l'ajout d'eau ou de TE.
- Assembler la réaction suivante dans un eppendorf de 500 ou 200µl :

MgCl ₂	4µl
Tampon PCR 10x	10µl
Détergent W1 1%	5µl
dNTP 10 mM ea	2µl
Amorce 5' 100 pmoles/µl	0.5µl
Amorce 3' 100 pmoles/µl	0.5µl
ADN (1µg)	10µl
eau distillée	67.6µl
Taq polymérase (U/µl)	0.4µl
Total	100µl

- Ajouter 70µl d'huile minérale afin d'éviter l'évaporation.
- Programmer le thermocycleur et y placer le tube PCR
- Lancer le programme.
- Vérification du produits PCR sur gel, purification, ...

8. Soustraction sur billes magnétiques

Un des problèmes avec les techniques de soustraction est que si les sources d'ARNm sont trop proches (au niveau ARNm), ou que l'on cherche à isoler des messagers rares, l'ARNm ou l'ADNc recherché est également soustrait. Dès lors il ne reste que très peu ou pas de produit à cloner ou à utiliser comme sonde. La technique proposée évite ce genre de problème. Un schéma global est proposé à la figure 8.1.

Protocole : Coche, 1994 avec modifications récentes

A. Réverse transcription du ARNm [+] et [-] sur billes.

- Suivre le protocole de synthèse d'ADNc sur billes pour soustraction.
- Éliminer le surnageant.

- Ajouter 50µl de TE; chauffer 3 minutes à 95°C. Éliminer le surnageant à chaud (contient le ARNm) répéter 2x.
 - Resuspendre les billes dans 25µl de TE
- A cette étape nous disposons de l'ADNc monocaténaire sur billes.

B. Préparation des billes [-] pour l'hybridation.

- Prendre 20µl des billes.
- Resuspendre toutes ces billes [-] dans 85µl d'eau.
- Ajouter 15µl NaOH 1N (0.15N final).
- Incuber 10 minutes sur table.
- Ajouter 50µl SSC 20x, capturer les billes et éliminer le surnageant.
- Laver les billes avec 100µl de SSC 5x.
- Transférer vers un tube de 0.5 ml et conserver sur glace.

Ces billes sont prêtes pour recevoir les fragments [+] communs.

C. Préparation des billes [+] pour l'hybridation.

- Prendre les 5µl restant de billes.
- Placer le reste des billes à -20°C.
- Random Prime avec le kit BRL.
- Laver les billes 2x avec 100µl de TE.
- Ajouter :
 - 2µl Tampon *E. Coli* DNA ligase I 10x
 - 17µl eau distillée
 - 1µl *E. Coli* ligase I (U/µl)
- Incuber 1 heure à 16°C.

D. Restriction et ligation d'adaptateurs "lone linkers".

Attention, restriction et ligation se faisant en même temps, il faut veiller à ce que les deux enzymes utilisées soient dans un tampon qui leur convient. C'est pourquoi le tampon utilisé est le KGB (Sambrook, 1989).

- Laver les billes 2x avec 50µl KGB 0.5x; éliminer le surnageant.
- Ajouter dans l'ordre :
 - 5µl KGB 2x
 - 10µl eau
 - 1µl RsaI
 - 1µl ATP 10 mM
 - 2µl adaptateurs (*)
 - 1µl ligase T4 (1U/µl)

*1μl πAB (100 pmoles) + 0.7μl πAB' (100 pmoles) + 2.5 μl KGB 2X + 5.8 μl eau; chauffer 3 minutes à 80°C; 10 minutes sur table.

- Description des adaptateurs correspondants à une hybridation entre l'oligonucléotide πAB et l'oligonucléotide πAB':

πAB	Amorce 5'	AGG GAT CCC AGG CTG GGA AGG A
πAB'	Amorce 3'	TCC CTA GGG TCC GAC CCT TCC TA

Une fois hybridés, ils ont l'aspect suivant :



Site restriction BamHI

Dans cette étape les molécules bicaténaire sont restreintes par RsaI et des adaptateurs sont ajoutés aux extrémités des fragments bouts-francs simultanément.



- Incuber 2 heures à 37°C ou 12 heures à 20°C.

E. Amplification.

- Assembler la réaction PCR (Taq polymerase BRL):

Réaction de ligation	2μl
MgCl ₂ 50 mM	4μl
Tampon Taq 10x	10μl
détergent W1 1%	5μl
dNTP 10 mM ea	2μl
πAB' (100 pmoles)	0.7μl
eau distillée	75.6μl
Taq polymérase (2U/μl)	0.4μl
huile minérale	70μl

- Programme :

(10', 72°)+30x(1'15, 94°+1'15, 60°+2', 72°)+(4°)

La première incubation à 72°C permet de réparer les extrémités 3'-OH. En effet, les linkers n'étant pas phosphorylés en 5', la ligation ne peut avoir lieu du côté 3' des ADNc. Pas de "hot start"!

- Éliminer l'huile minérale avec de l'éther saturé avec de l'eau ou 5x SSC/1 mM EDTA.
- Vérifier 10µl sur gel d'agarose 2%.

Utiliser l'Orange G comme colorant pour les échantillons. Il permet la visualisation de fragments de petite taille sans interférence.

F. Purification du produit PCR.

- Purifier le produit PCR en utilisant une matrice d'affinité (Prep-A-Gene).
- Vérifier 10µl de la récupération sur gel d'agarose 2%.

G. Hybridation du produit PCR aux billes [+]

- Hybrider le produit PCR au l'ADNc [+] sur billes :

Éliminer le surnageant de 5µl de billes [+] (fin du point **A**)

Dénaturer le produit PCR purifié, 5 minutes à 95°C et mettre sur glace

Ajouter rapidement aux billes :

12.8µl produit PCR dénaturé

5.2µl SSC 20x

2µl EDTA 10 mM

huile minérale

- Incuber 24 heures à 55°C.

L'excès molaire de produit PCR par rapport à l'ADNc accélère la vitesse d'hybridation et permet l'hybridation de séquences rares. Cette étape permet de rétablir un rapport molaire [+]/[-] adéquat.

- Capturer les billes et éliminer le surnageant (conserver à -20°C).

- Rincer les billes 2x avec :

12.4µl eau distillée

5.2µl SSC 20x

2µl EDTA 10 mM

0.4µl ARNt 10 mg/ml, le tout à 55°C

- Resuspendre les billes dans 20µl de la même solution.

- Chauffer 5 minutes à 94°C

- Récupérer le surnageant à chaud.

H. Hybridation.

- Ajouter le surnageant aux billes [-] dont on a enlevé le surnageant (fin du point B).

- Ajouter 40µl d'huile minérale. Chauffer 3 minutes à 95°C et placer le tube à 55°C.
- Incuber de 24 à 48 heures. Agiter en continu ou occasionnellement.
- Extraire l'huile minérale avec de l'éther saturé.
- Capturer les billes à chaud (le surnageant contient les fragments d'intérêt).
- Resuspendre les billes dans 20µl de TE.

Les fragments soustraits possèdent des adaptateurs et peuvent donc être amplifiés directement.

- Amplification :

fragments soustraits	2µl
MgCl ₂ 50 mM	4µl
Tampon Taq 10x	10µl
détergent w1 1%	5µl
dNTP 10 mM ea	2µl
πAB' (100 pmoles)	0.7µl
eau distillée	75.6µl
Taq polymérase (2U/µl)	0.4µl
Huile minérale	60µl

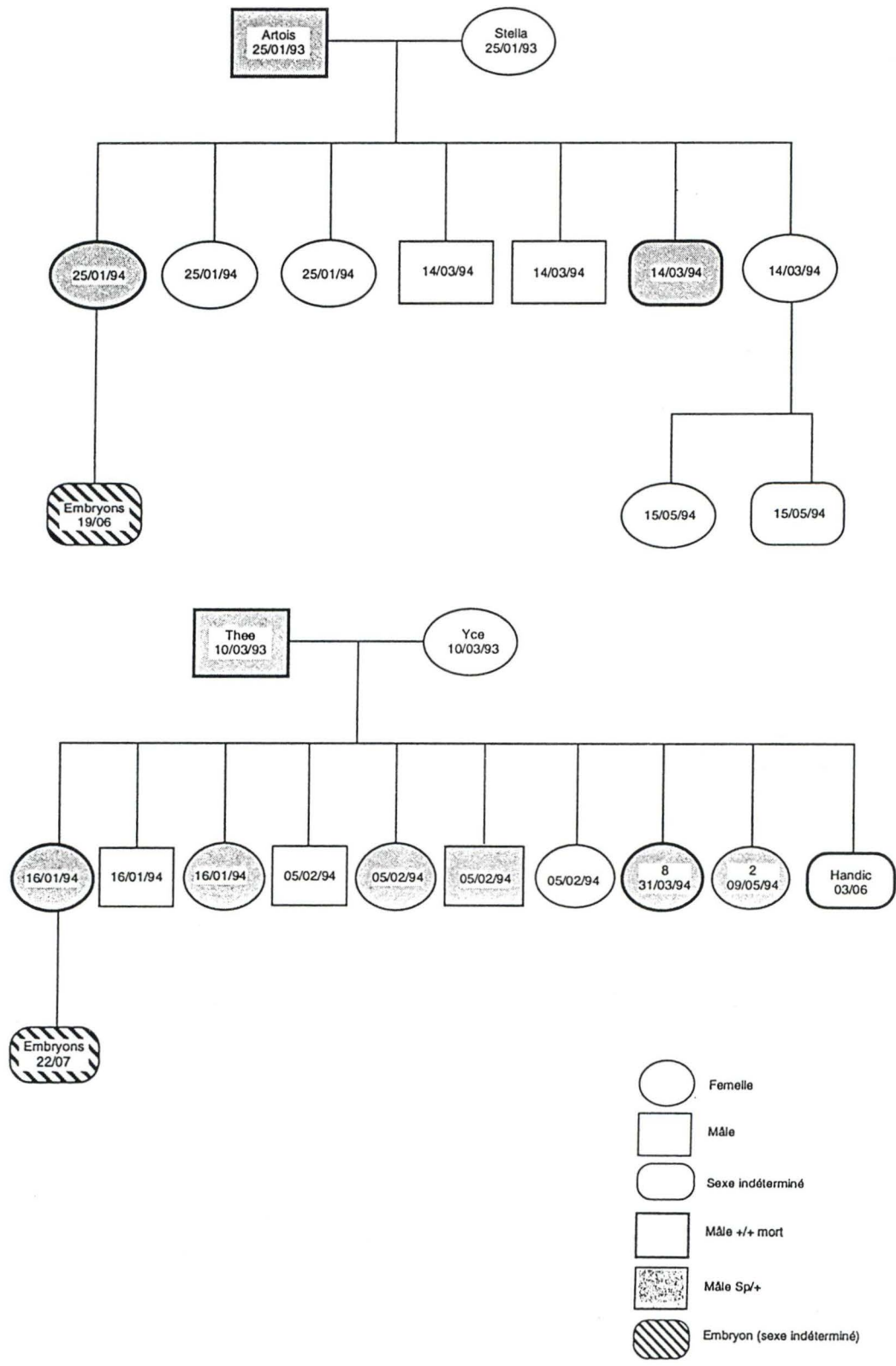
- Programme :
30x(1'15, 94°+1'15, 60°+2', 72°)+(4°)
- Vérifier 10µl sur gel d'agarose 2%

I. Seconde soustraction.

- Reprendre au point H sans oublier la préparation de l'ADNc [-].

RÉSULTATS.

Figure 1.1 : Arbres généalogiques des couples de souris à l'origine des embryons Sp/Sp obtenus.



C. Résultats.

1. Elevage

Parmi les descendants des couples originaux, dont l'arbre généalogique est représenté à la figure 1.1, les femelles hétérozygotes ont été croisées avec leur père (lui-même hétérozygote), afin d'obtenir des embryons homozygotes "splotch" (Sp/Sp). En effet, le croisement hétérozygote - hétérozygote donne les types d'**embryons** suivants : des homozygotes sauvages (+/+) et des hétérozygotes (Sp/+), (au phénotype identique) ainsi que des homozygotes "Splotch" (Sp/Sp), recherchés pour l'expérience.

2. Génotypage

Le but du génotypage est d'être sûr du matériel utilisé, en particulier de distinguer l'hétérozygote Sp/+ de l'homozygote sauvage. Pour rappel, chez les **adultes** il est possible de distinguer, de par leur phénotype, un homozygote sauvage d'un hétérozygote; celui-ci présente une "tache blanche" sur l'abdomen. Le phénotype de l'adulte homozygote Sp est inexistant puisque l'embryon meurt au 14ème jour de gestation. Par contre, chez les **embryons**, le phénotype "tache blanche" n'est pas visible; et une distinction hétérozygote - homozygote sauvage n'est pas réalisable. Phénotypiquement, chez l'embryon, il n'est possible que de distinguer l'homozygote Sp/Sp qui présente des anomalies telles que exencéphalies,... (fig. A5.4). Un homozygote sauvage ne présente aucun signe le distinguant d'un hétérozygote. De plus, certains autres problèmes du développement ou non peuvent fausser notre diagnostic phénotypique.

2.1. Méthodologie

La technique utilisée pour vérifier si un individu (embryon ou adulte) est Sp/Sp, Sp/+ ou +/+ est basée sur la différence de taille du gène Pax-3 entre le sauvage et le mutant. Rappelons que la mutation Sp^{2H} résulte d'une délétion de 32 nucléotides dans le gène Pax-3. Pour ce faire, une PCR est effectuée. Les amorces utilisées sont les suivantes. Ce sont des 24-mères. Voici leur séquence :

Amorce 3'	C CTC GGT AAG CTT CGC CCT CTG GG
Amorce 5'	GTC GCG TCC TCG TCT TGG TGG AAG

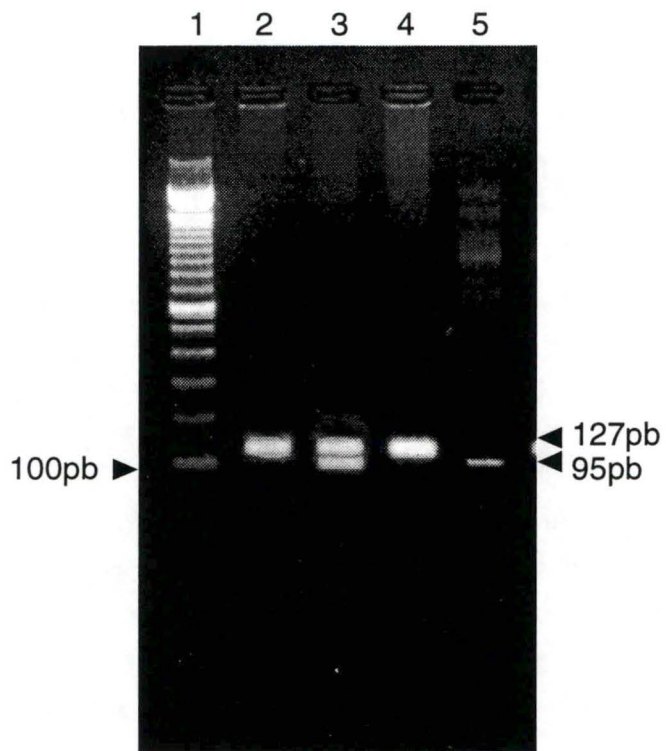


Figure 2.1 : Gel d'électrophorèse 2% des fragments amplifiés par PCR de génomique (pistes 3, 4 et 5) et d'ADNc (piste 2). Les primers utilisés (décrit au § C2.1) chevauchent la partie du gène déléetée chez le mutant.
 Piste (1) : marqueur 100pb; (2) sauvage; (3) hétérozygote; (4) sauvage; (5) homozygote splotch.

Le programme suivi :

- Une dénaturation de 2' à 94°C, suivie de 30 cycles de 1'30 à 94°C, 1'30 à 60°C et 1'15 à 72°C. Une phase d'élongation de 1'15 est largement suffisante pour la taille des fragments à amplifier.
- Le contrôle négatif de la PCR permet de vérifier l'absence de contaminants. Le tube contrôle comprend toutes les solutions du mélange PCR à l'exception d'ADN.

La Taq polymérase amplifie la partie du gène où se situe la délétion. Chez le sauvage, cette région est de 127 pb. Chez le mutant "Splotch" homozygote, la partie amplifiée (raccourcie de 32 nucléotides) n'est que de 95 pb. Chez l'hétérozygote, une copie intacte et une copie délétée sont amplifiées.

L'utilisation d'ADN génomique n'est pas indispensable; l'ADNc peut également être utilisé.

2.1.1. Méthode par extraction d'ADNg

D'une partie de l'embryon à génotyper -l'autre partie servant pour la synthèse du matériel pour la soustraction- est extrait l'ADN suivant la méthode du § B4.1.

1 ng de l'ADN obtenu est prélevé et sert pour la réaction PCR décrite au § B7.3.

2.1.2. Méthode à partir d'ADNc

A partir de l'ARN extrait suivant la méthode au Trisolv (§ B5.1), l'ADNc est synthétisé suivant la méthode décrite au § B5.3.

2µl d'ADNc simple brin sur billes sont prélevés et ajoutés au mélange PCR.

Le mélange subit un cycle. Les billes sont éliminées à chaud. Le surnageant est transféré dans un autre eppendorf afin de poursuivre la PCR normalement (§ B7.3).

2.2 Résultats

Après amplification, 10µl d'échantillon sont déposés sur gel d'agarose 2%. Les résultats sont présentés à la figure 2.1. Ils mettent en évidence l'amplification soit une seule bande à 127 pb (pistes 2 et 4), ce qui correspond à un homozygote sauvage, soit une seule bande à 95 (piste 5), ce qui correspond à un homozygote "Splotch" ou deux bandes de moindre intensité une à 95 l'autre à 127 pb (piste 3), correspondant à un hétérozygote. Nous avons donc pu mettre en évidence les différentes tailles du fragment amplifiable et par là même en déduire le génotype des embryons.

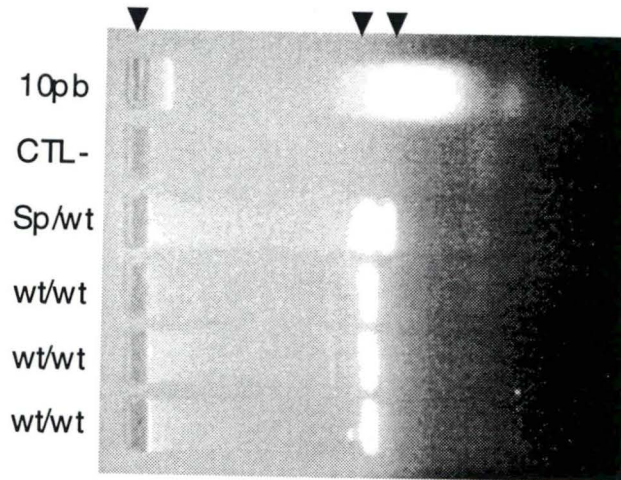


Figure 2.2 : Gel d'électrophorèse 2% des fragments du produit d'amplification PCR d'ADN génomique à partir des primers décrits au § C2.1
 Piste (1) : marqueur 10pb; (2) CTL-; (3) hétérozygote; (4, 5 et 6) sauvages.

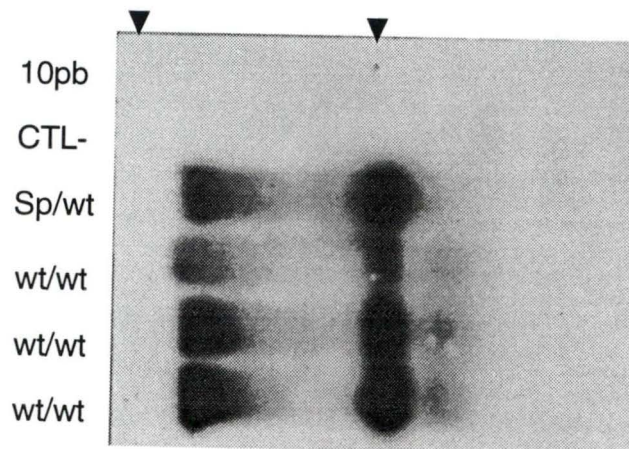


Figure 2.3 : Southern. Autoradiographie après transfert du gel de la figure 2.2 sur membrane et après hybridation avec une sonde Pax-3.

De plus, un Southern (fig. 2.3) avec Pax-3 sauvage comme sonde fut effectué sur le gel de la figure 2.2. Le gel 2.2, en plus des bandes amplifiées lors de la PCR révèle la présence de matériel de haut poids moléculaire, probablement un reste de matériel génomique présent dans le mélange PCR. Sur ce gel, les bandes amplifiées par la PCR sont reconnues par la sonde. Il s'agit bien de fragments du gène Pax-3. Un signal est également présent au début des pistes (à la hauteur des hauts poids moléculaires); ce signal correspondrait à l'hybridation de la sonde Pax-3 aux séquences complémentaires présentes dans le matériel génomique et a de l'hybridation non spécifique.

3. Mise en évidence d'une différence d'expression entre un embryon sauvage (+/+) et un *spotch* (Sp/Sp)

On cherche à mettre en évidence l'expression différentielle des gènes sous le contrôle transcriptionnel (en aval) du gène Pax-3. L'ARN est prélevé chez des embryons, au 14^{ème} jour de la gestation, moment où l'embryon Sp/Sp meurt. Depuis plusieurs jours, certains gènes sont exprimés différemment. Certains gènes qui normalement devraient être exprimés ne le sont peut-être plus et/ou certains gènes qui devraient être réprimés ne le sont peut-être plus; ce qui aurait comme conséquence de perturber le bon déroulement de l'embryogenèse (cfr. A.5.1.2). Nous effectuons une soustraction sur billes magnétiques. Le produit ainsi obtenu est cloné dans le plasmide pSK. Les transformants obtenus sont soumis à un "dot blot" avec les sondes suivantes : Sp/Sp, Sp/+ ou +/+ réalisées sur de l'ARN.

3.1. Contrôle positif de la méthode

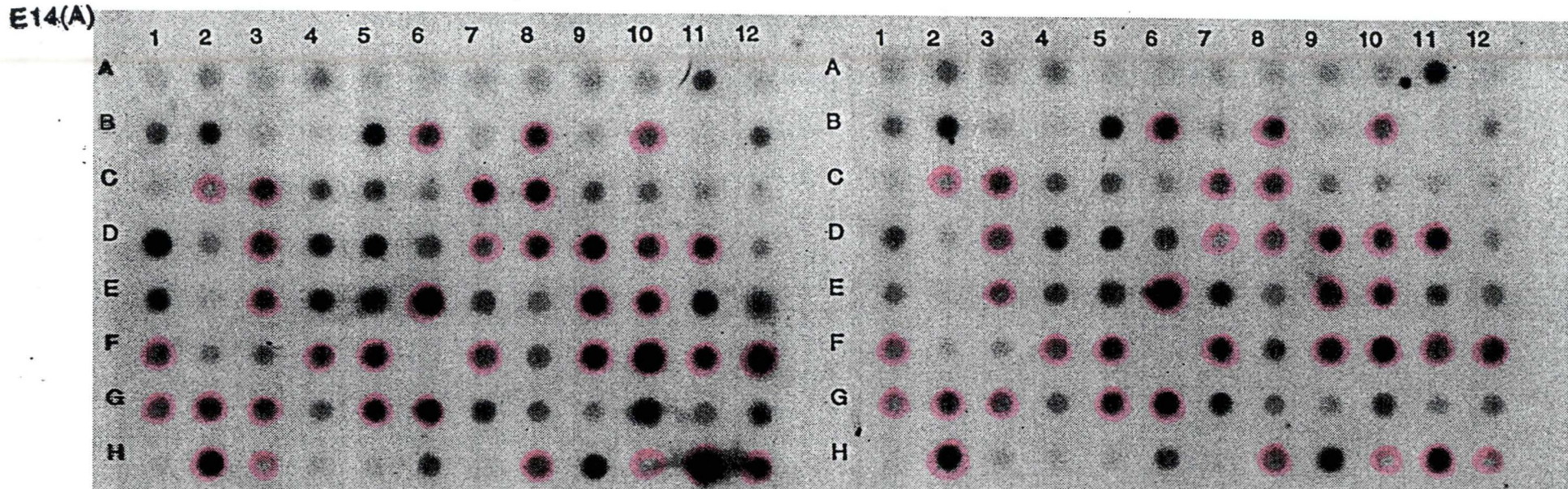
Comme contrôle positif, nous prenons les résultats déjà obtenus par cette méthode au laboratoire. Voici un exemple de ce que l'on peut obtenir.

La soustraction est effectuée entre des embryons 11 jour [E11] et des embryons 14 jour [E14], dans le sens [E14] moins [E11], afin de mettre en évidence des gènes intervenant dans le développement embryonnaire. Après trois cycles de soustraction, le produit est cloné dans une matrice (pSK). Les colonies blanches sont prélevées et la vérification de la présence d'un insert est vérifiée avant la mise sur membrane pour "dot blot".

L'ADN plasmidique de 96 clones comprenant un insert est déposé en quantité équivalente sur quatre membranes.

Le sondage de 2 membranes en duplicat, membrane E11(A) et E11(B) est effectué avec une sonde 11 jour tandis que pour les 2 autres duplicats E14(A) et E14(B) il s'agit une sonde 14 jour.

E14(B)



E11(B)

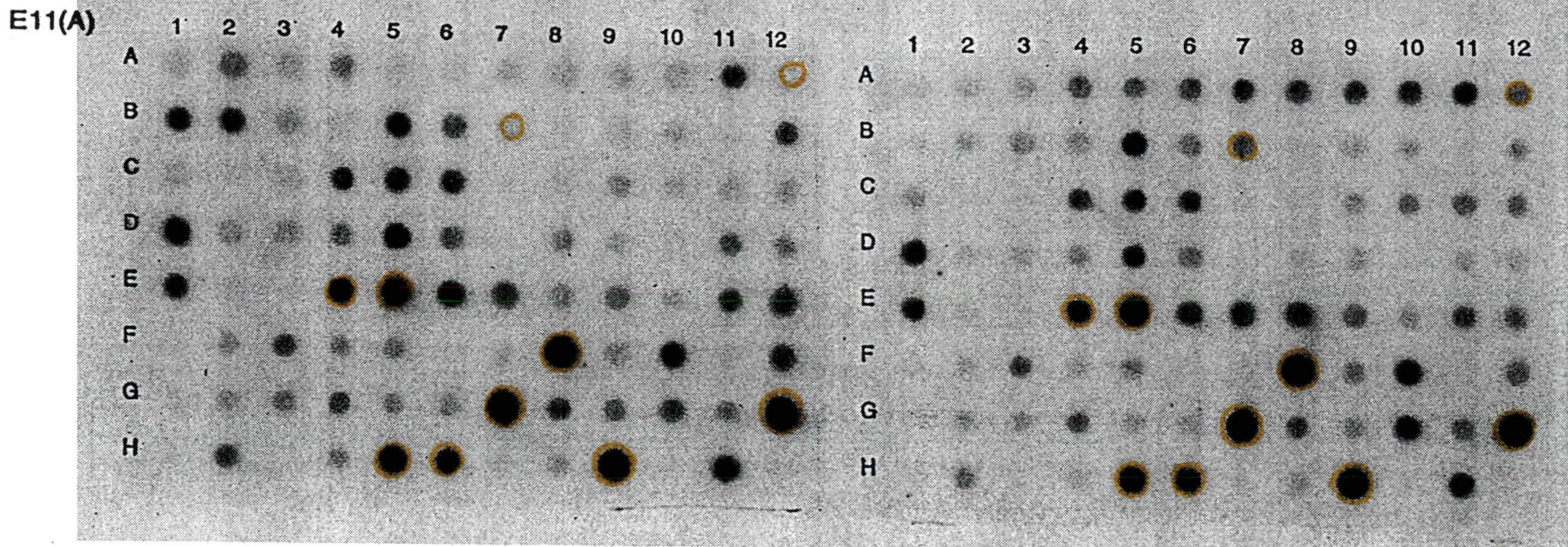


Figure 3.1 : (ci-contre)

Autoradiographie du Dot blot [E14] moins [E11].

E14(A), E14(B) = dupliquats avec sonde E14.

E11(A), E11(B) = dupliquats avec sonde E11.

Les spots B 3, 5, 7,
 C 5, 6, 10, 11
 D 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10
 E 3, 4, 7, 10
 F 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9
 G 7, 8, 10, 11, 12
 H 1, 2, 3, 5, 10, 11

sont des spots qui apparaissent ou qui sont allumés de manière plus intense avec la sonde E14. Ce sont des candidats potentiels.

Les spots A 1
 E 8, 9
 F 5
 G 1, 6
 H 4, 7, 8

allumés plus fortement avec la sonde E11 s'expliquent de la manière suivante : ils correspondent à des gènes présents à 11 et 14 jour qui, s'exprimant fortement le jour 11 et on réussit à échapper à la soustraction.

La soustraction est effectuée dans le sens 14 jour moins 11 jour ([E14] moins [E11]). On s'attend à enrichir par soustraction les gènes exprimés préférentiellement au jour 14. Dès lors, l'objectif recherché est d'avoir des clones qui s'allument avec la sonde E14 alors qu'ils ne le sont pas ou beaucoup plus faiblement au jour 11. Les clones intéressants seront donc allumés sur E14(A) et (B) et éteints ou allumés plus faiblement sur les membranes E11(A) et (B).

Les résultats obtenus sont présentés à la figure 3.1.

37 clones sur 96 s'allument de manière plus intense avec la sonde E14. Après trois cycles de soustraction, 30% des clones obtenus sont apparemment exprimés différemment (contiennent un insert intéressant) et sont donc des candidats potentiels au titre de gènes du développement spécifiques du jour 14. Après séquençage, certains gènes se sont avérés être des gènes connus, spécifiques du cerveau et régulés au cours du développement. D'autres sont inconnus et sont en cours de caractérisation au laboratoire.

3.2. Obtention du matériel

Après génotypage, l'ARN d'un embryon sauvage et celui d'un "Splotch" sont extraits suivant la méthode classique au Trisolv (§ B5.1). L'ADNc est obtenu en suivant le point B5.3. La présence de l'ADNc est vérifiée par la méthode de génotypage sur ADNc (§ C2.1.2), ce qui permet par la même occasion de confirmer le génotype.

Le mode de régulation de Pax-3, activateur ou répresseur n'est pas connu. L'expérience est conduite dans les deux sens; c'est-à-dire que l'ADNc Sp/Sp est à tour de rôle le produit [+] "tester", ou le produit [-] "driver". En d'autres mots, deux soustractions sont effectuées; l'une dans le sens Sp/Sp moins ++ et l'autre dans le sens ++ moins Sp/Sp.

3.2. Premier cycle de soustraction

3.2.1. Expérience

La synthèse d'ADNc [+] et [-] sur billes est suivie de la restriction du produit [+] par RsaI.

Site de restriction RsaI :



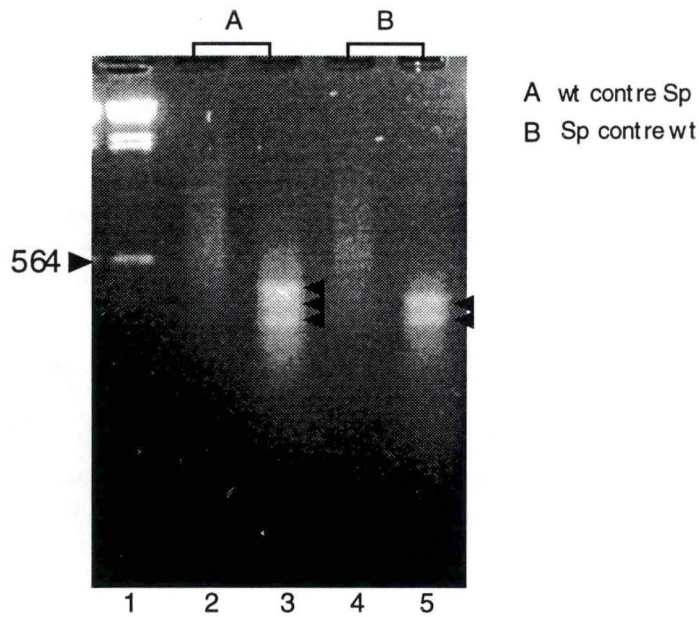


Figure 3.3 : Gel d'agarose de 1.8%

Piste (1) : marqueur de poids moléculaire λ .

Pistes (2) et (3) : $+/+$ moins Sp/Sp

Pistes (4) et (5) : Sp/Sp moins $+/+$

Dans les pistes (3) et (5) : produits issus de la première soustraction après PCR.

Dans les pistes (2) et (4) : produits avant soustraction

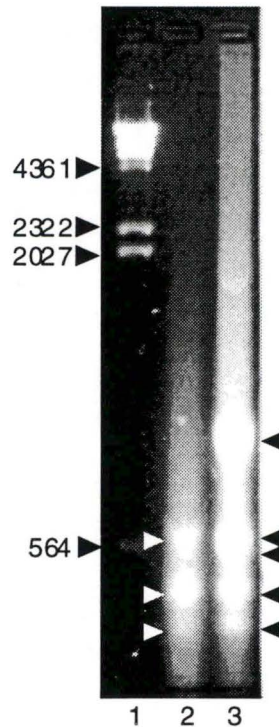


Figure 3.4 : Gel d'agarose de 1.7%

Différence entre les produits PCR $+/+$ contre Sp/Sp et Sp/Sp contre $+/+$ après la deuxième soustraction.

Piste (1) : λ ; Piste (2) : Produit Sp/Sp moins $+/+$; Piste (3) : Produit $+/+$ moins Sp/Sp.

Les adaptateurs (amorces hybridées πAB , $\pi AB'$) sont ligués au produit [+] restreint.

πAB	Amorce 5'	AGG GAT CCC AGG CTG GGA AGG A
$\pi AB'$	Amorce 3'	TCC CTA GGG TCC GAC CCT TCC TA

Hybridés, ils ont l'aspect suivant :



Site restriction BamHI

Les fragments d'ADNc avec adaptateurs [+] sont amplifiés. Le produit d'amplification est hybridé sur des billes [+] pour rétablir la stoechiométrie correcte en fragments [+].

La soustraction est réalisée en hybridant le produit [+] sur les billes [-] et est suivie de l'amplification des fragments soustraits (cfr. fig. 8.1).

3.2.2. Résultats

Le résultat du produit de la première soustraction, après amplification, est visible sur la photo de la figure 3.3. Certaines bandes apparaissent de manière plus prononcées après soustraction. Elles sont indiquées par des flèches. On remarque également une différence entre les bandes obtenues par soustraction Sp/Sp moins +/+ et la soustraction "retour" +/+ moins Sp/Sp. Dans le produit Sp/Sp moins +/+ apparaissent deux bandes majoritaires. Du produit +/+ moins Sp/Sp ressort, après amplification, trois bandes. A ce stade, il n'est pas possible de dire si ces bandes correspondent à un produit différentiel ou non.

3.3. Deuxième cycle de soustraction

3.3.1. Expérience

Le produit de la première soustraction est réhybridé à des billes [+] pour rétablir la stoechiométrie, avant d'être réhybridé aux billes [-]. Le produit soustrait est à nouveau amplifié.

3.3.2. Résultats

Le deuxième cycle de soustraction fait apparaître, dans la soustraction Sp/Sp moins +/+, trois bandes de produits majoritaires (fig. 3.4), alors qu'il n'en ressort que deux dans le produits après la première soustraction. Dans

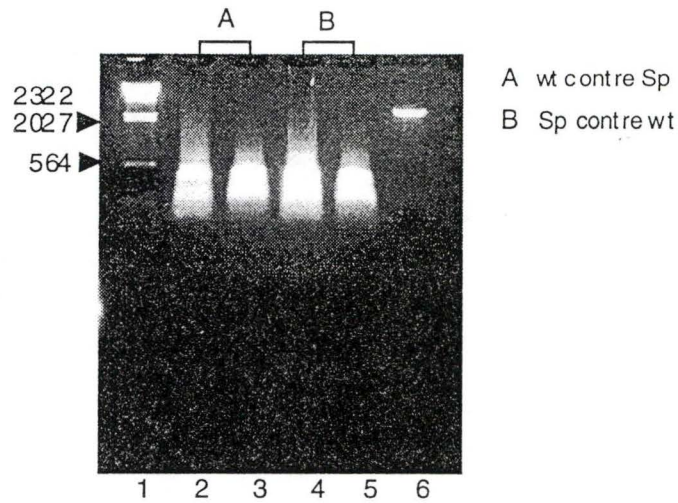


Figure 4.1 : Gel d'agarose 1.8% de la restriction par BamHI des produits de première et deuxième soustraction, +/+ moins Sp/Sp et Sp/Sp moins +/+ ainsi que produit de restriction de la matrice pSK par la même enzyme.
 Pistes (2) et (3) : Sp/Sp moins +/+, première et deuxième soustraction.
 Pistes (4) et (5) : +/+ moins Sp/Sp, première et deuxième soustraction.

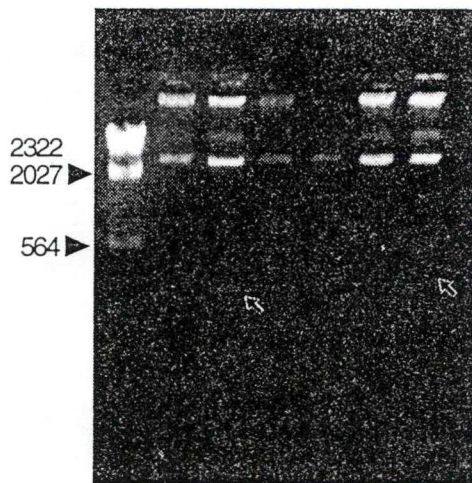


Figure 4.3 : Sur gel d'agarose 2% visualisation de la présence d'insert dans 2 cas sur 6.

le produit de soustraction +/- moins Sp/Sp, il apparaît cinq bandes majoritaires, alors qu'après le premier cycle, il n'y en avait que trois.

4. Clonage du produit de soustraction

4.1. Restriction

Lors de la récupération des produits de soustraction, celui de la deuxième fut perdu. Le clonage se fait donc avec le matériel de la première soustraction. La matrice choisie est le pSK. La restriction de la matrice par BamHI est suivie d'une déphosphorylation qui empêche la matrice de se refermer sur elle-même. Le produit à cloner est également restreint par BamHI (site présent dans les adaptateurs). Vérification sur gel (fig. 4.1).

Site de restriction BamHI



4.2. Ligation

La matrice et les fragments coupés par la même enzyme BamHI sont ligués.

Un rapport de trois inserts pour une matrice est préférable pour la stoechiométrie de la réaction de ligation. La taille des inserts est comprise entre 300 et 1000 pb contre 3000 pour la matrice. Un rapport de 1/3 est déjà établi. Pour assurer un meilleur rendement, nous doublerons quand même la concentration en inserts.

Concentration en matrice = 200 ng/ μ l

Concentration en produit à cloner = 200 ng/ μ l

Le mélange de ligation est donc le suivant :

2 μ l d'inserts

1 μ l de matrice restreinte (200 ng)

2 μ l de tampon de ligation

14 μ l d'eau distillée

1 μ l de T4 DNA ligase (1U/ μ l)

Ce mélange est laissé une nuit à 16°C.

4.3. Transformation

1 μ l (\approx 15 ng) du mélange de ligation est introduit dans la souche XL1-Blue par électroporation. Les cellules de ce mélange sont étalées sur des boîtes AXI (Ampicilline, X-gal, IPTG).

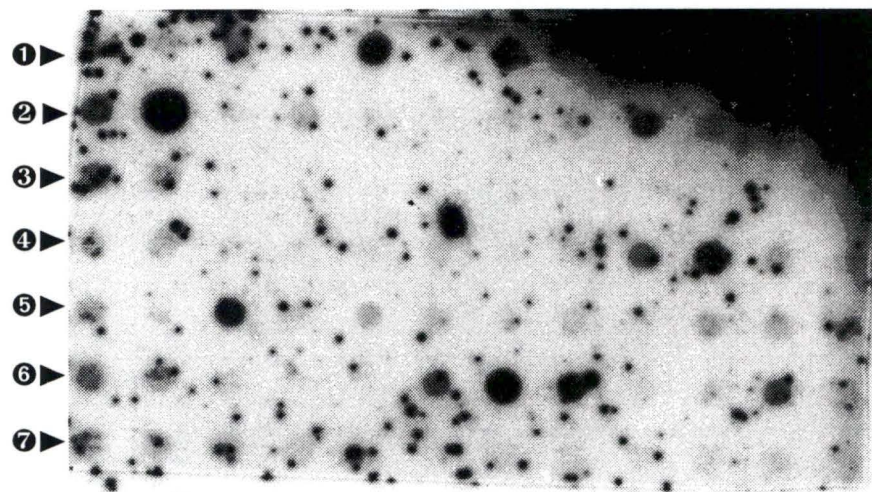


Figure 4.4 : Autoradiographie du dot blot avec sonde hétérozygote (+/Sp).
 Lignes (1), (2), (3), (4) et (5) : +/+ moins Sp/Sp
 Lignes (6) et (7), Sp/Sp moins +/+

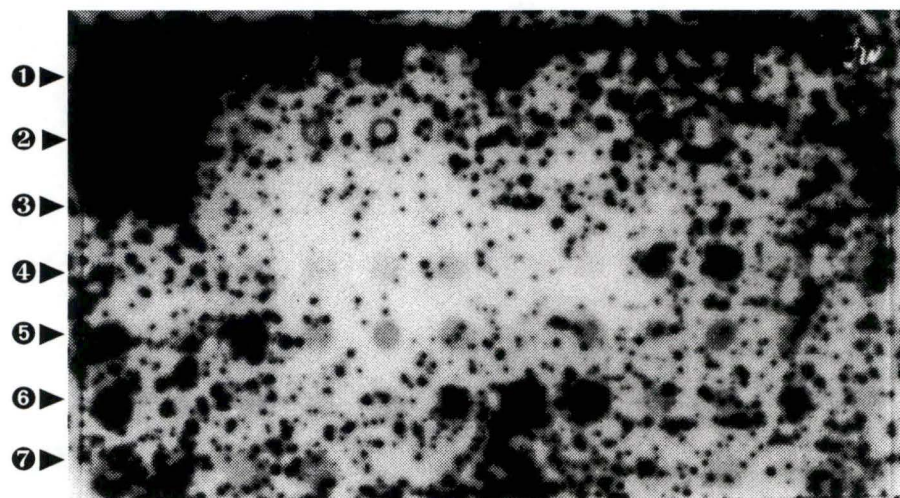


Figure 4.5 : Autoradiographie du dot blot avec sonde sauvage (+/+).
 Lignes (1), (2), (3), (4) et (5) : +/+ moins Sp/Sp
 Lignes (6) et (7), Sp/Sp moins +/+

4.4. Test blanc/bleu

Les colonies blanches comprenant vraisemblablement le plasmide avec *lacZ'* disrupté sont prélevées. La disruption de *lacZ'* peut être due à différentes constructions.

On mesure le pourcentage de faux positifs. Pour ce faire, on prépare l'ADN plasmidique de 6 clones par mini prep (§ B.4.3) et on vérifie la présence de plasmide dans les colonies sélectionnées. Toutes les colonies contiennent le plasmide. On vérifie, par restriction, la présence d'insert (fig. 4.3).

Le pourcentage de plasmides avec insert est estimé à 33%. Un tiers des 76 colonies sélectionnées, c'est-à-dire 25, sont supposées posséder un insert.

4.6. Dot blot

Une quantité équivalente d'ADN plasmidique par puits est déposée sur les membranes (deux membranes répliquats). Afin de visualiser les différents dépôts, le produit déposé a été additionné de bleu de bromophénol.

Après 2 heures de séchage à 80°C, les membranes sont stockées dans des boîtes de Pétri, avant d'être utilisées pour l'hybridation avec la sonde.

Trois sondes différentes, une Sp/Sp, une Sp/+ et une +/+ doivent être testées. Ces sondes ont été préparées sur de l'ADNc simple brin couplé à des billes (cfr. § B3.4).

a) Sondes Sp/+ et +/+






La sonde Sp/+ et la sonde +/+ sont lancées chacune sur une membrane. Le résultat donné (avec sondes wt et hétérozygote) par l'autoradiographie après 4 lavages (2 avec la solution de lavage 1, et 2 avec la solution de lavage 2 cfr § B 6.4) et 1 semaine d'exposition est présenté aux figures 4.4 et 4.5. Une représentation sous forme de tableau (page suivante) facilite l'interprétation des résultats. Il y a 19 clones sur 76 qui sont allumés par les sondes et qui par conséquent contiendraient bien un insert. Ce chiffre est inférieur au résultat escompté, qui était de 25 clones si on admet que +/- 30% des clones contiennent un insert. Le solde représente les clones qui possède un insert qui provient de messagers dont le niveau d'expression est en dessous du seuil de détection du dot blot.

Lors de la vérification de la présence d'insert, 4 clones sur 12 en ont un. Ce sont les n° 137 (non allumé), 148 (allumé), 217 (allumé) et 221 (non allumé). Il est permis de suspecter la présence d'un insert pour le clone 211.

Les clones ne possédant pas d'insert sont les n° 102, 112, 118, 124, 132, 136 et 153. Aucun de ces derniers ne s'allume.

Six clones sont apparemment différentiels. Il s'agit des clones n° 106, 138, 139, 150, 201 et 208.

Légende :

	Spots présents partout de manière équivalente
	Spots présents et absents sur l'autre membrane
	Spots présents à plus faible intensité d'une membrane à l'autre
	Spots présents à plus forte intensité d'une membrane à l'autre
	Spots absents (non visibles)

Dot blot avec sonde hétérozygote

wt

101	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125
126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137
138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149
150	151	152	153	154							

Sp

201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212
213	214	215	216	217	218	219	220	221			

Dot blot avec sonde sauvage

wt

101	103	104	105		107	108	109	110	111	112	113
114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125
126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137
138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149
	151	152	153	154							

Sp

	202	203	204	205	206	207		209	210	211	212
213	214	215	216	217	218	219	220	221			

Suivons le cas du clone 114. Celui-ci est allumé par les deux sondes et, de la même manière. Il referme donc un insert non différentiel.

Si on prend le cas du clone 106 qui est issu de la soustraction +/- moins Sp/Sp, il est allumé plus fortement avec la sonde sauvage qu'avec la sonde

Sp/+. Ceci pourrait vouloir dire qu'il correspond à un gène exprimé de manière plus forte chez le sauvage. La perte d'un allèle Sp^{2H} n'entraîne pas une perte d'expression du gène en question. Il serait intéressant de voir si la perte des deux allèles Sp^{2H} entraînerait la disparition complète de l'expression de ce gène.

Le cas du clone 138. Issu de la soustraction +/+ moins Sp/Sp, il est allumé par la sonde hétérozygote et pas (ou beaucoup plus faiblement) par la sonde +/+. L'insert correspondrait à un gène présent chez l'embryon sauvage et pas chez l'embryon mutant. Or il s'allume avec une sonde hétérozygote (Sp/+). Il s'agit vraisemblablement d'un gène qui est exprimé dans les deux embryons mais de manière plus intense chez le mutant. Ce qui explique qu'il soit allumé par la sonde Sp/+ alors qu'il ne l'est pas par la sonde +/+.

b) Sonde Sp/Sp et +/+

Les résultats obtenus suite à l'hybridation des membranes par ces sondes ne sont pas présentés dans ce travail car des problèmes de bruits de fond ont été rencontrés lors de l'hybridation. Les causes exactes n'ont pas encore été élucidées.

DISCUSSION
ET
CONCLUSION GÉNÉRALE.

D. Discussion et conclusion générale

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés au génotypage d'embryons afin d'isoler des gènes candidats responsables de la non-fermeture du tube neural au 14ème jour de la gestation (embryons "Spotch"), par la technique de soustraction d'ADNc sur billes magnétiques. La technique permet, avec de petites quantités de matériel de départ, d'isoler des fragments de gènes, qui s'expriment de manière différentielle entre deux individus.

Le génotypage d'embryons

Au premier abord, nous nous sommes fiés au phénotype de l'embryon pour déterminer le génotype. L'expérience nous a montré que lors d'un examen phénotypique, des erreurs sont possibles. En effet, il n'y a pas que l'embryon "Spotch" qui présente des malformations au niveau de la fermeture du tube neural. C'est pourquoi il est nécessaire, si on veut connaître la nature du soustrait et du soustrayant, de faire appel à des techniques de génotypage.

La soustraction sur billes magnétiques

La technique de soustraction sur billes magnétiques nous a permis de mettre en évidence des clones comprenant chacun un insert correspondant à un fragment de gène qui serait apparemment exprimé différentiellement entre l'embryon sauvage et l'embryon hétérozygote "Spotch"; et ceci uniquement après un cycle de soustraction. Ces gènes sont donc des candidats potentiels pour lesquels une régulation par la protéine Pax-3 est soupçonnée. Ils pourraient être responsables de la fermeture du tube neural ou de la mauvaise migration des cellules (mélanocytes) de la crête neurale. En d'autres mots, ils feraient partie des gènes de la cascade de régulation contrôlée par la protéine Pax-3.

Cependant, après un cycle de soustraction, nous ne pouvons pas affirmer que les séquences contenues dans ces clones sont réellement exprimées de manière différentielle. Les résultats obtenus nous montrent essentiellement que cette technique est discriminante et que l'on arrive à allumer différemment un clone d'une membrane à l'autre (cfr. C4.6). Pour avoir plus de chance d'obtenir des clones réellement différentiels, il faudrait effectuer au moins deux cycles de soustraction supplémentaires et analyser un nombre plus élevé de clones.

Puisque la soustraction a lieu dans les deux sens (Sp/Sp moins +/+ et +/+ moins Sp/Sp), on s'attend à mettre en évidence, d'une part des gènes qui seraient exprimés préférentiellement chez l'embryon sauvage pour la soustraction +/+ moins Sp/Sp et d'autre part des gènes qui seraient exprimés préférentiellement chez l'embryon mutant pour la soustraction Sp/Sp moins +/+.

Les inserts des clones soupçonnés d'être différentiels doivent avant d'obtenir ce titre subir un test supplémentaire. Une vérification, par hybridation in situ, du lieu d'expression du gène correspondant à l'insert peut être effectuée. De cette façon, on ne retiendra que les gènes qui s'expriment dans un lieu lié à notre problématique, c'est-à-dire dans le tube neural ainsi que dans les crêtes neurales.

De la même manière, le séquençage de l'insert pourra éventuellement nous renseigner sur le gène dont il provient. Si la séquence obtenue correspond à un gène connu et impliqué dans les processus du développement, nous disposerions d'un argument favorable quant à l'intérêt du clone.

Conclusions générales

Au terme de ce travail, nous avons pu déceler 6 clones qui semblent être différentiels et ceci dès le premier cycle de soustraction. La technique que nous avons utilisée se révèle par conséquent efficace et va dans le sens des projets que nous avons émis.

Cependant, pour assurer le bon fonctionnement de cette technique sur le projet "Splotch", il faudrait pour le mieux y ajouter deux soustractions et "screener" un nombre plus important de clones. Une fois les clones différentiels isolés, il faudrait évidemment vérifier que ceux-ci interviennent effectivement dans le processus du développement du tube neural. Des informations à ce sujet, pourront-être recueillies en premier lieu par le séquençage des inserts et à plus long terme par hybridation in situ.

Il est possible que cette technique puisse servir à éclairer d'autres points obscurs au niveau de la régulation. Nous nous permettons de conseiller aux chercheurs, lors de l'application de notre technique, trois cycles de soustraction. Ces trois cycles permettant déjà la détection de clones réellement différentiels (§ C3.1).

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES.

E. Références bibliographiques

Aldhous, P. Fast Tracks to Disease Gene. *Science* 265:2008-2010, 1994.

Babinet, C. Une famille de gènes du développement : les gènes Pax. *m/s* 9:87-91, 1993.

Baldwin, C., Hoth, C., Amos, J., da-Silva, E. and Milunsky, A. An exonic mutation in the HuP2 paired domain gene causes Waardenburg's syndrome. *Nature* 355:637-638, 1992.

Beck, F., Moffat, D. and Lloyd, J. *Human Embryology and Genetics*, Oxford:Blackwell scientific, 1988.

Browder, L., Erickson, C. and Jeffery, W. *Developmental Biology*, Orlando Florida:Saunders College Publishing, 1991. Ed. 3rd

Chomczynski, P. One-Hour Downward Alkaline Capillary Transfer for blotting of DNA and RNA. *Analytical Biochemistry* 201:134-139, 1992.

Coche, Th., Dewez, M. and Beckers, M-C. Generation of an unlimited supply of a subtracted probe using magnetic beads and PCR. *Nucleic Acids Research* 22:1322-1323, 1994.

Copp, A., Brook, F., Estibeiro, J., Shum, A. and Cockfort, D. The embryonic development of mammalian neural tube defects. *Prog.Neurobiol.* 35:363-403, 1990.

Couly, G., Coltey, P., Chéron, G., Abadie, V., Martelli, H. and Le Douarin, N.M. Rhombomères, code Hox, crête neurale et malformations de la face. *m/s* 10:151-162, 1994.

Delezoïde, A-L. and Vekemans, M. Les modèles de souris et les maladies génétiques humaines. *N.S.T.* 11:55-60, 1993.

Driever, W., Stemple, D., Schier, A. and Solnica-Krezel, L. Zebrafish : genetic tools for studying vertebrate development. *TIG* 10:152-159, 1994.

Epstein, D., Malo, D., Vekemans, M. and Gros, P. Molecular Characterization of Deletion Encompassing the Splotch Mutation on Mouse Chromosome 1. *Genomics* 10:89-93, 1991.

Epstein, D., Vekemans, M. and Gros, P. splotch (Sp2H), a mutation Affecting Development of the Mouse Neural Tube, Shows a Deletion within the Paired Homeodomain of Pax-3. *Cell* 67:767-774, 1991.

Epstein, D., Vogan, K., Trasler, D. and Gros, P. A mutation within intron 3 of Pax-3 gene produces aberrantly spliced mRNA transcripts in the splotch (Sp) mouse mutant. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 90:532-536, 1993.

Goulding, M., Chalepakis, G., Deutsch, U., Erselius, J. and Gruss, P. Pax-3, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis. *EMBO J* 10:1135-1147, 1991.

Goulding, M., Sterrer, S., Flemming, J., Balling, R., Nadeau, J., Moore, J., Brown, S., Steel, K. and Gruss, P. Analysis of the Pax-3 Gene in the Mouse Mutant Splotch. *Genomics* 17:355-363, 1993.

Gruss, P. and Walther, C. Pax in development. *Cell* 69:719-722, 1992.

Hames, . *Nucleic acid hybridation*, 1992.

Harrison, . Manifestations cliniques des maladies. In: *Principes de médecine interne*, 1990,

Kahn, P. Zebrafish hit the big time. *Science* 264:904-905, 1994.

Krauss, S., Johansen, T., Korzh, V. and Fjose, A. Expression pattern of zebrafish pax genes suggests a role in early brain regionalization. *Nature* 353:267-270, 1991.

Krauss, S., Johansen, T., Korzh, V., Moens, U., Ericson, J. and Fjose, A. Zebrafish pax [zf-a] : a paired box-containing gene expressed in the neural tube. *EMBO J* 10:3609-3619, 1991.

Krauss, S., Maden, M., Holder, N. and Wilson, S. Zebrafish pax [b] in involved in the formation of the midbrain-hindbrain boundary. *Nature* 360:87-89, 1992.

Lewin, B. *Gènes*, Paris:Flammarion, 1988. Ed. 3rd

Lisitsyn, Ni., Lisitsyn, Na. and Wigler, M. Cloning the Differences Between Two Complex Genomes. *Science* 259:946-951, 1993.

Lisitsyn, Ni., Segre, J., Kusumi, K., Lisitsyn, Na., Nadeau, J., Frankel, W., Wigler, M. and Lander, E. Direct isolation of polymorphic markers linked to a trait by genetically directed representational difference analysis. *Nature Genetics* 6:57-63, 1994.

Loncle, D., Amaudric, M. and Jacoty, C. *Génie génétique*, Paris:Doin, 1993.

Mahowald and Hardy, *Ann.Rev.Genet.* 19:149-177, 1985.

Mancino, F., Vekemans, M., Trasler, D. and Gros, P. Segregation analysis reveals tight genetic linkage between the spontaneous arising neural tube defect gene splotch (Sp) and Pax-3 in an intraspecific mouse backcross. *Cytogenet Cell Genet* 61:143-145, 1992.

Masson, . Devos, L., Van Gansen, P, *Atlas d'embryologie*, Paris : Masson, 1980

Maulbecker, C. and Gruss, P. The oncogenic potential of Pax gene. *EMBO J* 12:2361-2367, 1993.

Morgan, . *Experimental Embryology*, 1927.

Rodriguez, I. and Chader, G. A novel method for the isolation of tissue-specific genes. *Nucleic Acids Research* 20:3528, 1992.

Rossen, B. and Beddington, R. Whole-mount in situ hybridization in the mouse embryo : gene expression in three dimensions. *TIG* 9:162-167, 1993.

Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. *Molecular Cloning*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Ed. 2nd

Sargent, T. Isolation of Differentially Expressed Genes. *Methods in Enzymology* 152:423-432, 1987.

Sasaki, H. and Hogan, B. HNF-3 β as a Regulator of Floor Plate Development. *Cell* 76:103-115, 1994.

Schöler, H. Octamania : The POU factors in murine development. *TIG* 7:323-328, 1991.

Scott, F., *Developmental Biology* Massachusetts : Sinauer associates, 1991. Ed. 3rd

Slack, K. *From Egg to Embryo*, Cambridge : Cambridge University Press, 1991. Ed. 2nd

Strachan, T. and Read, A. PAX genes. *Curr Opin Genet Dev* 4:427-438, 1994.

Suzuki, D., Griffiths, A., Miller, J. and Lewontin, R. *Introduction à l'analyse génétique*, Paris:Edition Universitaire, 1991. Ed. 4th

Tassabehji, M., Read, A., Newton, V., Harris, R., Balling, R., Gruss, P. and Strachan, T. Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. *Nature* 355:635-636, 1992.

Tassabehji, M., Read, A., Newton, V., Patton, M., Gruss, P., Harris, R. and Strachan, T. Mutation in the PAX3 gene causing Waardenburg syndrome type 1 and type 2. *Nature Genetics* 3:26-30, 1993.

Vogan, K., Epstein, D., Trasler, D. and Gros, P. The Splotch-Delayed (Sp^d) Mouse Mutant Carries a Point Mutation within the Paired Box of the *Pax-3* Gene. *Genomics* 17:364-369, 1993.

Walther, C., Guenet, J-L., Simon, D., Deutsch, U., Jostes, B., Goulding, M., Plachov, D., Balling, D. and Gruss, P. Pax : A Murine Multigene Family of Paired Box-Containing Genes. *Genomics* 11:424-434, 1991.