



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution à la caractérisation fonctionnelle de gènes de la famille Mage

Dirix, Violette

Award date:
2003

[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.

19-242



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

Faculté des Sciences

**Contribution à la caractérisation fonctionnelle de gènes de la
famille *Mage***

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

Violette DIRIX

Juin 2003

Contribution à la caractérisation fonctionnelle de gènes de la famille *Mage*

DIRIX Violette

Résumé

Les gènes *Mage* font partie d'une grande famille comprenant 55 gènes chez l'homme et 31 chez la souris. Ces gènes sont classés en 13 sous-familles sur base de leur séquence et de leur localisation chromosomique. Les gènes *Mage* peuvent être classés en deux groupes en fonction de leur profil d'expression: les gènes *Mage* de type I et de type II. Les gènes *Mage* de type I sont exprimés exclusivement dans certaines cellules de la lignée germinale mâle et dans certaines cellules cancéreuses. Les gènes *Mage* de type II sont exprimés dans de nombreux tissus somatiques. La fonction physiologique des protéines MAGE reste à découvrir.

Dans ce mémoire, nous nous sommes intéressés aux rôles des gènes de type I *Mage-b1 et -b2* (qui spécifient la même protéine) et du gène de type II *Mage-d2*. L'étude du rôle physiologique des gènes *Mage-b1/-b2* a été abordée par l'analyse phénotypique de souris knock-out dans lesquelles les gènes *Mage-b1 et -b2* ont été inactivés. Comme ces gènes sont exprimés dans les spermatides ronds, nous avons recherché un phénotype testiculaire chez ces souris. Notre conclusion est que ces animaux sont normalement fertiles et ont une spermatogenèse qui semble normale.

Nous avons également examiné le phénotype de souris déficientes en *Mage-d2*. Nous avons observé chez ces animaux une létalité partielle survenant in utero et au cours de la période périnatale. La mort de ces souriceaux semble causée par d'importantes hémorragies dont la cause reste indéterminée.

Enfin, nous n'avons pas pu confirmer l'interaction entre la protéine *Mage-d2* et la protéine pro-apoptotique Bcl-Rambo, ceci en utilisant la méthode du double hybride.

Je remercie Olivier Debacker pour avoir accepté d'être mon promoteur et m'avoir conseillé tout au long de mon mémoire.

Je remercie Isabelle Barr, ma tutrice, de m'avoir suivie, encouragée et tant aidée journallement.

Merci au professeur M.Hérin de m'avoir apporté aide, conseils et encouragements.

Merci au Dr. T. Huynh-Thu pour la fameuse dissection d'aorte de rat.

Merci à E.Depierreux pour son aide précieuse en statistiques.

Mathieu, merci pour tes conseils, les moments de rigolade et de « médisance » passés en ta compagnie...

Merci à Christiane, Catherine, Dominique et Danièle pour les coups de main et les explications qu'elles m'ont données quand j'en avais besoin.

Merci à Raphaël et Daniel pour le café et les moments passés autour des bains de coloration HES

Marielle et mes « chères cokoteuses », merci pour les moments de détente, de coup de gueule et d'encouragement tout au long de cette période

Et enfin, je remercie mes parents pour le soutien moral qu'ils m'ont apporté.

Violette

Abréviations

AD : transcriptional Activating Domain
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique Complémentaire
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
AS : Anti Sens
BD : DNA Binding Domain
BH : Bcl-2 homology domain
Bp : Base Pair
CAT : Chloranphénicol Acétyl Transférase
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CTL : Lymphocytes T cytotoxiques
E (nbr): âge de l'embryon (ex : E14)
ES : cellules Souches Embryonnaires
FT : Facteur de transcription
GB : Globule Blanc
GR : Globule Rouge
Hémi : Hémizygote
HES : Coloration Hémalun - Erythrosine – Safran
HLA : Complexe majeur d'histocompatibilité de type I
HmB : Hygromycine
HUVEC-C : Human Umbilical Vein Endothelial Cell
KDa : KiloDalton
KO : Knock-Out
KOb1b2 : souris KO pour les gènes *Mage-b1* et *Mage-b2*
KOd2 : souris KO pour le gène *Mage-d2*
Néo : Néomicine
ORF : Open Reading Frame
P (nbr) : âge du souriceau (ex : Po = jour de sa naissance)
PCR : Polymerase Chain reaction
PGK : Promoteur phosphoglycérique kinase
PWS : Prader-Willi syndrom
UAS : Upstream Activating Sequence
S : Sens
TrK : Récepteur Tyrosine Kinase
wt : Wild Type

***TABLE DES
MATIERES***

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	3
II. LES GÈNES MAGE DE TYPE I.....	5
II.1. LES GÈNES <i>MAGE-A</i>	5
II.2. LES GÈNES <i>MAGE-B</i>	6
III. LES GÈNES MAGE DE TYPE II.....	7
III.1. LE GÈNE <i>NECDIN</i>	8
III.2. LES GÈNES <i>MAGE-D</i>	8
IV. ETUDE DE LA FONCTION DES PROTÉINES MAGE	12
IV.1. RECHERCHE DE PARTENAIRES « DOUBLE HYBRIDE » CHEZ LA LEVURE.....	12
IV.2. ETUDE PHÉNOTYPIQUE DE SOURIS KNOCK-OUT	16
V. OBJECTIF DU MÉMOIRE.....	18

RESULTATS, DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. ETUDE DU PHÉNOTYPE DE SOURIS DÉFICIENTES EN GÈNES <i>MAGE-B1</i> ET <i>MAGE-B2</i>.....	19
I.1. ANALYSE DE LA COMPOSITION DE LA DESCENDANCE DE SOURIS DÉFICIENTES EN GÈNES <i>MAGE-B1</i> ET <i>MAGE-B2</i>	19
I.2. ETUDE HISTOLOGIQUE DE TESTICULES DE SOURIS KO ^{B1B2}	24
I.3. NUMÉRATION DE SPERMATOZOÏDES.....	27
I.4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	28
II. VÉRIFICATION DE L'INTERACTION MAGE-D2 / BCL-RAMBO	29
II.1. CLONAGE DE L'INSERT DANS PCR ^{II}	29
II.2. CLONAGE DE L'INSERT DANS PACT ²	29
II.3. TRANSFORMATION DE LA LEVURE.....	30
II.4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	30
III. ANALYSE DU PHÉNOTYPE DE SOURIS KNOCK-OUT POUR LE GÈNE <i>MAGE-D2</i>	32
III.1. LES SOURIS KNOCK-OUT <i>MAGE-D2</i>	32
III.2. ANALYSE DES CROISEMENTS HOMOZYGOTES ET HÉTÉROZYGOTES	32
III.2.1. Croisements 1 : Femelles hétérozygotes x mâles sauvages B6	33
III.2.2. Croisements 2 : Femelles homozygotes x mâles hémizygotés.....	35
III.2.3. Analyse du phénotype des souris knock-out <i>Mage-d2</i> chez l'embryon	37
III.2.4. Conclusion.....	38
III.3. ANALYSE DES PHÉNOTYPES MANIFESTÉS PAR LES SOURIS KNOCK-OUT POUR <i>MAGE-D2</i>	38
III.3.1. Alopecie.....	39
III.3.2. Hémorragies	39
III.4. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	41

MATERIEL ET METHODES

I. GÉNOTYPAGE DES SOURIS KO PAR PCR	43
I.1. EXTRACTION D'ADN DES QUEUES DE SOURIS	43
I.2. PCR	43
II. WESTERN BLOT	44
II.1. ECHANTILLONS	44
II.2. TRANSFERT	44
II.3. WESTERN BLOT	45
II.4. STRIPPAGE DES MEMBRANES	45
III. DOUBLE-HYBRIDE: VÉRIFICATION DE L'INTERACTION ENTRE LA PROTÉINE MAGE-D2 ET BCL-RAMBO PAR "DOUBLE HYBRIDE" CHEZ LA LEVURE	46
III.1. CONSTRUCTION DE BCL-RAMBO	46
III.1.1. PCR sur du cDNA de cerveau embryonnaire de souris	46
III.1.2. Clonage dans PCRII	46
III.1.3. Identification des clones d'intérêt par PCR	46
III.1.4. Miniprep d'ADN plasmidique	46
III.1.5. Séquençage	47
III.2. INSERTION DE BCL-RAMBO DANS PACT2	47
III.2.1. Digestion de Bcl-Rambo et de pACT2	47
III.2.2. Purification de l'ADN de l'insert et du vecteur	47
III.2.3. Ligation	48
III.2.4. Electroporation	48
III.2.5. Identification des clones recombinants par PCR	48
III.2.8. Séquençage	48
III.3. TRANSFORMATION DANS LA LEVURE	48
III.4. REPIQUAGE DE COLONIES DE LEVURES	49
III.5. DÉTECTION DE L'ACTIVITÉ β -GALACTOSIDASE	49
IV. NUMÉRATION DES PLAQUETTAIRE	50
V. NUMÉRATION DES SPERMATOZOÏDES	50
VI. COUPES HISTOLOGIQUES SUR TISSUS ENROBÉS À LA PARAFINE ...	50
VI.1. PRÉPARATION DES TISSUS	50
VI.2. COUPES	50
VI.3. COLORATION HÉMALUN, ERYTHROSINE, SAFRAN	51
VI.4. MONTAGE	51
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	52

INTRODUCTION

I. Introduction générale

C'est en 1991 que des chercheurs de l'institut Ludwig de Bruxelles identifièrent le premier gène *Mage*. Ce gène, appelé *MAGE-1* pour « Melanoma AntiGene », codait pour un peptide antigénique présenté par le complexe majeur d'histocompatibilité de type I à la surface de cellules de mélanomes.

On s'aperçu rapidement que *MAGE-1* appartenait à un groupe de 12 gènes (les gènes *Mage-A*) localisés dans la région q28 du chromosome X humain. Par la suite, 2 autres sous-familles de gènes *Mage* (*Mage-B* et *-C*) furent respectivement identifiés dans les régions p21 et q26-27 du chromosome X humain. Le séquençage complet du génome humain a permis d'identifier un total de 55 gènes *Mage* que l'on a classé en 13 sous-familles sur base de leurs homologies de séquence et de leur localisation chromosomique (Figure 1). Chez la souris, on compte 31 gènes *Mage* répartis en 11 sous-familles (tableau 1) [1].

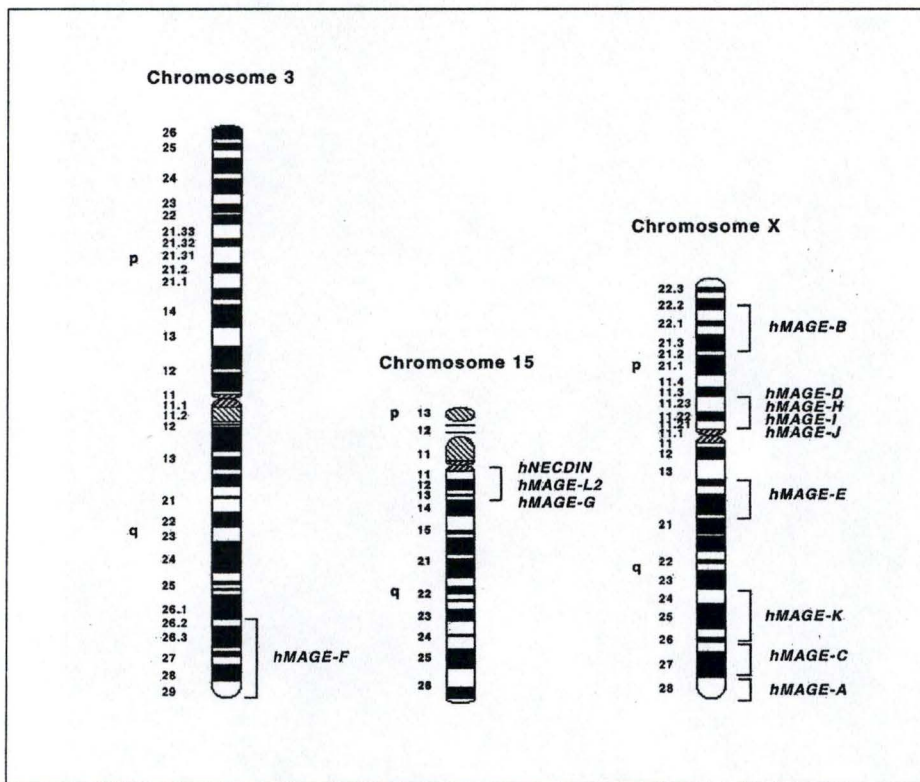


Figure 1. Localisation chromosomique des différentes sous-familles de gènes *Mage* humains.

Table 1. Known human and murine members of the MAGE gene family

Subfamily	Human			Mouse		
	Gene name	Reference/Accession no. ^a	Expression ^b	Gene name	Reference/Accession no. ^a	Express
MAGE-A ^c	<i>hMAGE-A1</i>	Ref. 2	T	<i>mMage-a1</i>	Ref. 14	ND
	<i>hMAGE-A2</i>		T	<i>mMage-a2</i>		T
	<i>hMAGE-A3</i>		T	<i>mMage-a3</i>		T
	<i>hMAGE-A4</i>		T	<i>mMage-a4</i>		T
	<i>hMAGE-A5</i>		T	<i>mMage-a5</i>		T
	<i>hMAGE-A6</i>		T	<i>mMage-a6</i>		ND
	<i>hMAGE-A7</i>		P	<i>mMage-a7</i>		P
	<i>hMAGE-A8</i>		T	<i>mMage-a8</i>		T
	<i>hMAGE-A9</i>		T	<i>mMage-a9</i>		P
	<i>hMAGE-A10</i>		T			
	<i>hMAGE-A11</i>		T			
	<i>hMAGE-A12</i>		T			
	<i>hMAGE-A13</i>		U71148.1 (970-12608)	P		
	<i>hMAGE-A14</i>		NT_011534.1 (86877-86203)	P		
	<i>hMAGE-A15</i>		NT_025309.1 (68501-69500)	P ^d		
MAGE-B ^c	<i>hMAGE-B1</i>	Ref. 5	T	<i>mMage-b1</i>	Ref. 15	T
	<i>hMAGE-B2</i>		T	<i>mMage-b2</i>		T
	<i>hMAGE-B3</i>		T	<i>mMage-b3</i>		T
	<i>hMAGE-B4</i>		T	<i>mMage-b4</i>		T
	<i>hMAGE-B5</i>	Ref. 8	T	<i>mMage-b5</i>	Ref. 16	T
	<i>hMAGE-B6</i>		T	<i>mMage-b6</i>	AC025874.3 (172095-173508)	ND
	<i>hMAGE-B7</i>		P	<i>mMage-b7</i>	AC025874.3 (164024-184611)	ND
	<i>hMAGE-B8</i>	AC005297.1 (147306-148800)	P	<i>mMage-b8</i>	AC025874.3 (120489-120619)	ND
	<i>hMAGE-B9</i>	AC005297.1 (177013-170783)	P	<i>mMage-b9</i>	AC025874.3 (164334-164809)	ND
	<i>hMAGE-B10</i>	AC011693.5 (134036-135079)	P	<i>mMage-b10</i>	AC025874.3 (49446-49961)	ND
	<i>hMAGE-B11</i>	AC011693.5 (124613-125653)	P ^e			
	<i>hMAGE-B12</i>	AC011693.5 (116819-117861)	P ^e			
	<i>hMAGE-B13</i>	AC011693.5 (99819-98379)	P ^e			
	<i>hMAGE-B14</i>	NT_025279.3 (927601-928600)	P ^e			
	<i>hMAGE-B15</i>	NT_011752.1 (191672-191299)	P ^e			
	<i>hMAGE-B16</i>	NT_025279.3 (1018827-1019786)	T			
	<i>hMAGE-B17</i>	NT_011766.3 (835710-835102)	T			
MAGE-C	<i>hMAGE-C1</i>	Ref. 7	T			
	<i>hMAGE-C2</i>	Ref. 8	T			
	<i>hMAGE-C3</i>		T			
	<i>hMAGE-C4</i>	AL023279.1 (94144-93800)	P ^e			
	<i>hMAGE-C5</i>	NT_025337.2 (413026-413487)	P			
	<i>hMAGE-C6</i>	NT_025337.2 (387877-388503)	P			
	<i>hMAGE-C7</i>	NT_025337.2 (366380-366796)	P			
MAGE-D	<i>hMAGE-D1</i>	Ref. 20	N	<i>mMage-d1</i>	AF319975	N
	<i>hMAGE-D2</i>	Ref. 19	N	<i>mMage-d2</i>	AF319976	N
	<i>hMAGE-D3</i>	AB029037	N	<i>mMage-d3</i>	AF319977	N
	<i>hMAGE-D4</i>	AF320908	N			
MAGE-E	<i>hMAGE-E1</i>	AL096827 (103646-100173)	N	<i>mMage-e1</i>	AF319978	N
	<i>hMAGE-E2</i>	NT_025273.3 (1960507-1971078)	N	<i>mMage-e2</i>	AF319983	N
	<i>hMAGE-E3</i>	NT_011954.3 (549500-501000)	N			
MAGE-F	<i>hMAGE-F1</i>	AC016975.3 (167853-166930)	N			
MAGE-G	<i>hMAGE-G1</i>	AC061965.3 (145505-144089)	N	<i>mMage-g1</i>	AF319979	N
				<i>mMage-g2</i>	AF319980	N
				<i>mMage-g1</i>	AF319981	N
MAGE-H	<i>hMAGE-H1</i>	AF320912	N			
MAGE-I	<i>hMAGE-I1</i>	NT_011638.3 (1237956-1238326)	P ^e			
	<i>hMAGE-I2</i>	NT_011638.3 (166231-168305)	P ^e			
	<i>hMAGE-I1</i>	NT_011577 (101579-101911)	P ^e			
MAGE-K	<i>hMAGE-K1</i>	Z81311 (13990-16586)	P	<i>mMage-k1</i>	AF319984	T
MAGE-L2	<i>hMAGE-L2</i>	Ref. 30	N	<i>mMage-l2</i>	Ref. 30	N
NECDIN	<i>hNECDIN</i>	Ref. 29	N	<i>mNecdin</i>	Ref. 28	N

Table 1. Les différentes sous-familles de gènes *Mage* humains et murins.

Les profils d'expression sont indiqués par: T, spécifiquement exprimés dans les testicules et/ou les tumeurs; N, exprimés dans les tissus normaux adultes; ND, profil d'expression non-déterminé; P, pseudogène (d'après Chomez et al, 2001).

La comparaison des séquences des protéines MAGE montre qu'elles comportent toutes un domaine d'environ 200 acides aminés désormais connu sous le nom de «*domaine Mage*», qui est la seule région conservée entre toutes ces protéines. Par contre, les séquences en amont et en aval du domaine Mage varient considérablement d'une protéine à l'autre et ne ressemblent à aucune autre protéine de fonction connue (Figure 2).

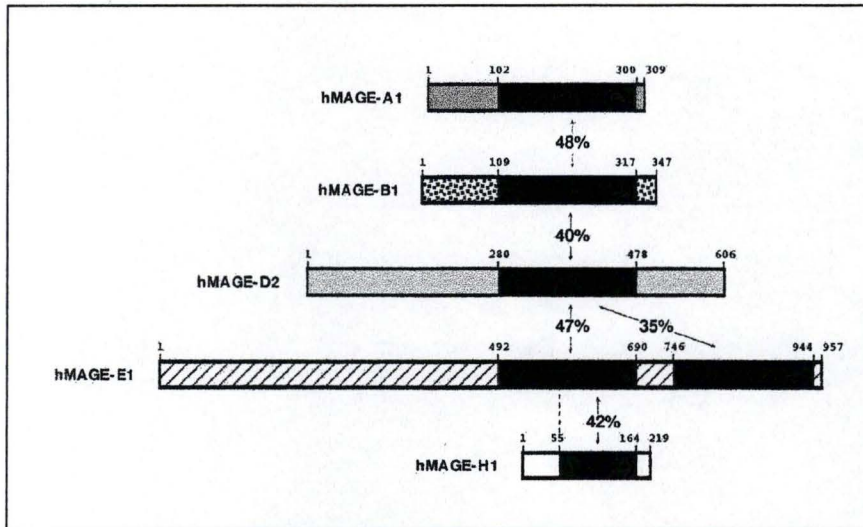


Figure 2. Représentation schématique des protéines humaines MAGE-A1, -B1, -D2, -E1, -H1. Les boîtes noires correspondent au « domaine Mage ». Les pourcentages d'acides aminés identiques entre les domaines Mage sont indiqués. Les régions N- et C-terminales ne partagent pas d'homologie.

Les gènes *Mage* peuvent être classés en 2 groupes sur base de leur profil d'expression: les gènes *Mage* de type I et les gènes *Mage* de type II. Les gènes *Mage* de type I sont silencieux dans la plupart des tissus sauf le testicule et sont exprimés dans certaines cellules tumorales. Par contre, les gènes *Mage* de type II sont exprimés dans de nombreux tissus somatiques.

II. Les Gènes Mage de type I

Cette première catégorie comprend la majorité des gènes dont ceux des sous-familles *Mage-A*, *-B* et *-C*. Ces gènes sont complètement silencieux dans les tissus normaux à l'exception de certaines cellules de la lignée germinale mâle [2]. Cette expression limitée au testicule suggère un rôle possible au cours de la spermatogenèse. Certains gènes de type I, comme le gène *MAGE-1*, sont exprimés dans des cellules tumorales de types histologiques divers où ils peuvent diriger l'expression d'antigènes spécifiques des tumeurs qui sont des cibles de choix pour l'immunothérapie anticancéreuse.

Les gènes *Mage* de type I évoluent rapidement chez les mammifères, principalement par duplication, ce qui rend impossible l'établissement de relation d'orthologie entre gènes murins et humains.

II.1. Les gènes *Mage-A*

Comme cité ci-dessus, les gènes *Mage-A* sont au nombre de 12 et sont localisés dans la région q28 du chromosome X. Les gènes *Mage-A1*, *-A2*, *-A3*, *-A4*, *-A6*, *-A10* et *-A12* sont exprimés dans les tumeurs primaires ou des métastases de divers types histologiques. Ces gènes codent pour des protéines dont la dégradation produit des peptides antigéniques présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de type I à la surface des cellules cancéreuses. Présentés par HLA-I, ces peptides sont reconnus par les CTL (lymphocytes T cytolytiques). Une réaction immunitaire peut alors avoir lieu.

L'expression individuelle des gènes *Mage-A* varie d'un type de tumeur à l'autre. L'expression des gènes *Mage-A* dans les tumeurs résulterait d'un processus de déméthylation de l'ADN au niveau des promoteurs de ces gènes. La déméthylation est un phénomène qui survient dans de nombreuses tumeurs et aussi dans les cellules germinales mâles [3]. Comme les cellules de la lignée germinale mâle n'expriment pas de HLA, elles ne présentent pas de peptides aux CTL.

Une immunisation contre des antigènes *Mage-A* pourrait donc avoir un grand intérêt dans l'immunothérapie contre un large spectre de cancers [4].

II.2. Les gènes *Mage-B*

Dix-sept gènes *Mage-B* ont été identifiés chez l'homme et 10 chez la souris. Comme les gènes *Mage-A*, les gènes *Mage-B* sont peu conservés entre ces deux espèces (Figure 3).

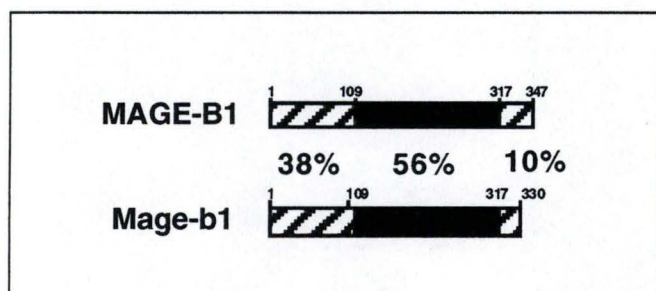


Figure 3. Comparaison de la séquence de la protéine MAGE-B1 entre l'homme et la souris. Le domaine Mage est représenté en noir. Les pourcentages d'acides aminés identiques dans le domaine Mage et dans les parties N- et C-terminales sont indiqués.

Comme celle des gènes *Mage-A*, l'expression des gènes *Mage-B* est limitée aux tumeurs et aux testicules [5]. La fonction physiologique des gènes *Mage-B*, comme celle des autres gènes *Mage* de type I, est encore inconnue.

Dans le laboratoire, nous nous intéressons plus particulièrement aux gènes *Mage-b1*, *-b2* et *-b3*, qui sont les premiers à avoir été identifiés chez la souris [6].

Chez la souris, le gène *Mage-b3* est autosomique tandis que les gènes *Mage-b1* et *Mage-b2* sont localisés entre les marqueurs *Zfx* et *Ar*, une région synthénique à la région p21-22 du chromosome X humain où se trouvent le groupe des gènes *Mage-B*. *Mage-b1* et *-b2* sont composés de trois exons dont seul le dernier est codant. Ils codent pour une protéine identique de 330 acides aminés. *Mage-b3* a la structure d'un rétrogène mais son ORF est intacte et code pour une protéine qui diffère de *Mage-b1* et *-b2* par seulement 11 acides aminés.

Une caractéristique de *Mage-b2* est la présence de plusieurs exons 1 alternatifs. Cette organisation génomique est en faveur d'une régulation de l'expression de *Mage-b2* à différents niveaux:

-Premièrement, l'emploi de promoteurs et d'exons 1 alternatifs régulerait la transcription.

-Deuxièmement, les différents exons 1, dans la région 5' non-traduite, contiendraient des AUG suivis de courtes ORF qui réguleraient la traduction de la protéine *Mage* [6].

Des expériences d'hybridation *in situ* ont montré que ces 3 gènes, qui codent pour des protéines quasi identiques, sont exprimés spécifiquement dans les spermatides ronds [7]. Une autre façon de mettre en évidence le profil d'expression des gènes *Mage-b* est la coloration X-gal des testicules de souris déficientes en *Mage-b1*. En effet, chez ces souris, l'ORF du gène *Mage-b1* est remplacée par le rapporteur *LacZ*. L'activité du rapporteur est détectée dans les spermatides et les spermatozoïdes (Figure 4).

Il a été démontré par immunohistoChimie que la protéine *Mage-b2* a une localisation nucléaire dans les cellules tumorales [8].

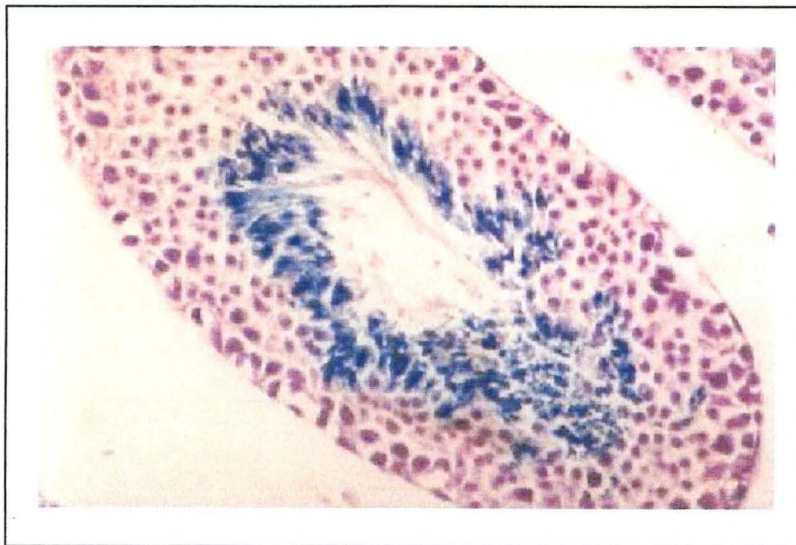


Figure 4. Coloration β -Galactosidase sur une coupe de testicule de souris Knock-Out *Mage-b1* adulte.

Le profil d'expression des gènes *Mage-b* suggère dès lors que ces gènes pourraient avoir un rôle dans la spermatogenèse.

III. Les Gènes Mage de type II

Cette deuxième catégorie de gènes comprend les gènes appartenant aux sous-familles *Mage-D*, *-E*, *-F*, *-G*, *-H*, *-L* et le gène *NECDIN*. Contrairement aux gènes *Mage* de type I, les gènes *Mage* de type II sont exprimés dans de nombreux tissus somatiques.

III.1. Le gène *Necdin*

L'identification d'une mutation dans *Necdin* dans le cas d'une pathologie humaine grave a été la première démonstration d'un rôle important des gènes *Mage* au cours du développement. *Necdin* code pour une protéine de 325 acides aminés et chez l'homme, le gène *Necdin* se situe dans la région q11.2-q12 du chromosome 15 déletée chez les patients atteints du syndrome de Prader-Willi [9].

Le syndrome de Prader-Willi est un désordre neuro-développemental qui se manifeste par des problèmes d'obésité, d'hypogonadisme, d'hypotonie neuromusculaire, de stress respiratoire à la naissance et de retard mental. Il s'agit d'une maladie autosomique dominante causée par la délétion de plusieurs gènes sur le chromosome 15q paternel, dont *Necdin*. Les allèles maternels chez ce gènes sont inactivés par le phénomène de l'empreinte génétique. Plusieurs souris knock-out *Necdin* ont été produites. Ces souris knock-out ont mis en évidence un effet important du fond génétique sur la pénétrance du phénotype. Les souris produites par Tsai sont viables et fertiles et ne manifestent aucune anomalie majeure [10]. Les souris (souche C57/BL/6) produites par Gérard présentent une mortalité post-natale due à l'incapacité des souriceaux à se nourrir suffisamment, un stress respiratoire, une hypotonie, un retard de croissance (léthalité de 80% des souriceaux) [11]. Muscatelli a mis en évidence dans son mutant (fond génétique C57/BL/6) une réduction du nombre de certains neurones de l'hypothalamus et des altérations comportementales qui rappellent celles observées dans le syndrome de Prader-Willi [12].

Necdin jouerait un rôle important dans le développement et la survie de certaines cellules du système nerveux central. Il est surtout exprimé dans les neurones post-mitotiques de certaines régions cérébrales. *Necdin* est, entre autres, fortement exprimé au niveau de l'hypothalamus, et la plupart des symptômes de PWS sont dus à une déficience hypothalamique [13] [12].

III.2. Les gènes *Mage-D*

Parmi les gènes *Mage* de type II, la sous-famille des gènes *Mage-D*, qui comporte 4 membres chez l'homme et 3 chez la souris, est particulièrement intéressante. Situés dans la région p11.23 du chromosome X humain, les gènes *Mage-D* présentent deux différences fondamentales par rapport aux autres gènes *Mage*. Premièrement, ils sont fortement conservés entre l'homme et la souris. Les orthologues humain et murin de MAGE-D1 et de MAGE-D2 partagent en effet 99% d'acides aminés identiques au niveau du domaine *Mage* (la protéine MAGE-D3 en partageant 93%) alors que, par exemple, comme nous l'avons vu, seuls pour 56% des acides aminés du domaine *Mage* de MAGE-B1 sont identiques entre l'homme et la souris (Figures 5 et 6).

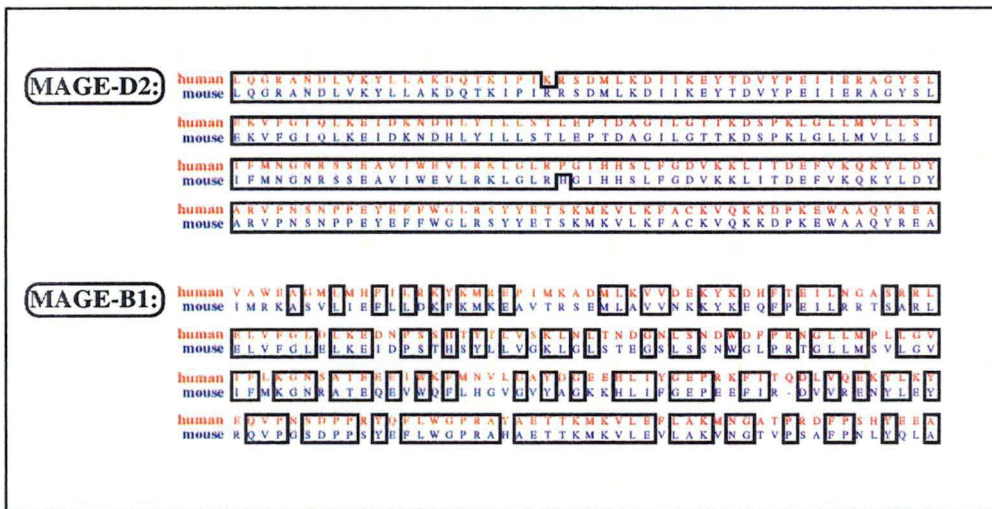


Figure 5. Comparaison de séquences entre les domaines *Mage* des protéines MAGE-B1 et -D2 humaines et murines.

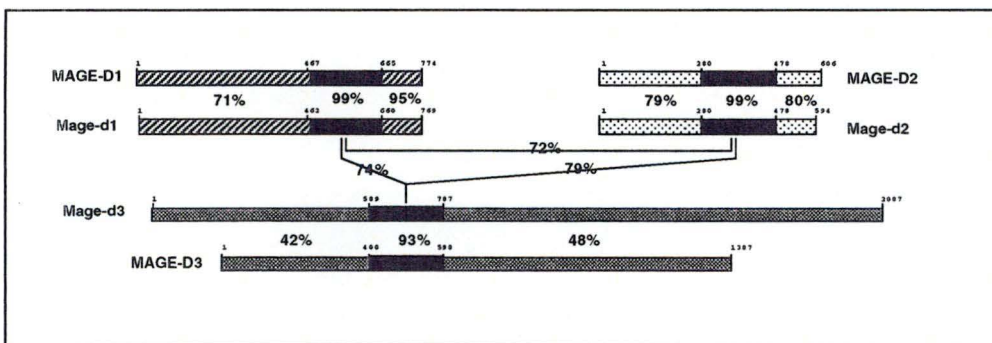


Figure 6. Comparaison des séquences de protéines orthologues MAGE-D humaines et murines. Le domaine *Mage* est représenté en noir. Le pourcentage d'acides aminés identiques est indiqués pour chaque région des protéines.

La deuxième caractéristique intéressante des gènes *Mage-D* est leur structure génomique. En effet, ils sont constitués chacun de 13 exons et leur grille de lecture s'étale de l'exon 2 à l'exon 12 alors que les autres gènes *Mage* sont constitués d'un petit nombre d'exons dont seul le dernier est codant (Figure 7).

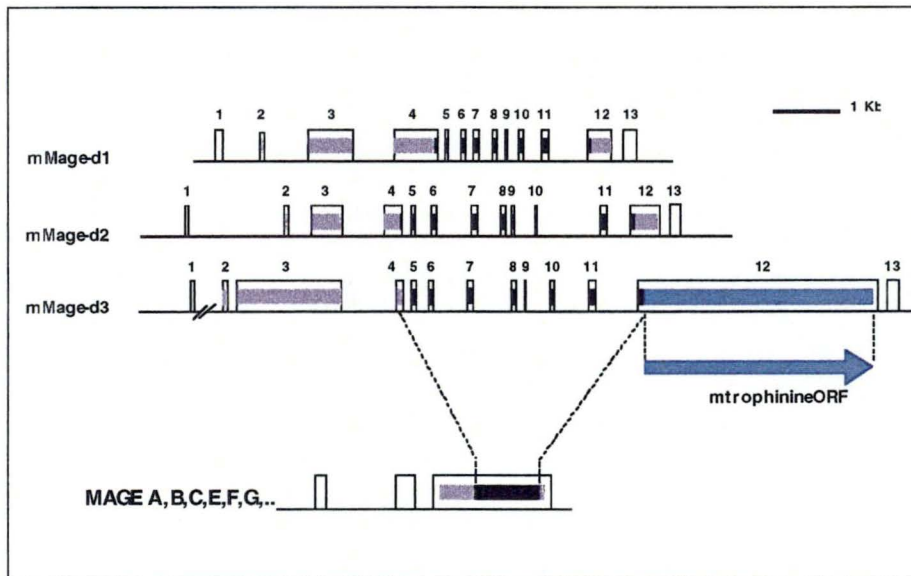


Figure 7. Comparaison de la structure génomique des gènes *Mage-d* et des autres gènes *Mage*. Les gènes *Mage-d* sont composés de 13 exons et la grille de lecture s'étale de l'exon 2 à l'exon 12. Le domaine *Mage* s'étend sur les exons 5 à 11. La grille de lecture des gènes *Mage* « non-D » est entièrement comprise dans le dernier exon.

Ces observations suggèrent que les gènes *Mage* « non-D » ont été générés par rétrotransposition au départ d'un gène ancestral de type *Mage-D*. Le fait que les trois gènes *Mage-D* aient été fortement conservés au cours de l'évolution des mammifères suggère que les protéines correspondantes exercent des fonctions importantes et distinctes.

III.2.1. *Mage-D1*

Par hybridation in situ, M. Bertrand a démontré que le gène *Mage-d1* (aussi appelé NRAGE (Neurotrophin Receptor-interacting mAGE homolog) ou Dlxin-1) est exprimé dans une large gamme de tissus nerveux et non-nerveux au cours de l'embryogenèse. Dans le cerveau embryonnaire, il est détecté au niveau des zones ventriculaires et dans les neurones post-mitotiques (Figures 8 et 9) [Bertrand et al, en préparation]. Son profil d'expression recouvre ceux de *Mage-d2* et *Mage-d3*. Dans le cerveau adulte, ce gène est détecté partout et plus spécialement dans les structures corticales et dans la médulla. Sa présence dans le cerveau et l'identification de partenaires protéiques impliqués dans le cycle cellulaire et l'apoptose suggère que *Mage-d1* pourrait exercer un rôle dans la différenciation neuronale et dans la transmission du signal via le récepteur aux neurotrophines p75NTR (voir point IV.1.4).

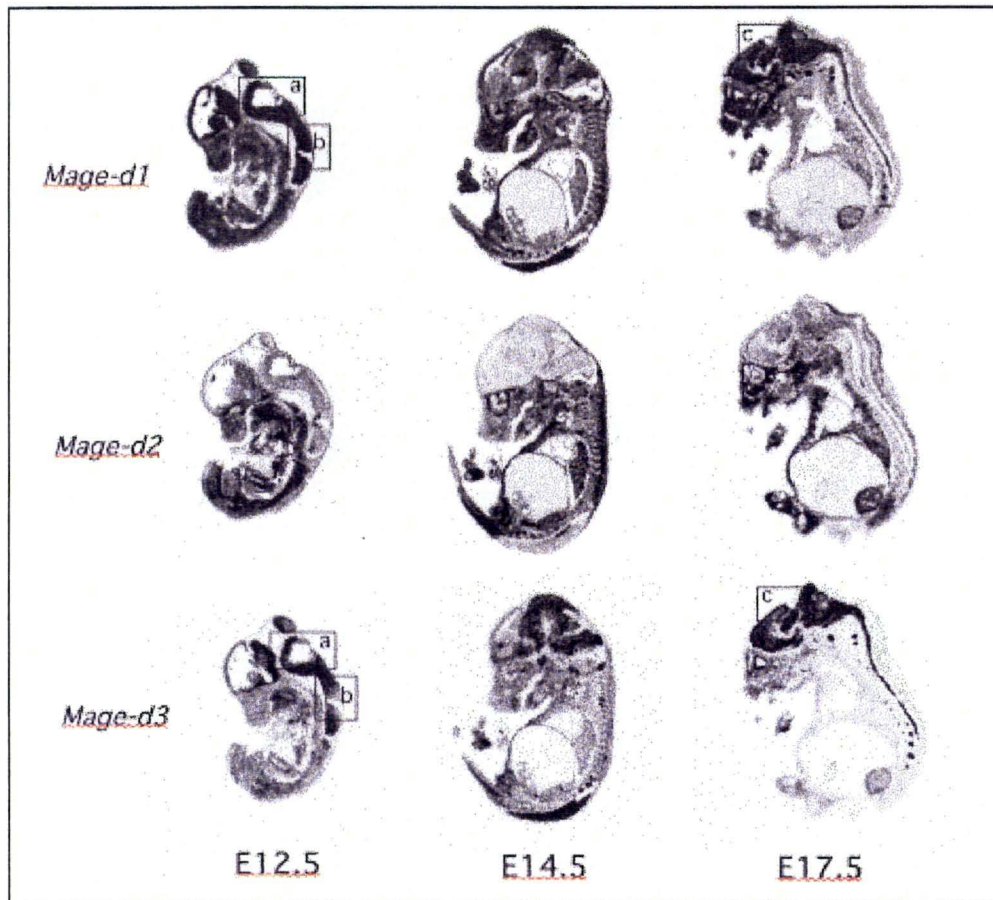


Figure 8. Détection par hybridation in situ de l'expression des gènes *Mage-d1*, *-d2*, *-d3* au cours du développement de la souris (d'après Bertrand et al, en préparation).

III.2.2. *Mage-D2*

Ce gène est exprimé principalement dans les tissus d'origine mésodermique. Le mésoderme donne naissance aux muscles, aux tissus conjonctifs, aux os ainsi qu'au sang et aux autres composantes du système vasculaire. Durant l'embryogenèse, une forte expression de *Mage-d2* est détectée au niveau des structures musculaires comme les muscles intercostaux, le diaphragme, l'intestin, l'estomac ainsi qu'au niveau des vaisseaux ombilicaux et de l'aorte (Figure 8) [Bertrand et al, en préparation]. Son expression dans le système nerveux central est faible lors du développement et inexistante au stade adulte (Figure 9).

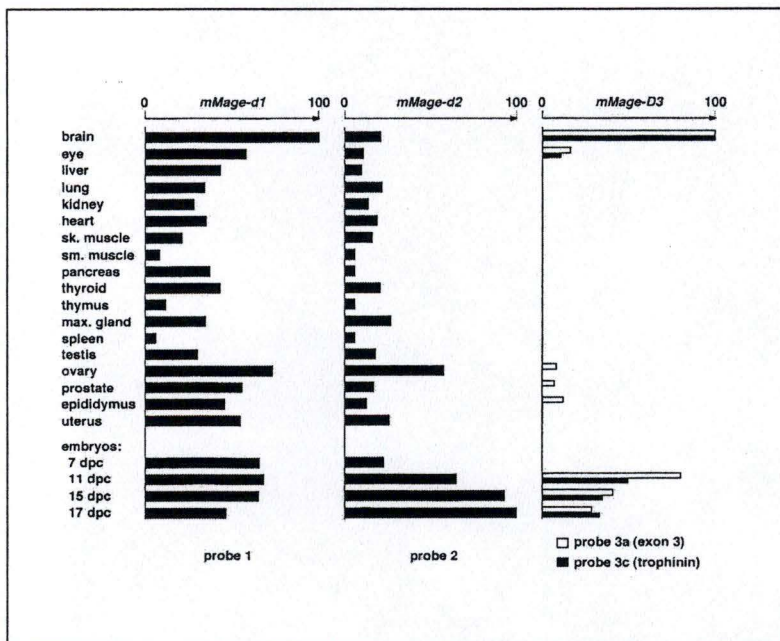


Figure 9. Analyse semi-quantitative de l'expression des 3 *Mage-d* dans les tissus murins. Une hybridation par des sondes spécifiques à été réalisée pour chaque gène. Les signaux radioactifs ont été quantifiés et exprimés en pourcentage par rapport à la valeur maximum obtenue pour chaque sonde (d'après DeBacker et al, 2001).

IV. Etude de la fonction des protéines MAGE

Deux approches ont été utilisées pour étudier la fonction des protéines MAGE: La recherche de partenaires protéiques par crible double hybride chez la levure et l'analyse phénotypique de souris knock-out. Au laboratoire, nous utilisons ces deux approches pour étudier le rôle de *Mage-b1*, *-b2*, *-d1* et *-d2*.

IV.1. Recherche de partenaires « double hybride » chez la levure

Le double hybride a permis d'identifier de nombreux partenaires des protéines MAGE. Ces partenaires donnent des informations importantes sur les voies de signalisation dans lesquelles les protéines MAGE sont impliquées.

IV.1.1. Le double hybride

La méthode du « double hybride » consiste à tester, chez la levure, l'interaction physique éventuelle entre 2 protéines, chacune à l'état de protéines de fusion (d'où le nom de « double hybride »). Cette technique mise au point par Fields, se base sur une

propriété intéressante de certains facteurs de transcription (FT) eucaryotes, comme par exemple le facteur Gal4 de la levure, qui sont composés de deux domaines distincts, fonctionnellement indépendants et séparables physiquement:

- Un domaine qui se lie à l'ADN (DNA Binding Domain (BD)).
- Un domaine responsable de l'activation de la transcription (Transcriptional Activating Domain (AD)) [14].

Le BD de Gal4 reconnaît une séquence d'ADN spécifique, l'UAS (Upstream Activating Sequence) du promoteur des gènes qu'il régule. Si l'AD est séparé du BD, le FT fragmenté n'est plus capable de recruter la machinerie de transcription au niveau du promoteur afin d'activer la transcription.

Le test du double hybride consiste à éprouver l'hypothèse d'une interaction entre 2 protéines X et Y. Cela implique de tenter de reconstituer un facteur de transcription Gal4 au moyen des interactions faibles potentielles entre une protéine hybride « appât » (XBD) et une protéine hybride « proie » (YAD). Les séquences codant ces protéines X et Y sont respectivement fusionnées aux séquences du BD et de l'AD du facteur de transcription Gal4. Si l'appât XBD et la proie YAD interagissent, le FT est reconstitué et active la transcription. Afin de mettre en évidence cette activation, témoin de l'interaction recherchée, on utilise un système de gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur activé par le FT reconstitué.

IV.1.2. Les partenaires de NECDIN

Trois partenaires de NECDIN ont été identifiés :

a) **P53**: P53 est un facteur de transcription bloquant le cycle cellulaire lors de dommages de l'ADN et aidant à la réparation de celui-ci. Cette protéine est présente en petite quantité en temps normal, mais dès que la cellule est perturbée (endommagée, manque d'oxygène, activation d'oncogène, infection,...) la concentration de P53 augmente et la protéine devient active. La protéine P53 peut stimuler la production de la protéine p21 responsable de l'arrêt du cycle cellulaire jusqu'à ce que l'ADN soit réparé. P53 augmente aussi l'expression de la protéine bax, (membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2) qui déclenche l'apoptose [15].

b) **E2F1** : E2F1 est un facteur de transcription induisant l'expression de cyclines permettant la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S [16].

NECDIN jouerait un rôle clé dans la différenciation et la survie des neurones en antagonisant l'effet de E2F1 [17].

c) **p75NTR** : Le rôle de ce récepteur aux neurotrophines est expliqué au point IV.1.3.

IV.1.3. Les partenaires de MAGE-D1

a) **IAP** (inhibitor of apoptosis proteins) : Les IAPs sont des protéines favorisant la survie cellulaire caractérisées par la présence d'un domaine BIR (séquence NH2-terminale riche en cystéine) et d'un domaine RING (feuillet) en doigt de zinc du côté carboxyl-terminal. Le domaine BIR lie les caspases et inhibe leur action pro-

propriété intéressante de certains facteurs de transcription (FT) eucaryotes, comme par exemple le facteur Gal4 de la levure, qui sont composés de deux domaines distincts, fonctionnellement indépendants et séparables physiquement:

- Un domaine qui se lie à l'ADN (DNA Binding Domain (BD)).
- Un domaine responsable de l'activation de la transcription (Transcriptional Activating Domain (AD)) [14].

Le BD de Gal4 reconnaît une séquence d'ADN spécifique, l'UAS (Upstream Activating Sequence) du promoteur des gènes qu'il régule. Si l'AD est séparé du BD, le FT fragmenté n'est plus capable de recruter la machinerie de transcription au niveau du promoteur afin d'activer la transcription.

Le test du double hybride consiste à éprouver l'hypothèse d'une interaction entre 2 protéines X et Y. Cela implique de tenter de reconstituer un facteur de transcription Gal4 au moyen des interactions faibles potentielles entre une protéine hybride « appât » (XBD) et une protéine hybride « proie » (YAD). Les séquences codant ces protéines X et Y sont respectivement fusionnées aux séquences du BD et de l'AD du facteur de transcription Gal4. Si l'appât XBD et la proie YAD interagissent, le FT est reconstitué et active la transcription. Afin de mettre en évidence cette activation, témoin de l'interaction recherchée, on utilise un système de gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur activé par le FT reconstitué.

IV.1.2. Les partenaires de NECDIN

Trois partenaires de NECDIN ont été identifiés :

a) **P53**: P53 est un facteur de transcription bloquant le cycle cellulaire lors de dommages de l'ADN et aidant à la réparation de celui-ci. Cette protéine est présente en petite quantité en temps normal, mais dès que la cellule est perturbée (endommagée, manque d'oxygène, activation d'oncogène, infection,...) la concentration de P53 augmente et la protéine devient active. La protéine P53 peut stimuler la production de la protéine p21 responsable de l'arrêt du cycle cellulaire jusqu'à ce que l'ADN soit réparé. P53 augmente aussi l'expression de la protéine bax, (membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2) qui déclenche l'apoptose [15].

b) **E2F1** : E2F1 est un facteur de transcription induisant l'expression de cyclines permettant la progression du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S [16].

NECDIN jouerait un rôle clé dans la différenciation et la survie des neurones en antagonisant l'effet de E2F1 [17].

c) **p75NTR** : Le rôle de ce récepteur aux neurotrophines est expliqué au point IV.1.3.

IV.1.3. Les partenaires de MAGE-D1

a) **IAP** (inhibitor of apoptosis proteins) : Les IAPs sont des protéines favorisant la survie cellulaire caractérisées par la présence d'un domaine BIR (séquence NH2-terminale riche en cystéine) et d'un domaine RING (feuillet) en doigt de zinc du côté carboxyl-terminal. Le domaine BIR lie les caspases et inhibe leur action pro-

apoptotique. MAGE-D1 interagit avec les protéines de la famille IAP XIAP (X linked inhibitor of apoptosis proteins), et ITA (inhibitor of T cell apoptosis) via le domaine RING [18].

b) **p75NTR** : p75NTR est un récepteur aux neurotrophines. Les neurotrophines appartiennent à la famille des facteurs de croissance qui régulent la survie, la différenciation, la croissance axonale et dendritique, et l'activité synaptique des neurones. La famille des neurotrophines est constituée de 4 membres, NGF, DNNF, NT-3 et NT-4/5. Les neurotrophines exercent leurs effets en liant deux types de récepteurs de surface: les récepteurs Trk A, B et C (récepteurs tyrosine kinase) et le récepteur p75NTR (membre de la superfamille des récepteurs TNF).

p75NTR appartient à la famille des récepteurs au TNF et est donc dépourvu d'activité catalytique intrinsèque. Il possède deux fonctions physiologiques principales:

- Il module le signal des récepteurs à tyrosine kinase.
- Il initie, de façon autonome, des cascades de signalisation qui régulent la survie et l'apoptose de certaines cellules.

p75 NTR augmente l'affinité de TrkA pour le NGF. TrkA est alors capable de promouvoir la survie et la différenciation neuronale. Inversement, la survie médiée par TrkA apparaît comme un signal dominant bloquant l'apoptose médiée par p75NTR de façon autonome. Le mécanisme, utilisé par p75NTR, conduisant à l'apoptose n'est pas connu mais aboutit à l'activation de la voie JNK (c-jun N-terminal kinase).

p75NTR, via son domaine cytoplasmique, interagit avec de nombreuses molécules, dont MAGE-D1. En présence de NGF, la surexpression de MAGE-D1 dans des cellules sympato-adrénergiques exprimant p75NTR bloque la progression du cycle cellulaire et induit l'apoptose. Habituellement, MAGE-D1 se situe dans le cytosol mais, lorsque du NGF se lie à p75NTR, celui-ci recrute MAGE-D1 au niveau de la membrane plasmique. Dans ces conditions, MAGE-D1 et p75NTR peuvent former un complexe. Ce complexe inhibe la formation du complexe TrkA-p75NTR et diminue ainsi la survie cellulaire NGF-dépendante. p75NTR joue donc un rôle anti- ou pro-apoptotique suivant les situations [19] [20] [21] [22] [23].

c) **UNC5H1** : UNC5H1 est un récepteur de la superfamille des immunoglobulines qui lie des nétrines. Les nétrines sont des protéines sécrétées qui dirigent l'extension des axones et la migration cellulaire durant le développement neural. L'interaction entre UNC5H1 et MAGE-D1 induit l'apoptose des cellules. Cette interaction se fait via la séquence PEST de UNC5H1 (séquence riche en proline, acide glutamique, et thréonine situé près de la partie transmembranaire de la molécule) [24].

d) **Dlx5 et Msx2** : Ce sont des activateurs transcriptionnels à homéodomaine. Dlx5 joue un rôle crucial dans la formation et le développement des os. Msx2 est également exprimé dans les éléments squelettiques mais aussi dans beaucoup d'autres organes. MAGE-D1 modulerait la fonction transcriptionnelle de Dlx5 et Msx2 [25].

e) **Ror2** : Ror2 est un récepteur tyrosine kinase. Il joue un rôle crucial dans la morphogenèse développementale en régulant la prolifération, la différenciation, la migration et la mort cellulaire. L'interaction de MAGE-D1 avec Ror2 provoquerait la séquestration de MAGE-D1 au niveau membranaire, ce qui l'empêcherait de moduler l'activité transcriptionnelle de Msx2 [26].

IV.1.4. Un partenaire potentiel de MAGE-D2: **Bcl-Rambo**

Aucun partenaire de MAGE-D2 n'a été identifié jusqu'à présent. Au laboratoire, nous avons réalisé un criblage double hybride avec l'appât *Mage-d2*, cloné en phase avec le DNA BD de Gal4 dans pGBT9. Plusieurs partenaires potentiels ont été isolés. Un des clones identifiés contenait un segment d'environ 31 acides aminés faisant partie de la séquence de *Bcl-Rambo*.

Bcl-Rambo est un membre de la famille Bcl-2 récemment identifié. Cette famille de protéines joue un rôle central dans l'apoptose [27].

Les protéines de la famille Bcl-2 peuvent être groupées en trois sous-familles :

- (1) Bcl-2 et quelques protéines semblables comme Bcl-x, Bcl-w,... qui inhibent l'apoptose.
- (2) Bax, Bak, Bok, et d'autres cousins distants induisent l'apoptose.
- (3) Bad, Bim/Bod, Bid, Hrk sont pro-apoptotiques. Ils sont appelés protéines BH3-only car ils ne partagent que le motif BH3 contrairement aux deux autres sous-familles qui partagent les 4 motifs BH (Bcl-2 homology).

Les membres de ces trois sous-familles possèdent un segment hydrophobes C-terminal qui facilite leurs interactions avec le réticulum endoplasmique, l'enveloppe nucléaire et/ou la membrane externe des mitochondries. C'est à ce niveau que, généralement, ces membres résident et qu'ils s'assemblent lors de l'apoptose. Ces différents membres ont la capacité de former des hétérodimères entre eux, ce qui permet de réguler l'apoptose. En effet, des membres pro-apoptotiques peuvent former des hétérodimères avec des membres anti-apoptotiques. L'abondance des différentes protéines Bcl-2 dans la cellule détermine si la cellule peut survivre ou si elle doit rentrer en apoptose.

Bcl-Rambo, par sa séquence, semble appartenir à la sous-famille Bcl-2 anti-apoptotique mais est en réalité pro-apoptotique. Son ORF, qui s'étend sur 6 exons, code pour une protéine de 485 acides aminés (Figure 10). Bcl-Rambo contient, comme Bcl-2, les motifs BH 1,2,3 et 4 mais contrairement à Bcl-2, son ancre transmembranaire C-terminale est précédée d'une région unique de 250 acides aminés. On a nommé cette région BHNo car elle ne contient pas de motif BH. On peut remarquer, dans cette région BHNo, la présence de deux courtes répétitions en tandem, riches en sérines.

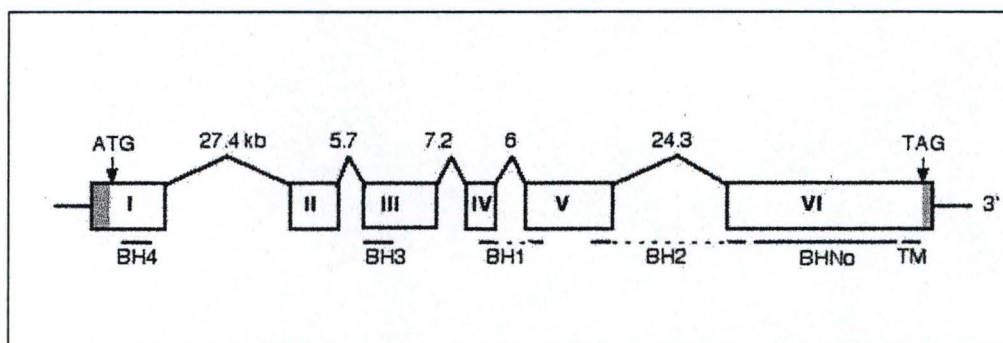


Figure 10. Organisation exon-intron du gène humain *Bcl-Rambo*.

L'ARNm de Bcl-rambo est long de 4,1 kilobases et peut être détecté dans de nombreux tissus, et plus particulièrement dans le cœur, le pancréas et le placenta. Bcl-Rambo présente plusieurs formes splicées. La queue hydrophobe C-terminale confère une localisation mitochondriale à Bcl-Rambo. Contrairement aux autres membres de la famille Bcl-2, on n'a pu détecter aucune interaction entre Bcl-rambo et d'autres membres de sa famille qu'ils soient pro- ou anti-apoptotiques. Bcl-rambo peut induire l'apoptose mais on ne sait pas par quelle voie de signalisation. On a en effet testé différents inhibiteurs possibles tant de la voie mitochondriale (ex :Bcl-x_L) que de la liaison possible avec le « death receptor » (ex :FLIP, FADD), mais aucun ne semble avoir une action sur Bcl-Rambo. Seuls les inhibiteurs qui interfèrent avec l'activité de la caspase-3, comme les membres de la famille IAP, semblent bloquer l'activité apoptotique de Bcl-Rambo. L'activité pro-apoptotique de Bcl-Rambo dépend du motif BHNo ainsi que de l'ancre C-terminale. La présence du motif BHNo augmenterait fortement l'activation de la caspase 3 et donc, la mort cellulaire. Par contre, la surexpression des autres motifs BH n'a que très peu d'effet sur la viabilité des cellules. L'absence de l'ancre membranaire C-terminale conduit à la perte complète de l'activité apoptotique.

IV.2. Etude phénotypique de souris Knock-Out

Pour étudier la fonction physiologique des gènes *Mage*, plusieurs souris Knock-Out ont été produites. Par exemple, l'étude des souris KO pour *Necdin* a fourni des indications importantes quant à la fonction des gènes *Mage* (voir point III.1.).

Au laboratoire, nous avons produit des souris KO pour :

- (1) *Mage-b1*
- (2) *Mage-b2*
- (3) *Mage-b1* et *Mage-b2*
- (4) *Mage-d1*
- (5) *Mage-d2*

Dans le cadre de mon mémoire, je me suis intéressée plus particulièrement aux phénotypes des souris "double-mutante" en *Mage-b1* et *Mage-b2* et aux simples mutantes *Mage-d2*.

II.1 Les souris KO *Mage-b1* et *Mage-b2*

Dans les souris mutantes *Mage-b1*, un fragment de l'ORF allant de l'ATG initiateur de la traduction jusqu'au site EcoRI a été remplacé par une cassette constituée de l'ORF de LacZ, suivie d'un signal de polyadénylation et d'un gène de résistance à la néomycine sous la dépendance d'un promoteur PGK (Figure 11).

Dans l'allèle mutant de *Mage-b2*, un fragment commençant à l'ATG et couvrant toute l'ORF a été remplacé par l'ORF du gène rapporteur CAT (Chloramphénicol Acétyl transférase), suivie d'un gène de résistance à l'hygromycine (HmB) (Figure 12).

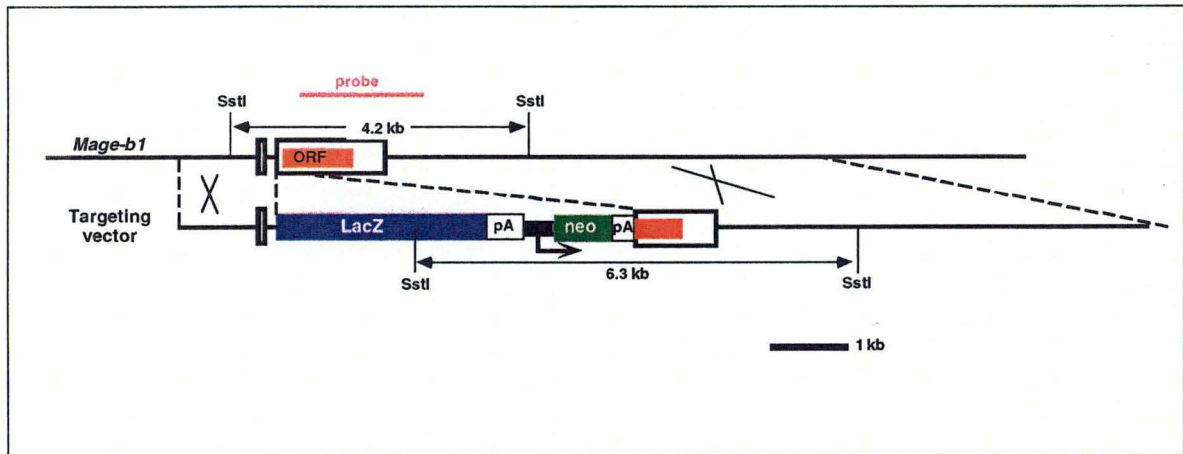


Figure 11. Modèle pour l'établissement de souris KO pour le gène *Mage-b1*. Le vecteur de ciblage comprend le gène rapporteur LacZ et le marqueur de résistance néo.

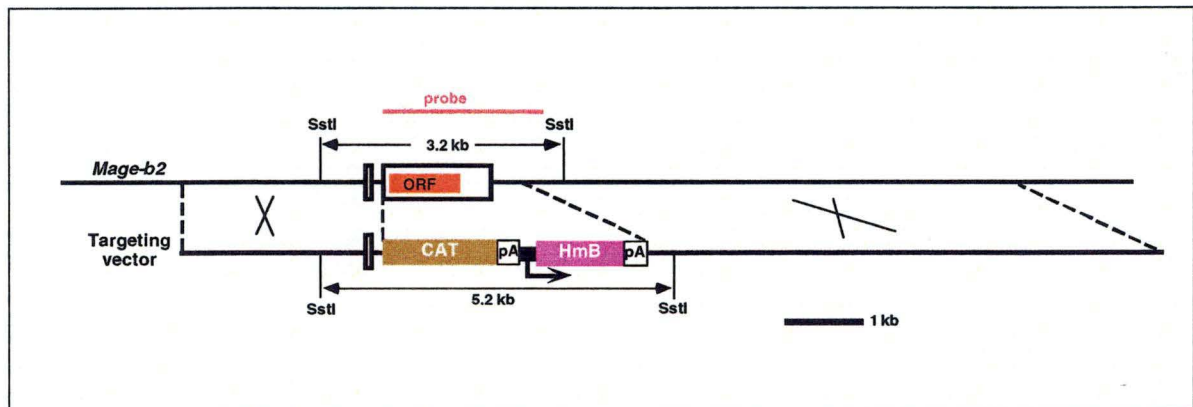


Figure 12. Modèle pour l'établissement de souris KO pour le gène *Mage-b2*. Le vecteur de ciblage comprend le gène rapporteur CAT et le marqueur de résistance HmB.

Les souris KO "double-mutante" pour les gènes *Mage-b1* et *Mage-b2* ont été obtenues par inactivation séquentielle du gène *Mage-b1*, puis du gène *Mage-b2* dans les cellules ES.

II.2. Les souris KO *Mage-d2*

La stratégie d'inactivation du gène *Mage-d2* a été réalisée grâce au système conditionnel Cre-Lox. L'allèle conditionnel contient 2 sites lox en orientation directe, l'un dans l'intron 2, l'autre dans l'intron 12. La recombinaison site-spécifique réalisée par Cre aboutit à la délétion de la quasi totalité de la partie codante du gène. Cette délétion a été réalisée dans des animaux issus du croisement entre une lignée contenant l'allèle conditionnel (floxed) et de souris transgéniques exprimant Cre de manière ubiquiste (PGK-Cre) (Figure 13).

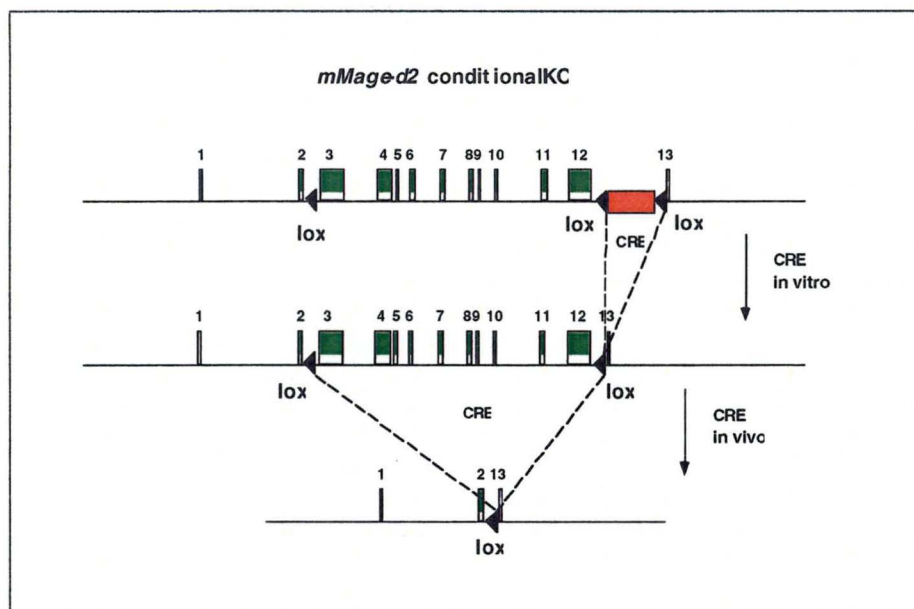


Figure 13. Schéma illustrant la stratégie d'inactivation du gène *Mage-d2*. Le gène de résistance à la néomycine flanqué de sites lox a été inséré dans le 12^{ème} intron du gène *Mage-d2* dans des cellules ES. Un site lox a également été inséré au niveau du 2^{ème} intron dans ces cellules. Un plasmide capable de diriger l'expression de le gène Cre a ensuite été électroporé de manière transitoire dans les cellules ES. L'expression de Cre dans les cellules ES a permis la délétion du gène de résistance à la néomycine. Les cellules ES obtenues contenant l'allèle conditionnel de *Mage-d2* ont servi à obtenir une lignée de souris. Ces souris conditionnelles pour *Mage-d2* ont été croisées avec des souris transgéniques exprimant Cre de manière ubiquiste. Des souris déficientes en *Mage-d2* ont été obtenues dans la descendance de ces croisements.

V. Objectif du mémoire

L'objectif de ce mémoire est de contribuer à l'étude de la fonction des protéines MAGE. Mon travail comporte deux volets:

1. L'étude de la fonction des protéines Mage-b1 et Mage-b2
2. L'étude de la fonction de la protéine Mage-d2

L'étude du rôle des protéines Mage-b1 et Mage-b2 s'est basée sur l'étude phénotypique de souris déficientes pour les gènes *Mage-b1* et *Mage-b2*. À première vue, ces souris semblent en bonne santé et se reproduisent parfaitement. Comme les gènes *Mage-b* sont exprimés dans les spermatozoïdes ronds, nous avons recherché un phénotype testiculaire.

L'étude de la fonction de la protéine Mage-d2 a été abordée de deux manières :

- Premièrement, nous avons vérifié l'interaction entre la protéine Mage-d2 et Bcl-Rambo au moyen d'un test double hybride.
- Deuxièmement, nous avons observé des souris déficientes en gène *Mage-d2* à la recherche de traits phénotypiques.

***RESULTATS ,
DISCUSSION ET
PERSPECTIVES***

I. Etude du phénotype de souris déficientes en gènes *Mage-b1* et *Mage-b2*.

Le rôle des gènes *Mage* de type I (expression testiculaire et tumorale) reste inconnu à ce jour. Notre étude propose pour la première fois d'aborder la fonction des gènes *Mage* de Type I au moyen de souris knock-out pour les gènes *Mage-b1* et *-b2*.

Les souris "double-mutantes" ont été obtenues au laboratoire par recombinaison homologue en cellules ES (129/ola). Dans ces souris, un gène rapporteur codant pour la β -galactosidase remplace la partie codante de *Mage-b1*, et la portion codante du gène *Mage-b2* est remplacée par le rapporteur CAT (voir introduction, figures 11 et 12). Les souris homozygotes (femelles homozygotes et mâles hémizygotés puisque les deux gènes sont situés sur le chromosome X) obtenues au départ d'un croisement entre la souris Chimère et une femelle 129/sv sont viables et fertiles. Ces souris ont donc un fond génétique constitué d'un mélange de 129/ola et de 129/sv.

Puisque les ARNm de *Mage-b1* et *-b2* sont exprimés dans les spermatides ronds, nous avons recherché au cours de ce travail un phénotype testiculaire. Notre étude a comporté trois parties:

-Premièrement, nous avons analysé la taille et la composition des portées chez les souris déficientes en *Mage-b1/Mage-b2* (notées KOb1b2) afin de détecter un problème de fertilité ou de mortalité des animaux mutés.

-Deuxièmement, nous avons réalisé des études histologiques de testicules provenant d'animaux mutés.

-Troisièmement, nous avons comparé le nombre de spermatozoïdes produits par des animaux mutés.

I.1. Analyse de la composition de la descendance de souris déficientes en gènes *Mage-b1* et *Mage-b2*

Différents croisements ont été réalisés:

1. Femelles hétérozygotes x mâles hémizygotés
2. Femelles hétérozygotes x mâles sauvages
3. Femelles homozygotes x mâles hémizygotés

L'intérêt des croisements (femelles hétérozygotes x mâles hémizygotés ou sauvages) est d'observer l'influence du génotype du mâle sur la composition et la taille de la descendance. C'est une façon d'évaluer la fertilité des mâles mutés par rapport à celle des mâles sauvages en comparant le taux de reproduction des couples.

D'autre part, ces croisements nous ont permis d'obtenir des « frères » mutés et sauvages dont nous avons besoin pour nos expériences (voir point I.2).

Nous avons observé la taille des portées, le sex-ratio et la proportion de chaque génotype.

Le génotype des souris a été déterminé par PCR en utilisant les amorces CATs et CATas qui amplifient un fragment du gène CAT remplaçant le gène *Mage-b2* (voir matériel et méthodes, figure 3). L'amplification seule du rapporteur CAT suffit pour déterminer si une souris est « double-mutante ». En effet, les gènes *Mage-b1* et *Mage-b2* sont contigus sur le chromosome X et ségrègent donc ensemble à 100 % lors de la méiose.

Les génotypes attendus pour les 3 types de croisements sont repris ci-dessous.

Femelles hétérozygotes x mâles sauvages

	X^{KO}	X^{WT}
X^{WT}	$X^{KO} X^{WT}$	$X^{WT} X^{WT}$
Y	$X^{KO} Y$	$X^{WT} Y$

25% femelles hétérozygotes ($X^{KO} X^{WT}$)
 25% femelles sauvages ($X^{WT} X^{WT}$)
 25% mâles hémizygotés ($X^{KO} Y$)
 25% mâles sauvages ($X^{WT} Y$)

Femelles hétérozygotes x mâles hémizygotés

	X^{KO}	X^{WT}
X^{KO}	$X^{KO} X^{KO}$	$X^{KO} X^{WT}$
Y	$X^{KO} Y$	$X^{WT} Y$

25% femelles homozygotes ($X^{KO} X^{KO}$)
 25% femelles hétérozygotes ($X^{KO} X^{WT}$)
 25% mâles hémizygotés ($X^{KO} Y$)
 25% mâles sauvages ($X^{WT} Y$)

Femelles homozygotes x mâles hémizygotés

	X^{KO}	X^{KO}
X^{KO}	$X^{KO} X^{KO}$	$X^{KO} X^{KO}$
Y	$X^{KO} Y$	$X^{KO} Y$

50% femelles homozygotes ($X^{KO} X^{KO}$)
 50% mâles hémizygotés ($X^{KO} Y$)

X^{KO} : Chromosome X porteur des allèles mutés *Mage-b1* et *-b2*

X^{WT} : Chromosome X sauvage

Y : Chromosome Y

Les résultats observés sont repris dans les 3 tableaux ci-dessous (tableau I.1, I.2 et I.3) :

Tableau I.1. Produits de croisements de femelles hétérozygotes avec des mâles sauvages

	<u>Naissances</u>	<u>Femelles</u> <u>wt ou +/-</u>	<u>Mâles</u>		<u>Morts</u> ¹
			<u>wt</u>	<u>hémi</u>	
Portée 1	4	0	0	0	4
Portée 2	11	9	2	0	0
Portée 3	6	4	0	0	2
Portée 4	3	3	0	0	0
Portée 5	2	1	0	1	0
Portée 6	1	1	0	0	0
Portée 7	6	2	2	2	0
Portée 8	9	6	1	2	0
Portée 9	11	8	3	0	0
Portée 10	3	0	0	0	3
Portée 11	7	3	2	0	2
Portée 12	8	4	1	1	2
Portée 13	2	2	0	0	0
Portée 14	10	6	1	3	0
Portée 15	7	2	2	3	0
TOTAL	90	51	14	12	13

1. Cette colonne comptabilise les souriceaux morts sans qu'on n'ait pu déterminer leur sexe et leur génotype à cause du cannibalisme de leur mère.

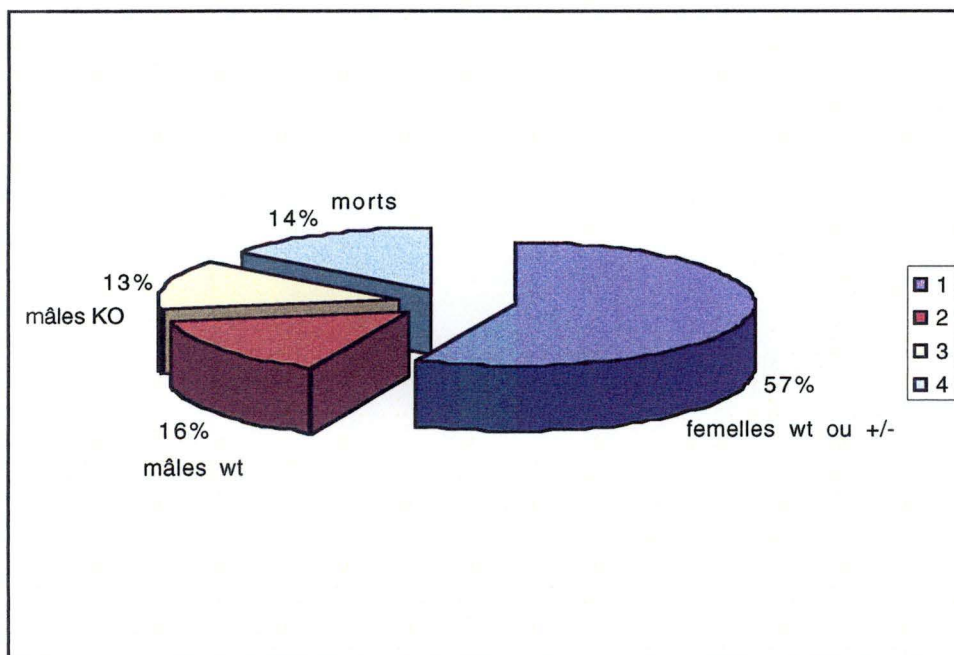


Figure I.1. Statistiques sur les portées issues de croisements entre femelles hétérozygotes et mâles sauvages (wt).

Dans les croisements entre femelles hétérozygotes et mâles sauvages, la taille moyenne des portées est de 6,0 animaux, ce qui correspond à la taille attendue des portées chez des souris 129/sv (entre 4 et 7 animaux). Sur un total de 90 animaux, il y avait 51 femelles, 26 mâles et 13 nouveau-nés morts (dont nous ignorons le sexe et le génotype), soit 57 % de femelles pour 29 % de mâles. Le taux de mortalité à la naissance est de 14 %, ce qui reste dans les valeurs observées dans le reste de l'animalerie. Les femelles sont en excès par rapport aux mâles. Nous ignorons la cause de ce sex-ratio anormal. La proportion de mâles se répartit en 54 % de mâles sauvages et 46 % de mâles KOb1b2. Cette distribution de mâles mutés / mâles sauvages correspond à la distribution théorique attendue (test Chi-carré, $p > 0,05$). Nous n'observons donc pas de déficit en animaux mutés par rapport aux sauvages.

Tableau I.2. Produits de croisements de femelles hétérozygotes avec des mâles hémizygotés

	<u>Naissances</u>	<u>Femelles</u> <u>+/- ou -/-</u>	<u>Mâles</u>		<u>Morts¹</u>
			<u>wt</u>	<u>hémi</u>	
Portée 1	7	5	0	2	0
Portée 2	10	6	1	2	1
Portée 3	4	3	1	0	0
Portée 4	3	1	2	0	0
Portée 5	9	5	3	1	0
Portée 6	6	2	2	2	0
Portée 7	5	4	0	1	0
Portée 8	5	3	2	0	0
Portée 9	12	7	2	2	1
TOTAL	61	36	13	10	2

1. Cette colonne comptabilise les souriceaux morts sans qu'on n'ait pu déterminer leur sexe et leur génotype à cause du cannibalisme de leur mère.

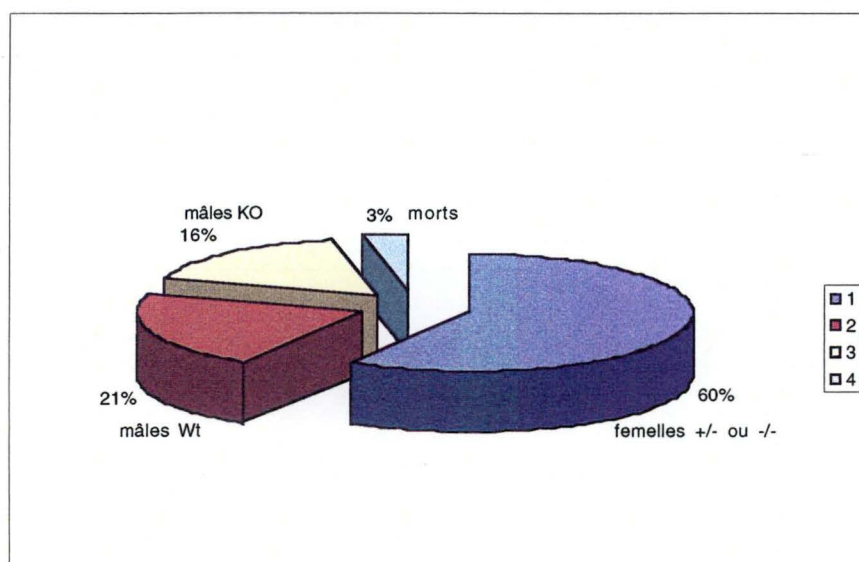


Figure I.2. Statistiques sur les portées issues des croisements entre femelles hétérozygotes et mâles hémizygotés.

Dans les croisements entre femelles hétérozygotes et mâles hémizygotés, la taille moyenne des portées est de 6,7 animaux, ce qui ne diffère pas de celle produite par les mâles sauvages. Sur un total de 61 animaux, il y a 23 mâles, soit 37 % et 36 femelles, soit 60 %. Le taux de mortalité à la naissance est de 3 %, ce qui est relativement faible. Nous n'avons pas pu déterminer le génotype des souriceaux *morts*, ceux-ci disparaissant généralement avant que nous puissions prélever un fragment de queue (cannibalisme pratiqué par leur mère).

La proportion de mâles se répartit en 56 % de sauvages et 44 % de mutés. Nous n'observons pas de déficit significatif en mâles mutés dans ce croisement (test Chi-carré, $p > 0,05$).

D'autre part, nous avons observé que la fréquence des portées n'était pas affectée par le génotype des animaux.

En conclusion, la taille des portées issues du croisements femelles hétérozygotes x mâles sauvages ou mutés ne diffère pas. De plus, chaque couple donne en moyenne une portée toutes les 8 semaines, une fréquence identique à celle observée chez les souris sauvages. Ces observations indiquent que les mutations b1b2 n'affectent pas la fertilité des animaux.

Tableau I.3. Produits de croisements de femelles homozygotes avec des mâles hémizygotés

	<u>Naissances</u>	<u>Femelles</u>	<u>Mâles</u>	<u>Morts¹</u>
Portée 1	13	5	7	1
Portée 2	8	4	1	3
Portée 3	2	0	0	2
Portée 4	8	1	5	2
Portée 5	9	3	6	0
Portée 6	3	0	2	1
Portée 7	11	4	6	1
Portée 8	6	4	2	0
Portée 9	4	1	2	1
Portée10	4	0	0	4
Portée 11	13	7	6	0
Portée 12	4	4	0	0
Portée 13	6	3	3	0
Portée 14	4	1	3	0
Portée 15	6	3	3	0
Portée 16	7	5	1	1
Portée 17	3	1	1	1
Portée 18	6	5	1	0
Portée 19	3	3	0	0
Portée 20	6	4	2	0
TOTAL	126	58	51	17

1. Cette colonne comptabilise les souriceaux morts sans qu'on n'ait pu déterminer leur sexe à cause du cannibalisme de leur mère

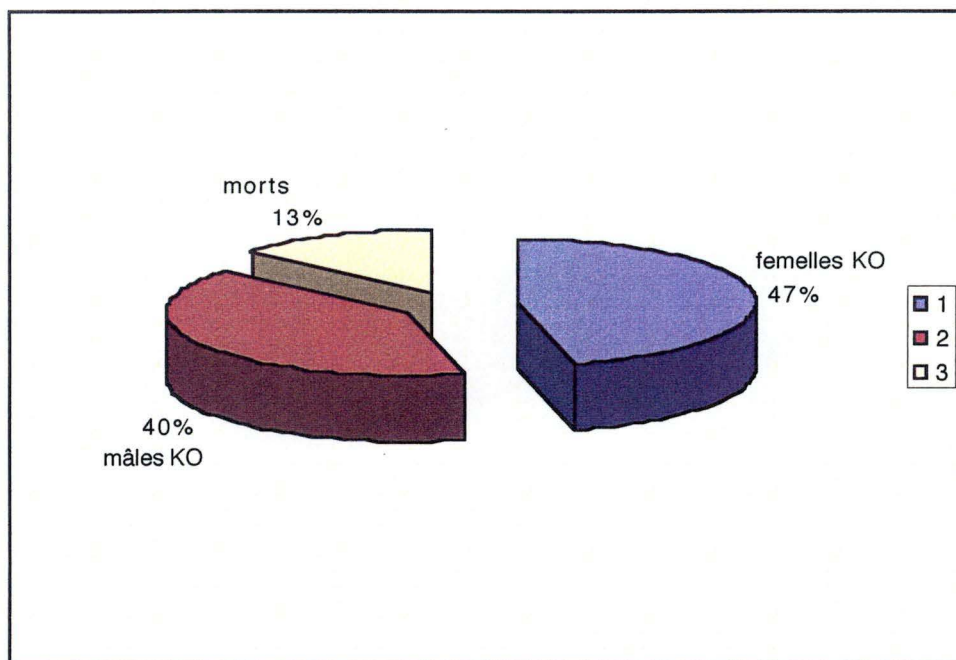


Figure I.3. Statistiques sur les portées issues de croisements entre femelles homozygotes et mâles hémizygotes.

La taille moyenne des portées dans les croisements entre femelles homozygotes et mâles hémizygotes est de 6,3 animaux. En tout, nous avons observé 53 % de femelles homozygotes et 47 % de mâles hémizygotes, ce qui correspond à la distribution attendue (test Chi-carré, $p > 0,05$). Nous n'avons pas pu déterminer le sexe des 13 % de morts à cause du cannibalisme pratiqué par les adultes sur les nouveau-nés. Comme pour les croisements entre femelles hétérozygotes et mâles sauvages, ce taux de mortalité est normal.

En conclusion, la taille des portées est similaire dans les différents croisements réalisés et ne diffère pas de celles observées dans les colonies de souris sauvages hébergées dans notre animalerie. Il semble donc que la fertilité de nos souris ne soit pas affectée. Comme les souris peuvent être fertiles avec moins de 10 % du nombre normal de spermatozoïdes, nous avons décidé d'examiner les testicules afin de détecter d'éventuelles anomalies. Nous avons aussi déterminé le nombre de spermatozoïdes matures chez les souris KOb1b2.

I.2. Etude histologique de testicules de souris KOb1b2

Afin de comparer des animaux les plus semblables possible génétiquement, nous avons étudié des mâles sauvages et des mâles mutés, issus de mêmes portées. Ces mâles ont été obtenus en croisant des femelles hétérozygotes et des mâles sauvages ou hémizygotes (voir point I.1). Ils ont donc un background génétique semblable et exactement le même âge. Nous avons prélevé des testicules à différents âges (22, 29, et 38 jours). Chez la souris, la maturité sexuelle est atteinte vers 30 jours. À 22 jours, le stade de différenciation le plus avancé est le stade spermatide. À 29 jours, les

premiers spermatozoïdes apparaissent dans la lumière des tubules séminifères. À ce stade, les spermatozoïdes ne sont pas encore présents dans l'épididyme, le souriceau n'est donc pas encore capable de se reproduire. La puberté n'est atteinte qu'aux alentours de 38 jours. Les tubules séminifères ainsi que l'épididyme contiennent alors de nombreux spermatozoïdes et le mâle est capable de se reproduire.

Pour nos analyses, nous ne disposions que d'un nombre limité de frères mutés et sauvages, notre étude est donc restreinte à quelques animaux.

Tableau I.4. Génotype, poids et poids des testicules de mâles KOb1b2 et wt

<u>Fratrie</u>	<u>Génotype</u>	<u>Poids souris (en g)</u>	<u>Poids des testicules (en mg)</u>	<u>Moyenne poids testicules/poids souris x10⁻³</u>
1	wt #1 (22 jours)	9,85	24/23	2,38
	KOb1b2 #1 (22 jours)	9,54	27/27	2,83
2	wt #2 (22 jours)	10,40	29/27	2,69
	KOb1b2 #2.1 (22 jours)	9,40	36/26	3,30
	KOb1b2 #2.2 (22 jours)	8,40	31/30	3,63
3	wt #3 (22 jours)	9,47	28/28	2,95
	KOb1b2 #3 (22 jours)	8,43	20/20	2,37
4	wt #4 (29 jours)	14,40	41/38	2,74
	KOb1b2 #4 (29 jours)	12,25	39/38	3,14
5	wt #5 (38 jours)	18,35	78/70	4,03
	KOb1b2 #5 (38 jours)	21,83	73/63	3,11

Les poids des testicules rapportés au poids de la souris ne montre pas de différence significative entre les mâles wt et les mâles KOb1b2 (test t student, p=0,75) (Tableau I.4).

Nous avons poursuivi notre analyse par une étude histologique de ces testicules. Après fixation au bouin, les échantillons ont été enrobés en paraffine et les coupes colorées à l'hémalum (pour mettre en évidence les noyaux), à l'érythrosine (pour colorer le cytoplasme) et enfin au safran (pour colorer le tissu conjonctif).

Coupes de testicules au stade 22 jours: À ce stade, la souris n'est pas encore pubère. Les cellules les plus avancées dans la spermatogenèse sont les spermatides. Aucun spermatozoïde n'est visible (Figure I.1).

Sur les 4 souris KOb1b2, les animaux KOb1b2 #1 et KOb1b2 #2.2 ne montrent pas de différences par rapport aux contrôles wt.

Par contre, nous avons observé de nombreux spermatides en apoptose chez le mâle muté KOb1b2 #3. Les spermatides qui entrent en apoptose forment des symplastes dans le centre des tubules séminifères. Sur chaque coupe examinée (n=14), nous avons observé une moyenne de 6 symplastes alors que son frère sauvage en présentait au maximum 1. Un symplaste est une grande cellule où l'on peut distinguer des spermatides en dégénérescence. Sur une coupe de testicule, on peut apercevoir les symplastes dans la lumière des tubules séminifères. On les reconnaît à leur grande taille et à la présence de plusieurs noyaux (Figure I.2). Une phase d'apoptose massive se produit au cours de la maturation du testicule mais elle doit normalement se produire au stade 14 jours et non 22 jours. Il semblerait que chez cet individu la spermatogenèse soit retardée, ce qui semble corroboré par le poids inférieur des testicules chez cet animal. Étant donné son caractère unique, il n'est pas possible à ce stade de décider si ce retard est lié à la mutation b1b2. Il faudrait pour cela examiner un plus grand nombre d'animaux.

Le mâle muté KOb1b2 #2.1 présentait un testicule macroscopiquement plus grand que l'autre. L'examen anatomopathologique a montré qu'il était atteint d'un tératome d'origine testiculaire. La présence de cette tumeur n'est pas étonnante puisque les tératocarcinomes sont extrêmement fréquents chez les souris 129/sv (30 %). Cette tumeur n'est donc probablement pas liée aux mutations des gènes *Mage-b1* et *-b2*.

Coupes de testicules au stade 29 jours: C'est à ce stade que l'on commence à voir apparaître des spermatozoïdes dans la lumière des tubules séminifères. Aucune différence entre l'animal muté et le contrôle sauvage n'a pu être observée (Figure I.3).

Coupes de testicules au stade 38 jours: À 38 jours, les souris ont atteint la puberté. De nombreux spermatozoïdes sont visibles dans les tubules séminifères et l'épididyme. Aucune différence n'a été notée sur ces coupes entre le mâle sauvage et son frère muté (Figure I.4).

Pour voir si l'on observe une dégénérescence des testicules avec l'âge, nous avons prélevé les testicules d'un mâle 129/sv de 8 mois et d'un mâle KOb1b2 de 7 mois. Aucune différence notable n'a été observée dans le poids des testicules rapporté au poids de l'animal (4,61 pour le mâle wt et 3,43 pour le mâle KOb1b2) ni sur les coupes histologiques. Chez les deux souris, l'épithélium séminifère contenait de façon normale, en plus des cellules de Sertoli, des spermatogonies, de nombreuses couches de spermatocytes I et II, des spermatides ronds et allongés. La lumière des tubules séminifères contenait de nombreux spermatozoïdes matures. Les spermatozoïdes étaient également abondants dans la lumière de l'épididyme (Figure I.5).

L'examen histologique des coupes en paraffine de testicules de souris mutées à différents stades ne nous a donc pas permis de mettre en évidence des anomalies majeures chez les souris KOb1b2. Comme c'est le cas pour les testicules normaux, les testicules provenant de souris KOb1b2 contenaient de nombreux tubules séminifères, et

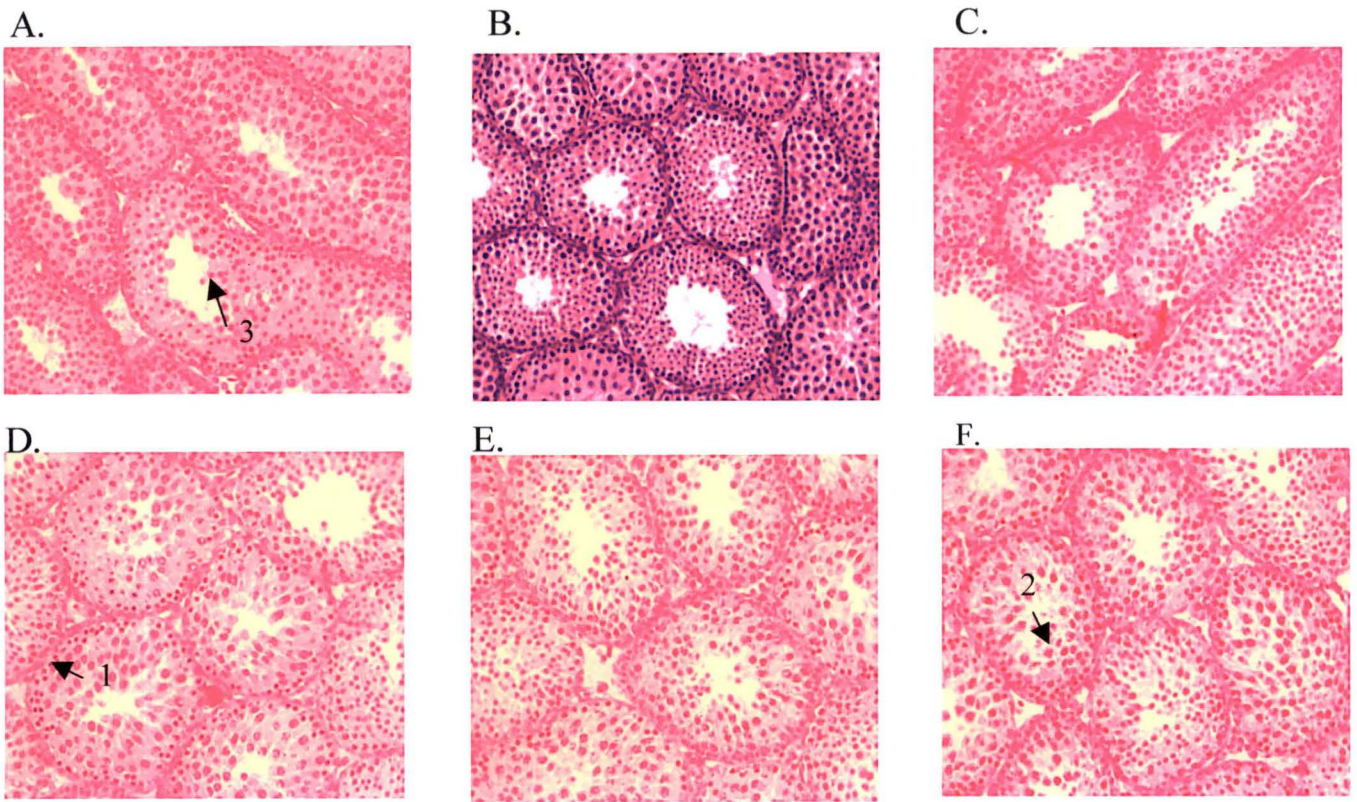


Figure I.1. Coupes de testicules de 22 jours après coloration HES (G 200x). A, B et C, tubules séminifères de souris Wt #1, #2 et #3. D et E, tubules séminifères de la souris KO b1b2 #2.2. F, tubules séminifères de la souris KO b1b2 #1. Sur les coupes A, B, C, D, E et F des spermatogonies (1), des spermatocytes I/II (2) et des spermatozoïdes (3) sont présents.

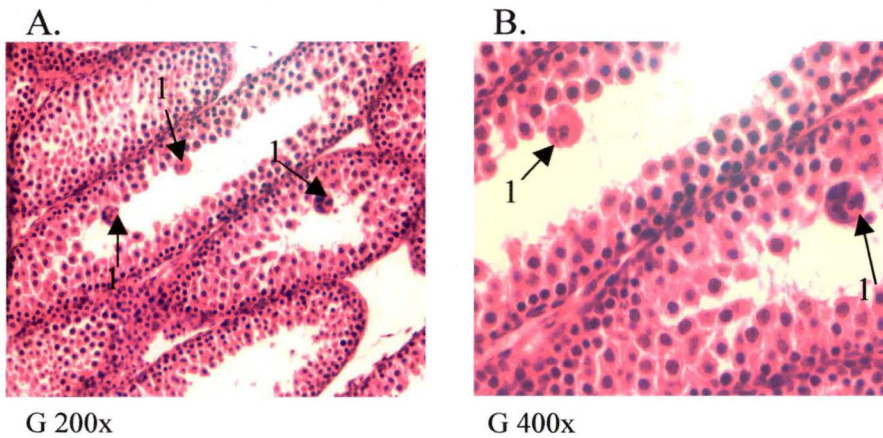


Figure I.2. Coupes de testicules de 22 jours de la souris KO b1b2 #3 après coloration HES. A et B, des symplastes (1) sont visibles dans la lumière.

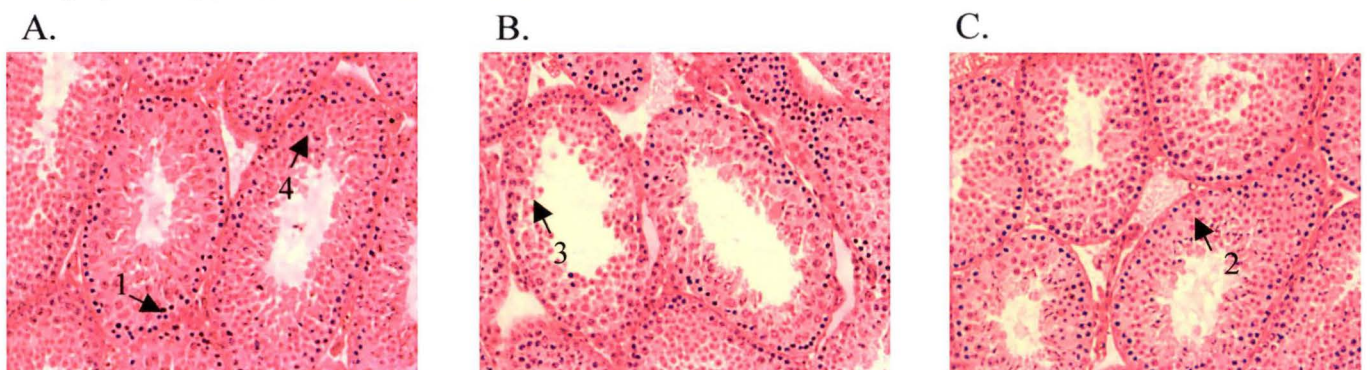


Figure I.3. Coupes de testicules de 29 jours après coloration HES (G 200x). A, tubules séminifères de souris Wt #4. B et C, tubules séminifères de la souris KO b1b2 #4. Sur les coupes A, B et C des spermatogonies (1), des spermatocytes I/II (2), des spermatozoïdes ronds (3) et des spermatozoïdes (4) sont présents.

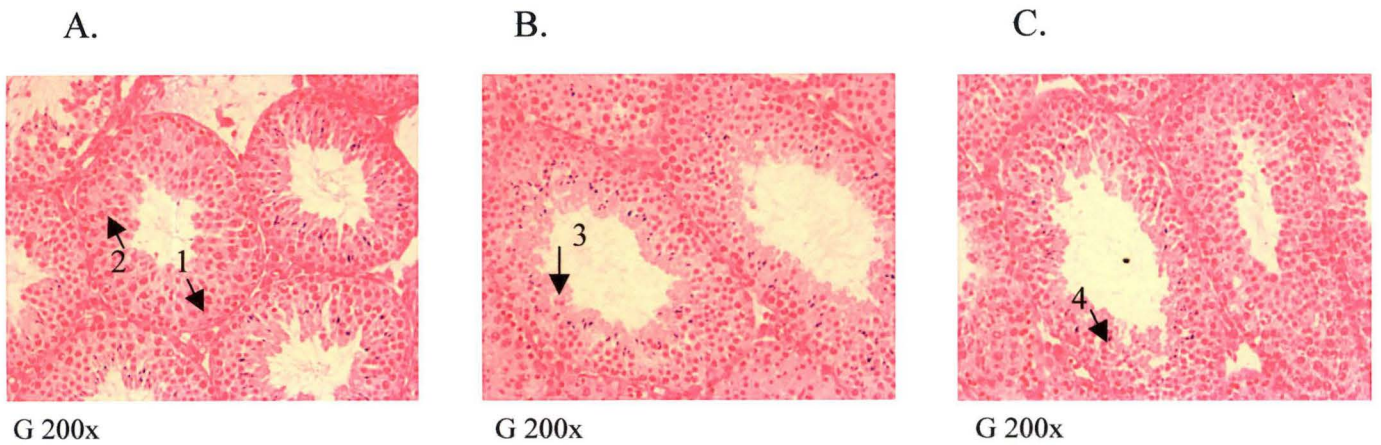


Figure I.4. Coupes de testicules de souris âgées de 38 jours, coloration HES. A, tubules séminifères de souris Wt #5. B et C, tubules séminifères de de la souris KO b1b2 #5. Les épithéliums des 2 souris contiennent des spermatogonies (1), des spermatocytes I/II (2), des spermatides ronds (3) et des spermatozoïdes (4). Aucune différence n'est visible entre A, B et C.

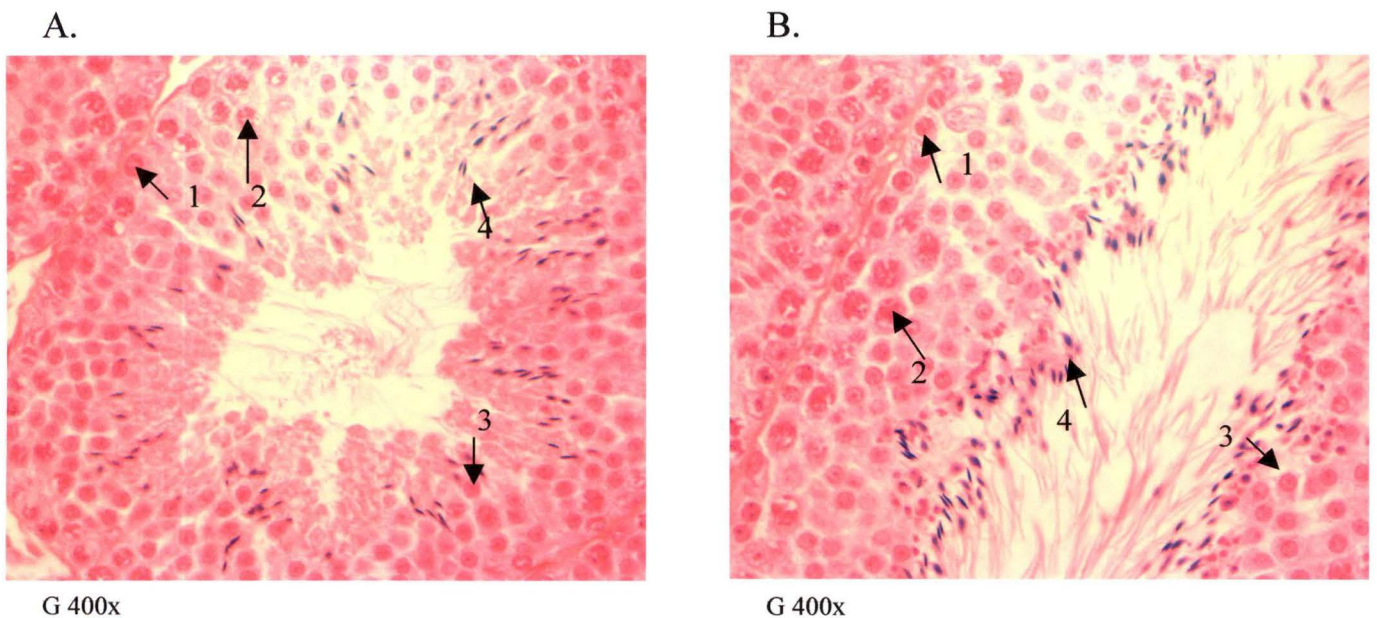


Figure I.5. Coupes de testicules adultes, coloration HES. A, tubule séminifère de souris KO b1b2. B, tubule séminifère de souris 129sv. Les épithéliums de A et B comprennent des spermatogonies (1), des spermatocytes I/II (2), des spermatides ronds (3) et des spermatozoïdes (4). Aucune différence n'est visible entre A et B.

un espace interstitiel limité. Le diamètre des tubules séminifères, l'épaisseur de l'épithélium séminifère ainsi que la taille de la lumière semblaient normaux. L'épithélium séminifère contenait des cellules germinales mâles aux mêmes stades que celles observées chez les animaux contrôles du même âge. Aucune anomalie n'a donc pu être détectée dans la spermatogenèse des souris KOb1b2.

I.3. Numération de spermatozoïdes

Afin de déterminer si le nombre de spermatozoïdes matures est modifié chez les souris mutées, nous avons isolé et dénombré les spermatozoïdes de l'épididyme de souris KOb1b2 et de souris sauvages 129/sv du même âge. Nous n'avons pas pu réaliser cette numération sur un grand nombre d'animaux, étant limités par le nombre de souris du même âge disponibles.

Tableau I.5. Numération des spermatozoïdes présents dans l'épididyme de souris wt et KOb1b2

		<u>Nombre de spermatozoïdes dans chacun des 2 épидидymes (en million)</u>
<u>Souris wt</u>	1	11,70/20,60
	2	11,20/0 (taille réduite du testicule)
	3	7,90/9,90
	4	12,10/8,00

		<u>Nombre de spermatozoïdes dans chacun des 2 épидидymes (en million)</u>
<u>Souris KOb1b2</u>	1	11,60/5,30
	2	11,70/0 (Tératome)
	3	6,10/7,30
	4	6,50/5,00
	5	6,20/5,40

La moyenne du nombre de spermatozoïdes par épидидyme chez les souris wt est de 11,6 millions et celle des souris KOb1b2 est de 7,2 millions (l'épididyme du testicule de taille réduite de la souris wt 2 et l'épididyme du testicule atteint d'une tumeur chez la souris KOb1b2 2 n'ont pas été pris en compte dans le calcul des moyennes) (Tableau I.5).

Nous avons vérifié par un test ANOVA si la différence entre les deux types de souris (129/sv et KOb1b2) est significative. Le nombre de spermatozoïdes par épидидyme des souris wt est significativement différent de celui des souris KOb1b2 ($p=0,027$). Cependant, il existe une grande variabilité dans le nombre de spermatozoïdes par épидидyme à l'intérieur de chacun des deux groupes de souris. Ces observations préliminaires suggèrent donc que la mutation *Mage-b1b2* provoque un déficit quantitatif de production de spermatozoïdes. Nous programmons d'analyser un plus grand nombre d'animaux afin de confirmer ou d'infirmer cette observation.

I.4. Discussion et perspectives

Nous avons étudié une lignée de souris double knock-out *Mage-b1 Mage-b2*. Aucun déficit significatif dans la capacité de reproduction de ces animaux n'a pu être observé: la fréquence d'accouplement et la taille des portées étaient semblables à celles de souris contrôles.

L'analyse histologique des testicules des mutants n'a pas révélé d'anomalie majeure. Cependant, la numération des spermatozoïdes suggère que les mâles KOb1b2 produisent moins de ces cellules que les contrôles sauvages. Cette observation doit, néanmoins, être confirmée sur un plus grand nombre d'animaux à cause de l'importance de la variabilité individuelle. Nous envisageons également de réaliser une étude plus approfondie visant à déterminer la mobilité et la proportion de formes anormales des spermatozoïdes.

Il est possible que l'effet des mutations des gènes *Mage-b1*, *-b2* soit masqué par la présence d'une copie intacte du gène *Mage-b3*. Ce gène possède une structure dépourvue d'intron caractéristique des rétrogènes, mais sa grille de lecture est préservée et code pour une protéine très semblable aux protéines encodées par *Mage-b1* et *Mage-b2*. L'expression de *Mage-b3* dans les spermatides des animaux « double-mutant » *Mage-b1 Mage-b2* a été détectée par hybridation in situ. L'objectif est donc d'obtenir une souris déficiente pour le gène *Mage-b3* et de croiser cette souris mutante avec les souris KOb1b2 pour obtenir une lignée de souris « triple-mutante » déficiente pour les 3 gènes *Mage-b*. L'étude de ces animaux devrait nous renseigner sur la fonction des protéines *Mage-b* dans le testicule. Des cellules ES KO *Mage-b3* ont été obtenues et des expériences d'agrégation sont programmées pour obtenir des animaux Chimériques.

II. Vérification de l'interaction Mage-d2 / Bcl-Rambo

Une banque d'expression double hybride d'ADNc d'embryon de souris de 17 jours a été criblée avec un appât comportant l'entièreté de la protéine Mage-d2. Plusieurs plasmides de la bibliothèque ont ainsi été identifiés dont un, pACT-BclR-31, qui contenait un fragment de Bcl-Rambo codant pour les 31 acides aminés terminaux de la protéine (Figure II.1). Le fragment inclut l'ancre membranaire impliquée dans l'activité pro-apoptotique de Bcl-Rambo. L'ADNc de Bcl-Rambo est long de 3107 bp et comprend une ORF de 1299 bp et une extrémité 3'UTR de 1624 bp.

J'ai entrepris d'examiner si une protéine hybride contenant l'entièreté de Bcl-Rambo interagissait avec la protéine Mage-d2.

II.1. Clonage de l'insert dans PCRII

L'ORF de *Bcl-Rambo* a été amplifiée par PCR à partir d'ADNc de cerveau E14 de souris. L'enzyme High Fidelity, utilisée pour cette PCR, permet une amplification des clones avec un taux minimal d'erreur. Les amorces utilisées pour la PCR (Rambo1S et Rambo2AS) contenaient les sites de restriction BamHI et XhoI de manière à cloner le gène en phase avec la partie Gal4 dans pACT2.

Dans une première étape, les produits PCR d'ADNc ont été clonés dans le plasmide PCRII (TOPO TA Cloning) (Figure II.2).

Une PCR avec les amorces Sp6 et T7 a permis d'identifier les colonies ayant des plasmides recombinants.

Trois d'entre eux ont été séquencés et un seul s'est avéré contenir une grille de lecture correcte, le clone 17.

II.2. Clonage de l'insert dans pACT2.

Le clonage du clone 17 dans pACT2 nous a permis de tester l'interaction dans la levure. Ce vecteur contient les sites de restriction pour les enzymes BamHI et XhoI. Il comprend aussi le gène LEU2, qui permet de sélectionner sa présence dans la levure.

Le fragment BamHI-XhoI de Bcl-Rambo a été cloné dans pACT2 (Figure II.3).

Le plasmide pACT2 ainsi que le clone 17 ont été digérés par les endonucléases BamHI et XhoI. Après purification des produits digérés et ligation, les clones recombinants ont été identifiés par PCR avec les amorces pACT2 3' bis (dans le vecteur) et Rambo 6S (dans l'insert). Sur 5 clones amplifiés, les clones p17.1, p17.2, p17.4, p17.6 avaient une séquence correcte.

II.3. Transformation de la levure

Nous avons effectué une première transformation dans la levure de souche Y190. Les clones p17.1, p17.2, p17.4, p17.6 (contenant l'ORF entière de *Bcl-Rambo*) et pACT-BclR-31 ont été introduits dans Y190 avec le vecteur dirigeant l'expression de l'appât *Mage-d2* (pGBT9-Mage-d2). En parallèle, ces plasmides ont été introduits séparément dans Y190 (contrôles négatifs). Après 3 jours de sélection, une couche d'agarose contenant un substrat (X-gal) de la β -galactosidase a été coulé sur les boîtes. Si le facteur de transcription Gal4 est reconstitué par une interaction entre les protéines Mage-d2 et Bcl-Rambo, il active la transcription du gène LacZ et une coloration bleutée apparaît.

Aucune colonie n'a pris la coloration bleue sauf les colonies contenant pGBT9-Mage-d2 et pACT-BclR-31.

Une deuxième transformation a été réalisée de la même façon et le même résultat négatif a été obtenu.

De manière inattendue, la protéine hybride encodée par les plasmides p17.1, p17.2, p17.4, p17.6 n'interagit donc pas avec la protéine Mage-d2.

Plusieurs interprétations de cette observation sont possibles :

- La protéine n'est pas produite dans la levure.
- Les conditions dans la levure font en sorte que la protéine ne puisse pas prendre une conformation correcte.
- La protéine ne peut être localisée dans le noyau.

Pour déterminer si la protéine est produite dans la levure, nous avons réalisé un Western Blot à partir de levures transformées par p17.2. Après lyse des levures, les produits ont été déposés sur gel et révélés avec l'anticorps anti-HA de manière à identifier les protéines de fusion. Une bande était présente à la hauteur attendue, révélant la présence de la protéine Bcl-Rambo dans la levure (Figure II.4).

II.4. Discussion et perspectives

La protéine hybride Bcl-Rambo n'interagit donc pas avec la protéine Mage-d2. Il est possible que sa conformation dans la levure ne lui permette pas d'interagir avec la protéine hybride Mage-d2.

Une autre explication serait que pACT-BclR-31 soit un faux positif et que l'interaction avec le fragment de 31 acides aminés soit artéfactuelle.

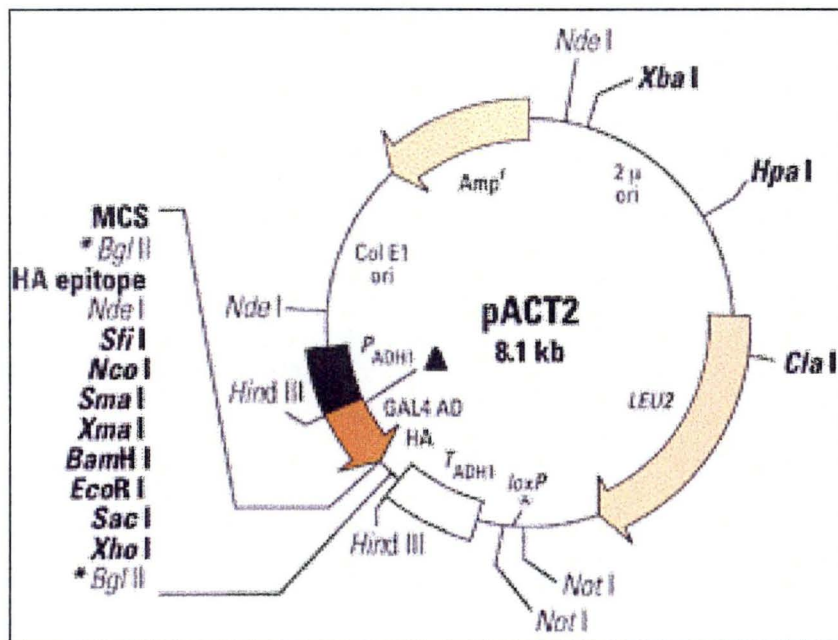


Figure II.3. Carte du plasmide pACT2.

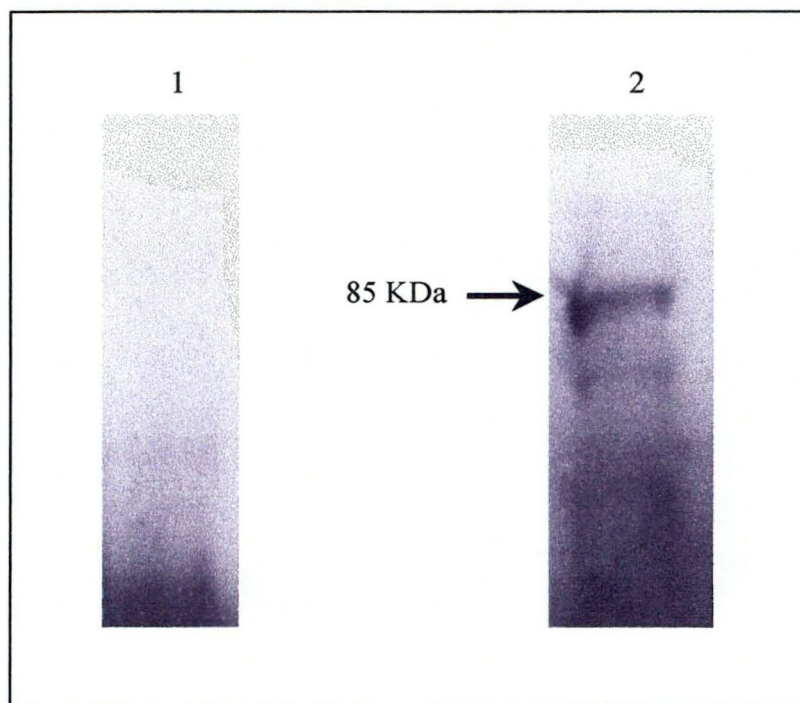


Figure III.4. Analyse en Western blot de l'expression de la proie Bcl-rambo dans la levure Y190.

Le western blot est révélé au moyen d'un anticorps anti-HA. Piste 1: levure contrôle ne contenant pas la proie. Piste 2 : Levure contenant la proie. Une bande de 85 KDa est détectée, ce qui correspond à la taille attendue. En effet, Bcl-Rambo ne migre pas à la hauteur correspondant à son poids moléculaire qui est de 55 KDa. Cette propriété de migration inhabituelle est due à son domaine BHNo. Cette bande, à hauteur de 85 KDa, n'est pas présente dans la levure contrôle et correspond donc probablement à la protéine de fusion GAL4- Bcl-Rambo.

III. Analyse du phénotype de souris knock-out pour le gène *Mage-d2*

III.1. Les souris knock-out *Mage-d2*

Des souris déficientes en *Mage-d2* ont été obtenues par recombinaison homologue en cellules ES (Voir introduction). Dans une première étape, un mutant conditionnel a été obtenu en introduisant deux sites LoxP, un dans l'intron n°2 et un dans l'intron n°12. Ces mutants conditionnels ont été croisés avec des souris BALB/C exprimant la recombinase CRE de manière ubiquiste. Nous avons ainsi obtenu des animaux déficients en *Mage-d2* (pour rappel, *Mage-d2* est localisé sur le chromosome X). Chez ces souris mutantes *Mage-d2*, la quasi totalité de l'ORF a été éliminée. Les animaux homozygotes (notés KOd2) sont viables et fertiles. Cependant, notre attention a été attirée par deux observations. La taille des portées nous semblait petite, avec seulement 4 à 5 nouveau-nés viables, parfois moins ou aucun, alors que l'élevage conditionnel produisait des portées d'une dizaine de souriceaux. Une fraction des animaux de la colonie de souris KOd2 montre une importante alopecie qui affecte les faces ventrale et dorsale du tronc des animaux.

La petite taille des portées pouvait être un indice d'une mortalité embryonnaire ou périnatale. Nous avons donc observé les mères lors de la mise bas et avons constaté une mortalité au premier ou deuxième jour après la naissance. Cette mortalité semblait due à des hémorragies sous-cutanées et intra-abdominales (Figure III.2).

Au cours de ce mémoire, j'ai poursuivi l'étude de ces observations en réalisant les expériences suivantes :

- Analyse des portées homozygotes : taille, sex-ratio, mortalité.
- Analyse des croisements entre femelles hétérozygotes et mâles C57/BL/6: taille, sex-ratio, mortalité.
- Analyse des deux phénotypes: alopecie et hémorragie.
- Recherche de l'origine des hémorragies.

III.2. Analyse des croisements homozygotes et hétérozygotes

Nous avons réalisé les croisements suivants :

1. Femelles homozygotes et mâles hémizygotes.
2. Femelles hétérozygotes et mâles sauvages C57/BL/6.

Nous avons observé la taille des portées, le sex-ratio, ainsi que le taux de mortalité.

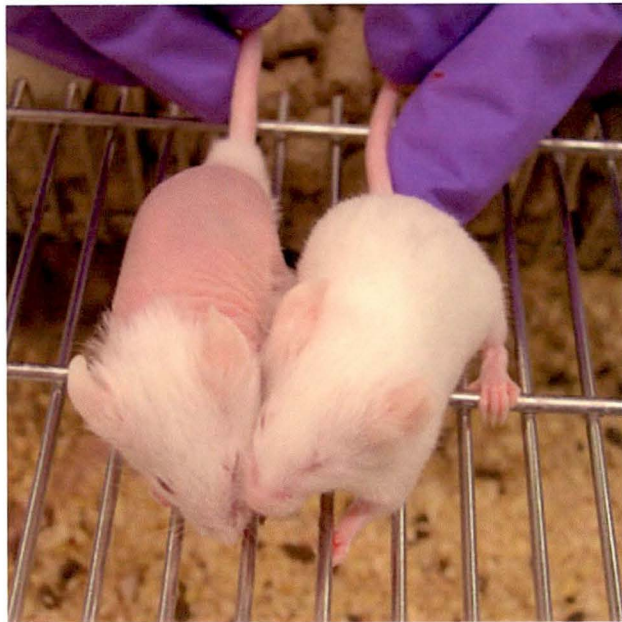


Figure III.1. Souriceaux de trois semaines issus de la même fratrie. Le mâle KO d2 de gauche est alopécique. Le mâle wt de droite ne présente aucun signe d'alopecie.

A



B



Figure III.2. Nouveau-né (P0) KOd2 hémorragique. A, On observe une hémorragie importante au niveau de l'abdomen et du cou. B, Le même animal vu de profil. L'hémorragie au niveau de la face est bien visible.

Le génotype de ces souris a été déterminé par PCR en utilisant deux couples de d'amorces:

- Les amorces 78 et 102 pour amplifier l'allèle muté.
- Les amorces 82 et 96 pour amplifier l'allèle sauvage.

(voir matériel et méthode figures 1 et 3)

III.2.1. Croisements 1 : Femelles hétérozygotes x mâles sauvages B6

Nous avons croisé des femelles hétérozygotes pour la mutation *Mage-d2* avec des mâles C57/BL/6 afin de transférer notre mutation sur un fond génétique homogène. Les souris de notre colonie homozygote ont en effet un fond génétique non homogène 129/ola (cellule ES), BALB/C et CDI (souris transgénique CRE). Or, on sait que le fond génétique peut fortement influencer le phénotype de certaines mutations et aussi la pénétrance. Nous avons choisi le fond génétique C57/BL/6 car les phénotypes y sont souvent plus sévères et le taux de pénétrance plus élevé. Au moment de la rédaction de ce travail, nous avons obtenu la troisième génération dans le backcross C57/BL/6. Nous poursuivons actuellement ces backcross jusqu'à la 5^{ème} génération, ce qui devrait nous permettre d'obtenir des souris dont le génome est à plus de 95% C57/BL/6. Ces backcross sont réalisés en croisant les femelles hétérozygotes avec des mâles C57/BL/6. Les descendants mutés sont à nouveau croisés avec un mâle C57/BL/6, et ainsi de suite. À chaque croisement, une distribution théorique du sexe et du génotype des animaux est attendue. La distribution observée de nos croisements a été comparée à cette distribution théorique. Le tableau III.1 reprend le sexe et le génotype des souriceaux issus des croisements entre des femelles hétérozygotes et des mâles C57/BL/6.

Distribution attendue pour des croisements de femelles hétérozygotes et de mâles sauvages

	X^{KO}	X^{WT}
X^{WT}	$X^{KO} X^{WT}$	$X^{WT} X^{WT}$
Y	$X^{KO} Y$	$X^{WT} Y$

25% femelles hétérozygotes ($X^{KO} X^{WT}$) 25% femelles sauvages ($X^{KO} X^{WT}$) 25% mâles hémizygotes ($X^{KO} Y$) 25% mâles sauvages ($X^{WT} Y$)
--

X^{KO} : Chromosome X porteur de l'allèle nul *Mage-d2*⁰

X^{WT} : Chromosome X sauvage

Y: Chromosome Y

Tableau III.1. Produits de croisements de femelles hétérozygotes avec des mâles sauvages wt (C57/BL/6)

	<u>Naissances</u>	<u>Femelles vivantes</u>		<u>Mâles vivants</u>		<u>Morts¹</u>
		<u>Wt</u>	<u>+/-</u>	<u>Wt</u>	<u>KO</u>	
Portée 1	10	5	1	2	2	0
Portée 2	7	2	2	2	1	0
Portée 3	10	2	6	2	0	0
Portée 4	7	2	2	1	1	1 (mâle KO)
Portée 5	9	1	0	5	3	0
Portée 6	4	2	0	2	0	0
Portée 7	8	2	1	5	0	0
Portée 8	10	1	4	4	1	0
Portée 9	11	5	1	1	2	2 (mâles KO)
Portée 10	6	1	1	2	2	0
Portée 11	9	0	2	5	2	0
TOTAL	91	24	20	31	13	3

1. Cette colonne comptabilise les souriceaux morts.

Distribution observée pour les produits des croisements de femelles hétérozygotes avec des mâles C57/BL/6

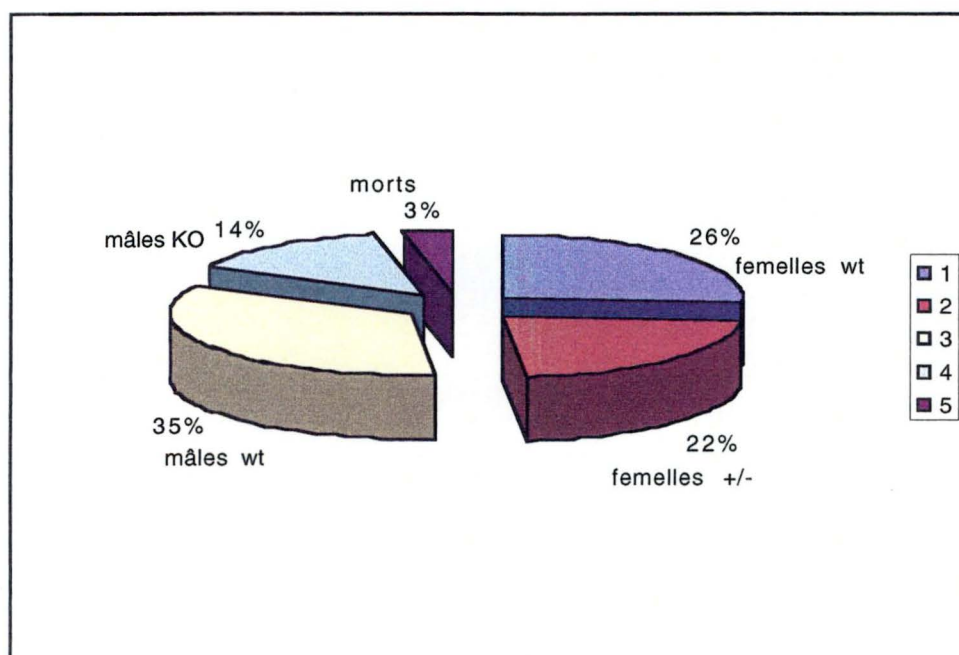


Figure III.1. Statistiques sur les portées issues des croisements entre des femelles hétérozygotes et des mâles C57/BL/6.

En tout, nous avons obtenu 48% de femelles pour 50% de mâles. Le pourcentage de femelles sauvages est de 26% tandis que celui des femelles hétérozygotes est de 22%. Le pourcentage de mâles sauvages est de 35% tandis que celui des mâles mutés vivants est de 15 %. La déficience en mâles mutés est significative (test Chi-carré, $p < 0,05$). Les nouveau-nés retrouvés morts sont toujours des mutants, et souffrent d'hémorragies intra-abdominales et sous-cutanées au niveau de la face et des membres (Figure III.2). L'analyse histologique confirmera la présence de sang au niveau de la cavité péritonéale et de différentes régions sous-cutanées. Ce phénotype sera décrit plus largement au point III.3.3. En conclusion, une fraction significative des animaux KOD2 meurt rapidement après la naissance et peut-être aussi in utero. Cette létalité semble causée par des hémorragies. Il est également probable qu'un certain nombre de morts aient échappé à notre analyse à cause du cannibalisme pratiqué par la mère.

III.2.2. Croisements 2 : Femelles homozygotes x mâles hémizygotes

Nous avons observé la taille de portées issues de croisements homozygotes, ainsi que le sex-ratio et le taux de mortalité.

Distribution attendue pour des croisements de femelles homozygotes et de mâles hémizygotes.

	X^{KO}	X^{KO}
X^{KO}	$X^{KO} X^{KO}$	$X^{KO} X^{KO}$
Y	$X^{KO} Y$	$X^{KO} Y$

50% femelles homozygotes ($X^{KO} X^{KO}$)

50% mâles hémizygotes ($X^{KO} Y$)

X^{KO} : Chromosome X porteur de l'allèle nul *Mage-d2*⁰

X^{WT} : Chromosome X sauvage

Y : Chromosome Y

Tableau III.2. Produits de croisements de femelles homozygotes avec des mâles hémizygotes

	<u>Naissances</u>	<u>Femelles</u>	<u>Mâles</u>	<u>Morts¹</u>
Portée 1	7	3	4	0
Portée 2	3	1	1	1
Portée 3	4	0	0	4
Portée 4	4	3	1	0
Portée 5	6	2	3	1
Portée 6	5	2	2	1
Portée 7	8	1	5	2
Portée 8	4	0	0	4
Portée 9	4	2	2	0
Portée 10	6	0	0	6
Portée 11	3	1	2	0
Portée 12	6	4	2	0
Portée 13	6	2	3	1
Portée 14	9	5	3	1
Portée 15	2	0	0	2
Portée 16	6	0	0	6
Portée 17	5	0	0	5
Portée 18	6	0	0	6
Portée 19	5	2	1	2
Portée 20	5	1	3	1
Portée 21	6	0	4	2
Portée 22	4	2	2	0
Portée 23	6	2	3	1
Portée 24	6	5	1	0
Portée 25	6	2	3	1
Portée 26	4	1	2	1
Portée 27	6	1	4	1
Portée 28	1	0	0	1
Portée 29	4	2	2	0
Portée 30	3	1	2	0
Portée 31	6	1	5	0
Portée 32	4	0	0	4
TOTAL	160	46	60	54

1. Cette colonne comptabilise les souriceaux morts sans qu'on n'ait pu déterminer leur sexe à cause du cannibalisme de leur mère

Distribution observée pour les produits de croisements de femelles homozygotes avec des mâles hémizygotes

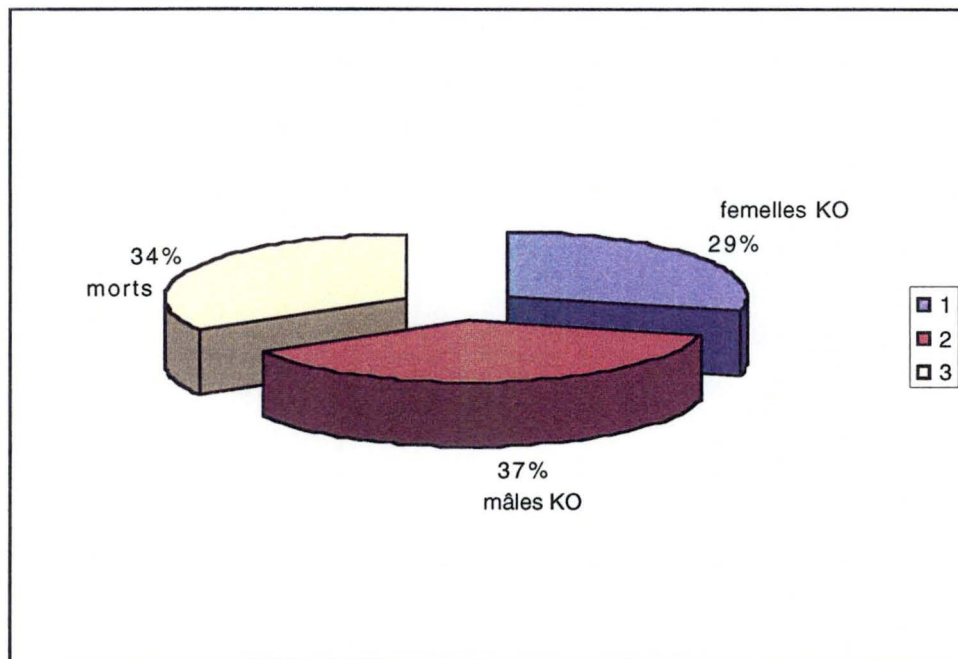


Figure III.2. Statistiques sur les portées issues de croisements entre des femelles homozygotes et des mâles hémizygotes.

Le sex-ratio observé (46% de femelles pour 54% de mâles) ne diffère pas de celui des souris sauvages (1/1). Un minimum de 34 % des nouveau-nés sont morts au premier ou deuxième jour après la naissance. Ce taux est probablement plus élevé si l'on considère qu'une fraction des naissances n'a pas pu être observée en raison du cannibalisme des mères. La mortalité semble due à des hémorragies intra-abdominales et sous-cutanées (voir point III.3.3).

Ce taux de mortalité périnatale est particulièrement élevé par rapport à celui observé dans les élevages sauvages ou conditionnels. En effet, dans les colonies de souris BALB/C ou 129/sv, la mortalité est de l'ordre de 1 à 2 souris sur une portée de 8 à 10 animaux. De plus, nous n'avons jamais observé de phénotype hémorragique dans ces colonies.

III.2.3. Analyse du phénotype des souris knock-out *Mage-d2* chez l'embryon

Il est possible qu'une certaine proportion des mutants *Mage-d2* meure au stade embryonnaire. Afin de tester cette hypothèse, nous avons sacrifié des femelles gestantes à différents stades du développement. Voici nos résultats :

Tableau III.3. Femelles prégnantes K_{Od}2 croisées avec des mâles K_{Od}2 :

	<u>Jours</u>	<u>Nombre d'embryons</u>	<u>Morts</u>
Portée 1	E12	9	0
Portée 2	E13,5	4	0
Portée 6	E14,5	10	4
Portée 4	E15,5	9	4
Portée 3	E16,5	11	4
Portée 7	E18	4	4
Portée 8	E18	4	4
Portée 5	E18,5	11	9
TOTAL		62	29

Nous avons observé une mortalité embryonnaire à partir du 14^{ème} jour du développement embryonnaire (déterminé en fonction du stade de développement des membres). Certains embryons étaient réabsorbés lors de la dissection, et le stade de leur mort n'a pu être déterminé. Parmi les embryons K_{Od}2 morts, beaucoup présentaient des hémorragies intra-abdominales et sous-cutanées au niveau du cou, des yeux, du crâne et des membres (figure III.3). Certains présentaient de l'œdème au niveau du cou et à l'arrière de la colonne vertébrale.

L'œdème observé pourrait être causé par une décompensation cardiaque résultant d'une anémie provoquée par des hémorragies.

III.2.4. Conclusion

Nous avons observé une mortalité périnatale d'au moins 30 % des animaux homozygotes *Mage-d2*. Cette mortalité semble due à des hémorragies diffuses dans la cavité abdominale et dans les tissus sous-cutanés. Nous avons également observé que des embryons en deuxième partie de gestation mouraient d'hémorragie. Nos résultats montrent également que le phénotype n'est pas pénétrant à 100%, puisque seule une partie des animaux mutés meurent. Les animaux (femelles) hétérozygotes ne semblent pas présenter ce phénotype.

III.3. Analyse des phénotypes manifestés par les souris knock-out pour *Mage-d2*

Au cours de ces 6 mois, nous avons fait différentes observations qu'il nous semblait intéressantes d'étudier. Le premier est le phénotype hémorragique décrit plus haut. Nous avons aussi observé des souris alopéciques au niveau du dos et du ventre.

III.3.1. Alopécie

Une perte totale des poils au niveau du dos et du ventre a été observée chez plusieurs souris KOd2 âgées d'environ 21 jours. Les poils commençaient à repousser après environ deux semaines (Figure III.1). Cette alopécie sporadique dans notre colonie peut a priori avoir une cause génétique, être due à des facteurs environnementaux (ectoparasites), ou encore être causée par une combinaison de ces deux types de facteur. À l'intérieur de la colonie, l'alopécie semblait être transmise des parents à leur descendance, ce qui est en faveur d'une cause génétique. Cette cause génétique pourrait être la déficience en *Mage-d2* (associée à un fond génétique particulier), ou être sans rapport avec cette déficience. Dans ce dernier cas, un allèle de susceptibilité à l'alopécie pourrait être présent dans notre colonie. Pour trancher entre ces différentes possibilités, nous avons croisé des mâles alopéciques avec des femelles hétérozygotes afin d'obtenir, dans la même portée, des frères mutés et sauvages. Au moment de la rédaction de ce travail sur 11 souris issues de ces croisements, les 3 souris qui ont montré le phénotype alopécique étaient toutes les 3 KOd2. Aucun des 8 animaux frères normaux ou hétérozygotes n'a montré d'alopécie. Il existe cependant dans notre animalerie deux cas de souris issues d'un autre élevage qui ont présenté un phénotype similaire. Bien que nos résultats actuels ne permettent pas d'exclure que l'alopécie soit liée à une mutation dans le gène *Mage-d2*, nous restons très prudents et poursuivons nos croisements.

III.3.2. Hémorragies

Nous avons observé qu'au moins 30 % des nouveau-nés déficients en *Mage-d2* meurent le premier ou le deuxième jour après la naissance. Ils souffrent d'hémorragies intra-abdominale et sous-cutanées au niveau du crâne, de la face et des membres (Figure III.2, III.4 et III.5). Nous avons observé la présence de lait dans l'estomac de ces nouveau-nés, indiquant qu'ils étaient capables de téter et de respirer. Dans une première étape, nous avons réalisé une étude histologique des animaux hémorragiques, à la recherche de problèmes vasculaires.

III.3.2.1. Etude histologique

En collaboration avec le département d'histologie et le professeur M. Herin, nous avons examiné des coupes d'animaux hémorragiques.

En microscopie optique, l'analyse des coupes n'a rien révélé de particulier : les globules rouges ont une morphologie normale et les gros vaisseaux, comme l'aorte, semblent normaux (Figure III.6).

Les hémorragies peuvent résulter soit d'un problème vasculaire (perméabilité, intégrité) soit d'un problème de coagulation (anomalie des plaquettes ou défaut dans la cascade de coagulation). Nous avons abordé ce problème en précisant le profil d'expression de *Mage-d2* et en déterminant le nombre de plaquettes.

A



Figure III.3. A, embryons E14 KOd2 normaux (7A, 7B, 8C) et hémorragiques (8A et 8B). Les sites d'hémorragie sont indiqués par une flèche. Le placenta de l'embryon 7B est également hémorragique. B, deux embryons E18 KOd2 : l'embryon de gauche présente des hémorragies au niveau du crâne et de l'abdomen. On remarque aussi, par comparaison avec l'individu non affecté de droite, la présence d'œdème au niveau du cou et du dos.

B

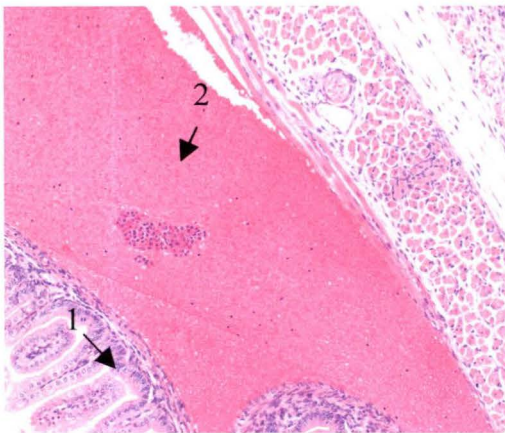


Figure III.4. Hémopéritoine chez une souris KOd2 (stade P0). 1. Intestin; 2. Cavité péritonéale gorgée de sang. Coloration HES(G 400x).

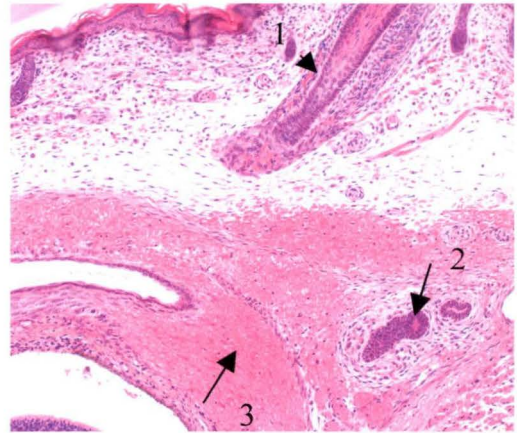


Figure III.5. Hémorragie sous-cutanée chez une souris nouveau-né KOd2 . 1. Follicule pileux, 2. Veinule post-capillaire, 3. Hypoderme gorgée de sang. Coloration HES (G 400x).

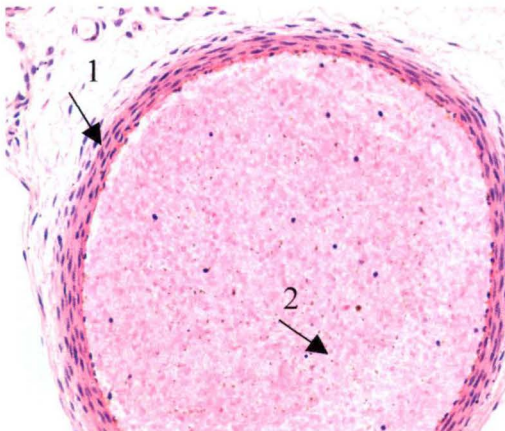


Figure III.6. Coupe au niveau de l'aorte de souris KOd2 P0, coloration HES (G 400x). Aucune anomalie n'est visible. 1. Épithélium, 2. Lumière.

III.3.2.2. Numération plaquettaire et mesure de l'hématocrite

si les hémorragies observées chez les nouveau-nés sont provoquées par une thrombocytopénie, il se pourrait que les animaux survivants aient eux aussi un taux de plaquettes anormalement bas. En effet, il existe un seuil critique du taux plaquettaire en-dessous duquel on observe des problèmes de coagulation. Des animaux avec un taux faible de plaquettes, mais au-dessus de ce seuil, seront en bonne santé.

En collaboration avec M. Coutelier (Médecine expérimentale, UCL), nous avons déterminé la numération des plaquettes de 22 souris dont 14 mâles hémizygotés, 3 femelles hétérozygotes et 5 animaux sauvages. Les souris analysées étaient des adultes en bonne santé.

Tableau III.4. Numération plaquettaire

Fratrie	Génotype	Nombre de plaquettes x 10⁷ / ml
Portée 1	Hémizygoté	105
	Hémizygoté	117,5
	Wt	87,5
	Wt	117,5
Portée 2	Hémizygoté	132,5
	Hémizygoté	122,5
	Wt	105
	Hémizygoté	90
Portée 3	Hétérozygote	92,5
	Hémizygoté	87,5
	Hétérozygote	115
	Hétérozygote	102,5
	Hémizygoté	115
Portée 4	Hémizygoté	135
	Hémizygoté	100
	Hémizygoté	92,5
Portée 5	Hémizygoté	130
Portée 6	Hémizygoté	112,5
	Wt	145
Portée 7	Hémizygoté	115
	Hémizygoté	105
	Wt	130

Le taux de plaquettes varie de 800 à 2500 millions / ml chez des souris sauvages. Aucune différence n'a été observée entre le nombre de plaquettes des animaux mutés et celui des animaux sauvages.

Nous n'avons rien observé chez nos souris. Une numération plaquettaire va être réalisée sur des nouveau-nés hémorragiques et normaux afin d'évaluer le nombre de plaquettes de ces animaux. Nous avons également pris contact avec le Docteur Hermans, directeur de l'unité d'hématologie et thrombose aux Cliniques Saint-Luc,

pour réaliser une analyse plus poussée des composants sanguins (plaquettes, GB, GR, facteurs de coagulation,...) et réaliser des tests fonctionnels de coagulation.

III.3.2.3. Profil d'expression du gène *Mage-d2*

Si les hémorragies sont dues à un problème vasculaire, on s'attend à ce que *Mage-d2* soit exprimé dans les vaisseaux sanguins. Des hybridations in situ réalisées par M. Bertrand au laboratoire (voir introduction) montrent clairement la présence de *Mage-d2* au niveau des vaisseaux ombilicaux et de l'aorte. Nous disposons au laboratoire d'un anticorps spécifique de la protéine *Mage-d2* humaine. Nous avons essayé sans succès d'utiliser cet anticorps en immunohistochimie sur des coupes d'embryons de souris. Nous avons cependant pu réaliser des analyses en Western Blot à l'aide de cet anticorps. Nous avons ainsi étudié l'expression de *Mage-d2* dans les tissus murins suivants : foie embryonnaire (E14), tête embryonnaire (E14), corps embryonnaire (E14), le placenta ainsi que dans des gros vaisseaux (de rat). Nous avons prélevé les tissus murins sur des souris 129/sv et sur de souris KOD2 qui n'expriment pas la protéine et servent de contrôle négatif. Nous avons également testé des extraits de cellules HUVEC-C (reçues de C. Michiels, URBC). Ces cellules sont des cellules endothéliales dérivées de veines de cordon humain.

La présence de protéine dans nos extraits a été confirmée en utilisant un anticorps contrôle anti- β -actine sur les mêmes membranes. L'actine est une protéine présente en forte quantité dans tous les tissus.

Le corps E14, la tête E14, les cellules endothéliales et le placenta expriment la protéine *Mage-d2*. Par contre, le foie E14 et l'aorte du rat sont négatifs (Figure III.7).

Nos résultats indiquent que *Mage-d2* n'est pas exprimé par le foie embryonnaire, qui est l'organe de l'hématopoïèse chez l'embryon. Par contre, *Mage-d2* est exprimé par des organes riches en vaisseaux comme le placenta. Des cellules endothéliales en culture expriment *Mage-d2*. Si l'expression de la protéine *Mage-d2* est limitée à l'endothélium, on peut imaginer que l'absence de signal dans l'aorte de rat puisse être due à la faible proportion de cellules endothéliales par rapport aux autres types cellulaires présents dans notre échantillon. Une autre explication pour expliquer les résultats différents observés en hybridation in situ et en Western au niveau de l'aorte serait que les résultats d'hybridation in situ ont été obtenus sur des vaisseaux embryonnaires alors que l'échantillon analysé en Western provenait d'un adulte.

III.4. Discussion et perspectives

Nous avons observé un mortalité périnatale (d'au moins 30% des animaux) probablement due à des hémorragies chez les animaux déficients en *Mage-d2*. La cause de l'alopécie observée sporadiquement chez ces animaux reste obscure. Des croisements sont poursuivis pour déterminer le lien entre l'alopécie et la mutation *Mage-d2*.

Le phénotype hémorragique est clairement lié à la mutation de *Mage-d2*. Il est important de déterminer s'il est causé par un problème dans la cascade de coagulation ou par un problème vasculaire.

Certains éléments sont plutôt en faveur d'un problème vasculaire :

- L'expression de *Mage-d2* dans les cellules endothéliales.

- La non-expression de *Mage-d2* dans le foie embryonnaire, siège de l'hématopoïèse chez l'embryon.
- La numération plaquettaire semble normale chez les animaux mutés.

Une donnée de la littérature est également en faveur d'un phénotype vasculaire. En effet, les souris déficientes en p75NTR présentent un phénotype vasculaire. [28]. Quarante pour cent des embryons déficients en p75NTR meurent avant terme et montrent un amincissement important de la paroi des gros vaisseaux. Ces anomalies indiquent un rôle de p75NTR dans la formation des vaisseaux sanguins. Il a été montré que *Mage-d1*, *Necdin* et *Mage-l2* interagissent avec p75NTR via leur domaine *Mage* et que cette interaction induit l'apoptose. Il serait intéressant de tester si *Mage-d2* est aussi un partenaire de p75NTR.

La caractérisation du phénotype des souris knock-out pour *Mage-d2* sera poursuivie de la manière suivante :

- Poursuivre les backcross dans C57/BL/6 afin de purifier le fond génétique, ce qui pourrait augmenter la pénétrance du phénotype hémorragique et éventuellement démasquer d'autres phénotypes.
- Analyser par microscopie électronique les capillaires sanguins.
- Déterminer le nombre de plaquettes chez les nouveau-nés hémorragiques.
- Déterminer le temps de coagulation et réaliser un bilan complet des facteurs de coagulation.
- Caractériser le profil d'expression de *Mage-d2* par western blot. Entre autres, déterminer s'il est exprimé dans les cellules musculaires lisses.
- Réalisation de tests d'étanchéité des vaisseaux et capillaires sanguins après injection de dextran associé à une molécule fluorescente.
- Différencier in vitro des cellules ES normales et KOd2 en cellules musculaires lisses et endothéliales, et observer si la différenciation se produit normalement.
- Produire des anticorps utilisables en immunohistoChimie pour préciser le profil d'expression.
- Poursuivre le double hybride pour trouver des partenaires qui nous aiderons à comprendre le rôle de *Mage-d2*.
- Tester par double hybride l'interaction entre p75NTR et *Mage-d2*. Tester par cette méthode, l'interaction de *Mage-d2* avec d'autres gènes impliqués dans la formation des vaisseaux comme Tie, VEGF_R et neuropilin qui sont des récepteurs tyrosine kinase ou co-récepteurs comme p75NTR[29, 30]. Les souris déficientes en ces gènes présentent des phénotypes semblables à celui des souris KOd2 (mort embryonnaire, hémorragies au niveau de la face, du dos,...).

Le travail réalisé au cours de cette année a clairement mis en évidence un phénotype hémorragique chez les souris déficientes en *Mage-d2*. Bien que nos résultats soient préliminaires, ils ouvrent la voie à de nombreuses expériences qui devraient rapidement nous permettre d'élucider le rôle de *Mage-d2*.

***MATERIEL ET
METHODES***

I. Génotypage des souris KO par PCR

I.1. Extraction d'ADN des queues de souris

Prélever des fragments de queues d'une longueur d'environ 1 cm.

Incuber les bouts de queues à 50°C ON, dans 150 µl de solution de lyse.

Ajouter 1 volume de Phénol-CIAA (50/50). Vortexer. Centrifuger 10' à 10000xg.

Diluer 10 µl du surnageant dans 90 µl d'eau stérile. Utiliser 1 µl par PCR de 25 µl.

I.2. PCR

25 µl: DNA	1 µl
Oligo 1(10mM)	2,5 µl
Oligo 2(10mM)	2,5 µl
dNTP (2mM)	2,5 µl
Tampon 10x _{biotools}	2,5 µl
Taq polymérase _{biotools}	0,625 µl
H ₂ O	13,375 µl

Cycle: 3' à 94°C	} 30x
1' à 94°C	
1' à 57°C	
1' à 72°C	

Matériel:

Solution de lyse: Tris 100mM; EDTA 1 mM; NaCl 100mM; SDS 1%; Protéinase K 100 µg/ml.

Taq polymérase et tampon 10x = Biotools.

Pour souris KO B1B2: -Oligo CATs=5'-CT-GAT-GAA-TGC-TCA-TCC-G-3'

-Oligo CATas=5'-AGT-TGT-CCA-TAT-TGG-CCA-CG-3'

Ces deux oligos sont dans le gène rapporteur CAT. (PCR illustrée à la figure 3)

Pour souris KO D2: - Oligo 102=5'-TTT-CTG-AGA-GTG-CAC-CCT-GG-3'

- Oligo 78=5'-TTG-AGA-CAT-GTC-TGA-CAC-AAG-C-3'

et - Oligo 82=5'-TTC-TTT-GAT-GAT-GTC-CTT-CAG-C-3'

- Oligo 96=5'-CTT-GGT-GAA-GTA-CCT-GTT-GGC-3' (illustré dans les figures 1

et 2)

Pour la détermination du sexe: - Oligo Zfy11:5'-GTA-GGA-AGA-ATC-TTT-CTC-ATG-CTG-G-3'

- Oligo Zfy12:5'-CTT-TTG-AGT-GCT-GAC-GGG-TGA-CGG-3'

Zfy est un gène localisé sur le chromosome Y. (PCR illustrée à la figure 3).

La figure 2 illustre un exemple de génotypage de souris KOd2.

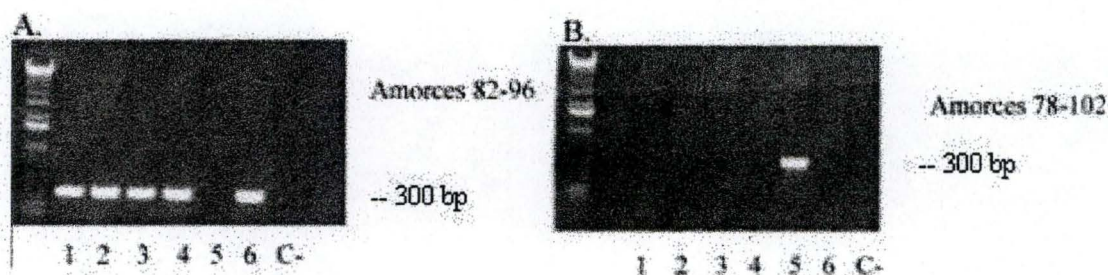


Figure 2. PCR sur de l'ADN de souris mâles issues du croisement femelle +/- x mâle wt. A, gel d'agarose 1 % avec le marqueur de poids moléculaire 1 Kb (Invitrogen) à l'extrémité gauche. Les amorces 82-96 amplifient le gène *Mage-d2* sur l'allèle wt. Les souris 1, 2, 3, 4 et 6 ont l'allèle wt dans leur génome. Le contrôle H₂O est négatif. B, gel d'agarose 1 % avec le marqueur de poids moléculaire 1 Kb (Invitrogen) à l'extrémité gauche. Les amorces 78-102 amplifient un fragment d'ADN de 300 bp correspondant à l'allèle muté. La souris 5 a la mutation. Le contrôle H₂O est négatif. Les mâles 1, 2, 3, 4 et 6 sont wt. Le mâle 5 est KOd2.

La figure 3 illustre le génotypage des souris KOb1b2 et la détermination de leur sexe.

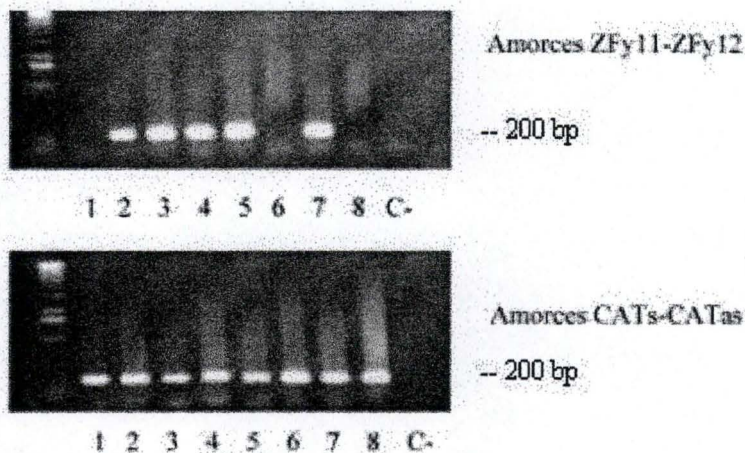


Figure 3. PCR sur de l'ADN d'embryons issus de croisement femelle +/- x mâle wt. A, détermination du sexe par amplification d'un gène spécifique du chromosome Y. Le marqueur de poids moléculaire de 1 Kb (Invitrogen) se trouve à l'extrémité gauche. Le gène Zfy est amplifié chez les embryons 2, 3, 4, 5 et 7. Le contrôle H₂O est négatif. B, détection de la mutation b2 par amplification du gène CAT. Le marqueur de poids moléculaire de 1 Kb (Invitrogen) se trouve à l'extrémité gauche. Le gène CAT est amplifié dans les pistes 1 à 8. Le contrôle H₂O est négatif. Les embryons 2, 3, 4, 5 et 7 sont des mâles KOb1b2. Les embryons 1,6 et 8 sont des femelles +/- b1b2.

II. Western Blot

II.1. Echantillons

Disséquer les organes sur glace. Peser et homogénéiser avec un dounce dans 10 volumes de RIPA + inhibiteur de protéases 50x. Centrifuger 5' à 10000xg à 4°C. Congeler les lysats obtenus à -70°C.

Utiliser 20 µl de lysat par piste. Dénaturer l'échantillon et un volume équivalent de bleu-DTT pendant 5' à 100°C et charger les 40 µl sur le gel d'acrylamide SDS-Page8 % (15 cm/15 cm). Faire migrer 3 heures à 100 Volts.

II.2. Transfert

Laisser le gel entre les 2 plaques de verre.

Tremper la membrane PVDF (Hybond-C de Amersham LIFE SCIENCE) dans du méthanol pendant 1'.

La rincer plusieurs fois dans l'eau puis dans la solution "Anode I".

Venir la mettre sur le gel qui se trouve sur la plaque de verre.

Tremper 3 papiers Wathman dans la solution "Anode I". Les mettre sur la membrane.

Passer une pipette sur le montage pour retirer l'excès de solution ainsi que les bulles.

Tremper 3 papiers Wathman dans la solution "Anode II". Les mettre sur le montage.

Passer une pipette sur le montage pour retirer l'excès de solution ainsi que les bulles.

Retourner le montage et tremper 3 papiers Wathman dans la solution "Cathode". Les mettre sur le gel.

Passer une pipette sur le montage pour retirer l'excès de solution ainsi que les bulles.

Venir mettre le montage avec les papiers "Cathode" vers le haut dans l'appareil. La cathode de l'appareil se trouvant sur le couvercle.
Fermer le tout et brancher l'appareil sur 225mA pendant 1h30 (pour papiers Wathman 15 cm/15 cm).

II.3. Western Blot

Incuber la membrane dans 25 ml de solution de blocage pendant une heure à RT.
Laver 3 fois 5' avec 15 ml de TBST.
Incuber la membrane dans 15 ml de solution de blocage avec l'anticorps primaire.
Incuber ON à 4°C avec agitation.
Laver 3 fois 5' avec 15 ml de TBST.
Incuber la membrane dans la solution de blocage avec l'anticorps secondaire. Incuber pendant une heure à RT avec agitation.
Laver 3 fois 5' avec 15 ml de TBST. Laver 1 fois 10' avec 15 ml de TBS.
Incuber la membrane dans 8 ml de substrat chemiluminescent en agitant pendant 1' à RT
Exposer pendant 30' puis révéler. Si nécessaire, exposer plus longtemps.

II.4. Stripping des membranes

Laver 4 fois 5' au PBST.
Incuber 30' à 50°C dans la solution "stripping buffer".
Laver 6 fois 5' au PBST.

Matériel:

RIPA: 50mM Tris pH8; 150 mM NaCl; 0,5% Na Deoxychlorate; 0,1% SDS; 1% NP40.
Protéase inhibitor cocktail tablets: CompleteTMMini (Roche). 1 pastille à dissoudre dans 1,5 ml d'eau stérile.
Gel de résolution 8% (pour 20 ml): 9,3 ml H₂O; 5,3 ml 30% acrylamid mix (duracryl); 5,0 ml 1,5M Tris (pH 8,8); 0,2 ml 10% SDS; 0,2 ml 10% ammonium persulfate; 0,024 ml TEMED.
Gel de tassement (5ml): 3,4 ml H₂O; 0,83 ml 30% acrylamid mix; 0,63 ml 1,0M Tris (pH 8,8); 0,05 ml 10% SDS; 0,05 ml 10% ammonium persulfate; 0,010 ml TEMED.
Bleu-DTT: 800 µl de bleu (100mM Tris HCl pH6,8; 4% SDS; 0,2% Bromophénol blue; 20% glycérol) + 200 µl de DTT.
Anode I: 30mM Tris Base (3,63 g/l); 10% méthanol.
Anode II: 300mM Tris Base (36,3 g/l); 10% méthanol.
Cathode: 25mM Tris Base (3,03 g/l); 40mM Aminohehexane acid (5,25 g/l); 10% méthanol; 0,01% SDS.
Solution de blocage: 4% de lait en poudre dans du TBST.
AC primaire: AC anti-MAGE-D2/NRAGE-Like 2b de lapin (#07-297 Upstate) 1/1500 dans solution de blocage ou AC monoclonal anti-β-actin (A 5316 Sigma) 1/1000 dans solution de blocage.
AC secondaire: HRP-AC anti-lapin de chèvre 1/5000 dans solution de blocage ou HRP-AC anti souris de lapin 1/2000 dans solution de blocage.
TBS: pour 1L 10X TBS: 24,2 g Tris base; 80 g NaCl; ajuster à pH 7,6 avec de HCl
TBST: 1X TBS, Tween 20 (Sigma) 1/1000.
Substrat chemoluminescent: SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate(PIERCE).
PBST: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,4 mM KH₂PO₄ pH 7,3; Tween 20 (Sigma) 1/1000.
Stripping Buffer: 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 100 mM 2-mercaptoéthanol.

III. Double-hybride: Vérification de l'interaction entre la protéine Mage-d2 et Bcl-Rambo par "double hybride" chez la levure

III.1. Construction de Bcl-rambo

Nous avons inséré, lors de l'amplification par PCR du cDNA de cerveau E14, les sites de restriction BamHI (côté 5') et XhoI (côté 3') ce qui permet un clonage directionnel.

III.1.1. PCR sur du cDNA de cerveau embryonnaire de souris

Nous avons isolé le cDNA codant pour l'ORF complète de Bcl-Rambo à partir de cerveau d'embryon E14.

50 µl: DNA(100ng)	5 µl	Cycle: 3' à 94°C 30" à 94°C 30" à 68°C 30" à 68°C 10' à 68°C	-30x
Amorce1(10mM)	5 µl		
Amorce2(10mM)	5 µl		
Tampon 2	5 µl		
High fidelity(Roche)	1 µl		
dNTP(2mM)	5 µl		
H ₂ O	24 µl		

Amorce1: Rambo 1S
Amorce2: Rambo 2AS

III.1.2. Clonage dans PCRII

Protocole et solutions du TOPO TA Cloning Kit de chez Invitrogen.

Incuber 4 µl (min. 10 ng) du produit PCR, 1 µl de solution salée diluée, 1 µl de TOPO vecteur (PCRII:25 ng/µl) à RT pendant 30'. Placer les tubes sur glace.

Dégeler les One shot *E.Coli* sur glace. Ajouter 2 µl de réaction pour un tube de *E.Coli* et incuber 30' sur glace. Incuber 30" à 42°C sans agiter.

Ajouter 250 µl de "SOC medium" aux cellules à RT. Incuber les tubes pendant 1h à 37°C avec agitation.

Étaler 10 à 50 µl sur boîte LBA+Xgal (50 µg/ml). Incuber ON à 37°C.

III.1.3. Identification des clones d'intérêt par PCR

Reprendre 24 colonies, chacune dans 50 µl d'eau stérile.

On utilise T7 et Sp6, amorces bordant le site de clonage et permettant d'amplifier l'insert.

20µl: DNA	2 µl	Cycle: 3' à 94°C 30" à 94°C 30" à 57°C 40" à 72°C 10' à 72°C	- 30x
Sp6(10mM)	2 µl		
T7(10mM)	2 µl		
Taq polymérase	0,4 µl		
dNTP(2mM)	2 µl		
H ₂ O	9,6 µl		

Culture bactérienne dans du milieu LBA ON.

III.1.4. Miniprep d'ADN plasmidique

Centrifuger 10', à 2000 rpm, 5 ml de culture, décanter.

Reprendre les cellules dans - 300µl de GTE, vortexer, laisser 5' à RT.

- 450 µl NaOH/SDS, laisser 5' dans la glace.

- 360 µl KAc/HAc, mélanger.

Centrifuger 5', à 14000 rpm., reprendre le surnageant.
 Ajouter 2 volumes de Phénol-CIAA (50/50), centrifuger, reprendre la phase aqueuse.
 Ajouter 2 volumes EtOH. Incuber 5' à RT.
 Centrifuger 10', à 14000 rpm., décanter, rincer le culot avec de l'EtOH 70%.
 Centrifuger 10' à 14000 rpm.
 Sécher le culot sous vide. Resuspendre le culot dans 50 µl de TE.

III.1.5. Séquençage

Les réactions de séquençage sont réalisées sur un séquenceur automatique ABI par le département de neurobiologie.

DNA(100ng/µl)	2 µl
Amorce(10 mM)	1 µl
H ₂ O	9 µl

Amorces: T7, sp6, Rambo 1S, Rambo 4AS,
 Rambo3S, Rambo 7AS.

III.2. Insertion de Bcl-Rambo dans pACT2

III.2.1. Digestion de Bcl-Rambo et de pACT2

Les inserts sont extraits de PCRII au moyen des enzymes de restriction BamHI et XhoI et clonés dans les sites correspondants de pACT2.

	<u>pACT2</u> <u>(1µg/µl)</u>	<u>Insert</u> <u>(60 ng/µl)</u>
DNA	5 µl	42,5 µl
Tampon 2	5 µl	5 µl
BSA	0,5 µl	0,5 µl
BamHI (20U/ul)	1 µl	1 µl
XhoI (10U/ul)	1 µl	1 µl
H₂O	37,5 µl	0 µl

Incuber à 37°C pendant 4 heures.

III.2.2. Purification de l'ADN de l'insert et du vecteur

Protocole et solutions du kit "Wizard SV Gel and PCR Clean-Up system" de chez Promega:

Déposer la réaction de digestion sur un gel d'agarose, faire migrer et découper, à l'aide d'un scalpel, la bande d'ADN d'intérêt.

Incuber le fragment de gel dans 1 volume de Membrane Binding Solution pendant 10' à 55°C jusqu'à dissolution. Transférer sur une minicolonne SV placée sur un épendorf et incuber 1' à RT. Centrifuger la SV minicolonne 1' à 14000rpm. Décanter. Laver la colonne avec 700 µl de Membrane Wash Solution (diluée auparavant dans 95% éthanol). Centrifuger 1' à 14000 rpm. Décanter. Ajouter 500 µl de membrane Wash Solution et centrifuger 5' à 14000 rpm. Décanter et centrifuger 1' à 14000 rpm. Eluer l'ADN dans 50 µl de Nuclease-Free Water.

III.2.3. Ligation

	<u>PACT2+ Bcl- Rambo</u>	<u>PACT2</u> (contrôle -)
Vecteur (100ng/μl)	1 μl	1 μl
Insert (50ng/μl)	7 μl	0 μl
Tampon	1 μl	1 μl
T4 Ligase (400U/μl)	1 μl	1 μl
H₂O	0 μl	7 μl

Incuber à 14°C ON.

III.2.4. Electroporation

Les produits de ligation sont électroporés dans DH5α et étalés sur milieu LBA.

Rem: électroporateur: capacitance=25 μF; voltage=2,3 kV; résistance=200 Ohm.

III.2.5. Identification des clones recombinants par PCR

Prendre 24 colonies, chacune dans 50 μl d'eau.

DNA	2 μl	Cycle: 3' à 95°C 40" à 95°C 40" à 57°C 40" à 72°C	 --30x
Tampon 10x	2 μl		
dNTP(2mM)	2 μl		
Amorce1(10mM)	2 μl		
Amorce2(10mM)	2 μl		
Taq Polymérase	0,4 μl		
H ₂ O	9,6 μl		

Amorces: pACT2 3' bis,

Rambo6S

III.2.8. Séquençage

Les clones positifs ont été séquencés afin de vérifier que la phase de lecture entre Bcl-Rambo et Gal4 est conservée

DNA(50 ng/μl)	4 μl
Amorce	1 μl
H ₂ O	7 μl

Amorces: pACT2 3' bis, pACT2 5'

III.3. Transformation dans la levure

(Yeast protocol handbook, CLONTECH)

Inoculer une préculture: dans 5 ml de YPD, prendre quelques colonies de Y190 de 2-3 mm de diamètre. Vortexer 5'. Transférer dans falcon avec 50 ml de YPD. Incuber à 30°C pendant 16-18 heures.

Transférer 30 ml de la préculture dans 300 ml de YPD (la DO doit être de 0,2 - 0,3). Incuber jusqu'à une DO de 0,4 - 0,6. Diviser les 300 ml de culture dans des falcon de 50ml et centrifuger à 21°C 5' à 1000xg. Décanter et resuspendre chaque culot dans 5 ml d'eau stérile. Rassembler le tout dans un seul falcon. Centrifuger à 21°C 5' à 1000xg. Décanter. Resuspendre dans 1,5 ml de TE 1x+ LiAc 1x + H₂O (solution préparée extemporanément).

Dans un épendorf, mettre 1 µg d'ADN plasmidique, 50 µl d'ADN carrier dénaturé 2µg/µl, 0,1 ml de levure. Vortexer.

Ajouter 0,6 ml de PEG/LiAc (1ml de TE 1x, 1 ml de LiAc 1x, 8 ml de PEG). Vortexer 10".

Agiter à 30°C pendant 30'. Ajouter 70 µl de DMSO. Mélanger doucement.

Incuber dans un bain 15' à 42°C (choc thermique). Mettre sur glace 1 à 2'. Centrifuger à RT 5". Décanter.

Resuspendre dans 1ml de TE 1x pour les transfections simples et dans 0,5 ml de TE 1x pour les doubles transfections.

Étaler 200 µl sur milieux sélectifs (Leu- pour les proies seules; Trp- pour l'appât seul; Leu-Trp- pour la double transformation). Incuber à 30°C pendant 2 à 4 jours.

III.4. Repiquage de colonies de levures

Repiquer les colonies et incuber dans 100 µl de milieu sélectif ON à 30°C.

Réaliser deux répliques sur milieu solide sélectif. Incuber à 30°C pendant 2 jours.

Utiliser une des réplique pour la coloration β-gal et conserver l'autre.

III.5. Détection de l'activité β-galactosidase

Solution pour coloration X-gal: 5 ml agarose 1%, 5 ml de NaPO₄ pH 7 0,5 M, 0,6 ml de DMF, 0,1 ml de SDS 10%, 0,1 ml X-gal 4%.

Préchauffer bain marie à 50°C.

Préparer l'agarose (1%). Préchauffer le Na-PO₄ et refroidir l'agarose.

Mélanger et ajouter le SDS, le DMF, la solution X-gal.

Mélanger et verser 10 ml sur boîte. Attendre 5' à RT et incuber à 30°C.

Matériel:

Rambo1S=5'-CGG-GAT-CCC-GTC-TAC-GAC-TGC-GTC-TCT-AG-3'

Rambo2AS=5'-CCG-CTC-GAG-CGG-CAG-CTA-AAG-CCG-TAG-GTC-T-3'

Rambo3S=5'-CGG-GAT-CCC-GAA-GAG-CTT-AGA-CAG-CAG-C-3'

Rambo4AS=5'-CCG-CTC-GAG-CGG-TTA-AAC-AGC-CAC-TGC-CAG-GAT-3'

Rambo5S=5'-CGG-GAT-CCC-GAT-CCT-GGC-AGT-GGC-TGT-T-3'

Rambo6S=5'-AAC-TCG-TCC-AAC-TCT-GAC-ATC-3'

Rambo7AS=5'-CCA-GTG-TGG-CTC-TTT-TTC-CTG-3'

Rambo8S=5'-ATG-CCA-GCG-GAT-GGA-ATA-AGC-3'

Sp6=5'-GAT-TTA-GGT-GAC-ACT-ATA-3'

T7=5'-TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GG-3'

BGHAS=5'-TAG-AAG-GCA-CAG-TCG-AGG-3'

PACT23^{bis}=5'-GAA-ATT-GAG-ATG-GTG-CAC-GAT-GC-3'

PACT25^{bis}=5'-CTA-TTC-GAT-GAT-GAA-GAT-ACC-CCA-3'

Milieu LB= Broth lennox (DIFCO)

Milieu LBA= Milieu LB + ampiciline

X-gal= 25 mg dans 1,25 ml de diméthylformamide (=250 mM)

GTE=50 mM glucose; 25 mM Tris-HCl pH8; 10 mM EDTA

NaOH/SDS= 0,2 N NaOH; 1% SDS

KAc/HAc=12 ml KAc 5M; 2,3 ml HAc; 5,7 ml H₂O

TE= Tris 10mM; EDTA 1mM

YPD=20 g/L Bacto peptone; 10 g/L Yeast extract; 20 g/L glucose (+20g/L agar pour les boîtes)

DNA carrier= Haring Testis Carrier DNA 10mg/ml (Clontech)

LiAc= 1M

PEG= 50% PEG 3350

DMSO= Diméthyl sulfoxide

DO 16,6x(-TRP-LEU-HIS-ADE)1L=500 mg Iso-leucine; 2500 mg L-Valine; 333,33 mg L-Arginine; 500

mg L-Lysine; 333,33 mg L-Méthionine; 833,33 mg L-Phénylalanine; 3333,33 mg L-Thréonine; 500 mg

L-Tyrosine; 333,33 mg L-Uracile.

Milieu -LEU(1L)=6,7 g yeast nitrogen base without AA; 60 ml DO 16,6x; 10 ml ADE 100x, 10 ml HIS 100x; 10 ml TRP 100x; 20 g glucose. Ajuster avec H₂O. (+ 20 g agar pour les boîtes)
Milieu-TRP=6,7 g yeast nitrogen base without AA; 60 ml DO 16,6x; 10 ml ADE 100x, 10 ml HIS 100x; 10 ml LEU 100x; 20 g glucose. Ajuster avec H₂O. (+ 20 g agar pour les boîtes)
Milieu -TRP-LEU=6,7 g yeast nitrogen base without AA; 60 ml DO 16,6x; 10 ml ADE 100x, 10 ml HIS 100x; 20 g glucose. Ajuster avec H₂O. (+ 20 g agar pour les boîtes)
SOC médium= tryptone 10g; Yeast extract 2,5g; NaCl 0,3g; KCl 0,93g; MgSO₄ 1,01g, MgCl₂ 1,23g; glucose 2g; Eau distillée 495ml.
CIAA=Chloroforma stabilisé à l'alcool éthylique.
DH5 α = souche EscheriChia Coli au génotype suivant: F-, Ø80dlacZΔM15, Δ(lacZYA-argF), U169, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *phoA*, *hsdR17*(rK-,mK+), *supE44*,lamda-, *thi-1*, *gyrA96*.

IV. Numération des plaquettaire

Prélever du sang (environ 20 μ l) au niveau du plexus rétroorbital en utilisant des microcapillaires.
Diluer immédiatement 1/100 dans kit Unopette (Becton Dickinson).
Laisser reposer environ 90' à RT pour lyse complète des érythrocytes.
Compter les plaquettes sous un microscope à contraste de phase (grossissement 400x) sur une cellule de Neubauer.

Matériel:

Réservoir Unopette= 1.98 ml de mixture de dilution:Ammonium oxalate 11.45gm, Sorensen's phosphate buffer 1.0gm , Thimerosal 0.1gm, ajuster à 1L avec H₂O stérile
Tube capillaire hépariné: diamètre = 1,5 mm, longueur = 75 mm

V. Numération des spermatozoïdes

Disséquer les épидидymes. Les homogénéiser dans 1ml de PBS (couper en fragments avec un scalpel).
Incuber les échantillons 10' à 37°C.
Diluer les échantillons 20x dans du PBS.
Compter les spermatozoïdes sur une cellule de Burker.

Matériel:

PBS= 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄; 1,4 mM KH₂PO₄ pH 7,3

VI. Coupes histologiques sur tissus enrobés à la parafine (fixés dans du Bouin)

VI.1. Préparation des tissus

Disséquer les organes et les fixer dans du bouin. Enrober en paraffine avec l'histocentre2 (shandon) après avoir passé les échantillon dans la machine d'imprégnation (Tissue-Vek, saleura) (département d'histologie).

VI.2. Coupes

Dégrossir le bloc. Laisser bloc entre 6 et 24 h dans du moliflex.

Ajuster le couteau à un angle de 6°.

Couper avec épaisseur de 6 microns des rubans de coupes. Prélever les coupes choisies et les poser sur lame superfrost (Vell) avec de l'eau gélatinée.

Chauffer à 50°-60°C pendant environ 1'. Egoutter.

Chauffer pendant 1'. Sécher les lames à 48°C pendant 1 heure.

VI.3. Coloration Hémalun, Erythrosine, Safran

3' dans du toluol	rinçage dans l'eau	8' dans du safran
3' dans du toluol	1' dans de l'éthanol-HCl	1' dans de l'isopropanol
3' dans du méthanol 100%	6' dans de l'érythrosine	1' dans de l'isopropanol
3' dans du méthanol 100%	rinçage dans l'eau	1' dans de l'isopropanol
3' dans du méthanol 70%	1' dans de l'éthanol 70%	1' dans du toluol
10' sous l'eau courante	1' dans de l'isopropanol	1' dans du toluol
7' dans de l'hémalun	1' dans de l'isopropanol	Temps indéterminé dans du toluol

VI.4. Montage

Monter les coupes encore humides avec du DPX.

Matériel:

Eau gélatinée: 1 g à dissoudre dans 80 ml d'eau. Filtrer.

Moliflex: Prod 360584X (BDH).

DPX: Prod 36029 (BDH).

Bouin: mélange de 10 ml de formaline 40%, 5 ml de Glacial acétique acid et 85 ml d'acide picrique

Différentes solutions pour coloration:

-Hémalun: Porter à ébullition 1L d'une solution saturée d'alun de potassium (Merk 1047) dans de l'eau distillée. (AlKO8S2.12H2O). Ajouter, hors du feu, 3 g d'hématein Standard Fluka. Faire bouillir 5'.

Refroidir. Filtrer et ajouter 20 cc d'acide acétique glacial (Merk 60). Toujours filtrer avant emploi.

-Erythrosine: 1000 cc d'eau courante; 2 g d'érythrosine (Merck 1355); 10 gouttes de formol.

-Safran: 1L d'alcool éthylique absolu; 5 g Safran du gatinais (Chroma). Faire bouillir 1 heure avec une colonne éfrigérente. Refroidir. Filtrer. Diluer 1/1 avec de l'alcool absolu avant l'emploi.

-Alcool-HCl: 100 cc d'alcool éthylique 95° dénaturé à l'éther; 0,4 cc HCl fumant (Merck 317).

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

1. Chomez, P., O. De Backer, M. Bertrand, E. De Plaen, T. Boon, and S. Lucas, *An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family*. *Cancer Res*, 2001. **61**(14): p. 5544-51.
2. Takahashi, K., S. Shichijo, M. Noguchi, M. Hirohata, and K. Itoh, *Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis*. *Cancer Res*, 1995. **55**(16): p. 3478-82.
3. De Smet, C., O. De Backer, I. Faraoni, C. Lurquin, F. Brasseur, and T. Boon, *The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(14): p. 7149-53.
4. Graff-Dubois, S., O. Faure, D.A. Gross, P. Alves, A. Scardino, S. Chouaib, F.A. Lemonnier, and K. Kosmatopoulos, *Generation of CTL recognizing an HLA-A*0201-restricted epitope shared by MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10, and -A12 tumor antigens: implication in a broad-spectrum tumor immunotherapy*. *J Immunol*, 2002. **169**(1): p. 575-80.
5. Lurquin, C., C. De Smet, F. Brasseur, F. Muscatelli, V. Martelange, E. De Plaen, R. Brasseur, A.P. Monaco, and T. Boon, *Two members of the human MAGEB gene family located in Xp21.3 are expressed in tumors of various histological origins*. *Genomics*, 1997. **46**(3): p. 397-408.
6. De Backer, O., A.M. Verheyden, B. Martin, D. Godelaine, E. De Plaen, R. Brasseur, P. Avner, and T. Boon, *Structure, chromosomal location, and expression pattern of three mouse genes homologous to the human MAGE genes*. *Genomics*, 1995. **28**(1): p. 74-83.
7. Chomez, P., R. Williams, O. De Backer, T. Boon, and B. Vennstrom, *The SMAGE gene family is expressed in post-meiotic spermatids during mouse germ cell differentiation*. *Immunogenetics*, 1996. **43**(1-2): p. 97-100.
8. Hong, P.C., R.M. Tsohis, and T.A. Ficht, *Identification of genes required for chronic persistence of Brucella abortus in mice*. *Infect Immun*, 2000. **68**(7): p. 4102-7.
9. Chibuk, T.K., J.M. Bischof, and R. Wevrick, *A necdin/MAGE-like gene in the chromosome 15 autism susceptibility region: expression, imprinting, and mapping of the human and mouse orthologues*. *BMC Genet*, 2001. **2**(1): p. 22.
10. Tsai, T.F., D. Armstrong, and A.L. Beaudet, *Necdin-deficient mice do not show lethality or the obesity and infertility of Prader-Willi syndrome*. *Nat Genet*, 1999. **22**(1): p. 15-6.
11. Gerard, M., L. Hernandez, R. Wevrick, and C.L. Stewart, *Disruption of the mouse necdin gene results in early post-natal lethality*. *Nat Genet*, 1999. **23**(2): p. 199-202.
12. Muscatelli, F., D.N. Arous, A. Massacrier, I. Boccaccio, M. Le Moal, P. Cau, and H. Cremer, *Disruption of the mouse Necdin gene results in hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome*. *Hum Mol Genet*, 2000. **9**(20): p. 3101-10.

13. Barker, P.A. and A. Salehi, *The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease*. J Neurosci Res, 2002. **67**(6): p. 705-12.
14. Fields, S. and O. Song, *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. Nature, 1989. **340**(6230): p. 245-6.
15. Taniura, H., K. Matsumoto, and K. Yoshikawa, *Physical and functional interactions of neuronal growth suppressor necdin with p53*. J Biol Chem, 1999. **274**(23): p. 16242-8.
16. Nakada, Y., H. Taniura, T. Uetsuki, J. Inazawa, and K. Yoshikawa, *The human chromosomal gene for necdin, a neuronal growth suppressor, in the Prader-Willi syndrome deletion region*. Gene, 1998. **213**(1-2): p. 65-72.
17. Kobayashi, M., H. Taniura, and K. Yoshikawa, *Ectopic expression of necdin induces differentiation of mouse neuroblastoma cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(44): p. 42128-35.
18. Jordan, B.W., D. Dinev, V. LeMellay, J. Troppmair, R. Gotz, L. Wixler, M. Sendtner, S. Ludwig, and U.R. Rapp, *Neurotrophin receptor-interacting mage homologue is an inducible inhibitor of apoptosis protein-interacting protein that augments cell death*. J Biol Chem, 2001. **276**(43): p. 39985-9.
19. Salehi, A.H., P.P. Roux, C.J. Kubu, C. Zeindler, A. Bhakar, L.L. Tannis, J.M. Verdi, and P.A. Barker, *NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis*. Neuron, 2000. **27**(2): p. 279-88.
20. Dobrowsky, R.T. and B.D. Carter, *p75 neurotrophin receptor signaling: mechanisms for neurotrophic modulation of cell stress?* J Neurosci Res, 2000. **61**(3): p. 237-43.
21. Tcherpakov, M., F.C. Bronfman, S.G. Conticello, A. Vaskovsky, Z. Levy, M. Niinobe, K. Yoshikawa, E. Arenas, and M. Fainzilber, *The p75 neurotrophin receptor interacts with multiple MAGE proteins*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49101-4.
22. Frade, J.M., *NRAGE and the cycling side of the neurotrophin receptor p75*. Trends Neurosci, 2000. **23**(12): p. 591-2.
23. Salehi, A.H., S. Xanthoudakis, and P.A. Barker, *NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway*. J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 48043-50.
24. Williams, M.E., P. Strickland, K. Watanabe, and L. Hinck, *UNC5H1 Induces Apoptosis via Its Juxtamembrane Region through an Interaction with NRAGE*. J Biol Chem, 2003. **278**(19): p. 17483-90.
25. Masuda, Y., A. Sasaki, H. Shibuya, N. Ueno, K. Ikeda, and K. Watanabe, *Dlxin-1, a novel protein that binds Dlx5 and regulates its transcriptional function*. J Biol Chem, 2001. **276**(7): p. 5331-8.
26. Matsuda, T., H. Suzuki, I. Oishi, S. Kani, Y. Kuroda, T. Komori, A. Sasaki, K. Watanabe, and Y. Minami, *The receptor tyrosine kinase Ror2 associates with the MAGE-family protein Dlxin-1 and regulates its intracellular distribution*. J Biol Chem, 2003.
27. Kataoka, T., N. Holler, O. Micheau, F. Martinon, A. Tinel, K. Hofmann, and J. Tschoopp, *Bcl-rambo, a novel Bcl-2 homologue that induces apoptosis via its unique C-terminal extension*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 19548-54.
28. von Schack, D., E. Casademunt, R. Schweigreiter, M. Meyer, M. Bibel, and G. Dechant, *Complete ablation of the neurotrophin receptor p75NTR causes*

- defects both in the nervous and the vascular system.* Nat Neurosci, 2001. **4**(10): p. 977-8.
29. Gale, N.W. and G.D. Yancopoulos, *Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development.* Genes Dev, 1999. **13**(9): p. 1055-66.
30. Yuan, L., D. Moyon, L. Pardanaud, C. Breant, M.J. Karkkainen, K. Alitalo, and A. Eichmann, *Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice.* Development, 2002. **129**(20): p. 4797-806.