

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Construction d'un vecteur d'inactivation conditionnelle du gène Mage-b3

Maudoux, Bérengère

Award date: 2005

Link to publication

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

Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.

You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

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



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX NAMUR

Faculté des Sciences

Construction d'un vecteur d'inactivation conditionnelle du gène Mage-b3

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

Bérengère MAUDOUX

Septembre 2005

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

Construction d'un vecteur d'inactivation conditionnelle du gène Mage-b3

MAUDOUX Bérengère

Résumé

Les gènes *MAGE* constituent de grandes familles multigéniques dans le génome des mammifères. Ils peuvent être classés en deux grandes catégories, selon leur profil d'expression. Les gènes *MAGE* de type I sont silencieux dans les tissus somatiques adultes, à l'exception des cellules de la lignée germinale mâle, et, pour certains d'entre eux, du placenta. L'expression de ces gènes de type I peut être activée dans les cellules tumorales et générer l'apparition d'antigènes spécifiques des tumeurs cancéreuses. Les gènes *MAGE* de type II sont, au contraire, exprimés dans de nombreux tissus somatiques, tant chez l'adulte qu'au cours du développement.

Les gènes *Mage-b* sont des gènes de type I et le génome de la souris en comporte trois. *Mage-b-1* et *Mage-b-2* spécifient la même protéine et sont sur le chromosome X alors que *Mage-b-3* est une copie rétroposée mais fonctionnelle située sur le chromosome 2. Des souris knockout pour *Mage-b-1* et *Mage-b-2* ont été obtenues au laboratoire. Ces animaux se développent normalement, sont fertiles et ont une spermatogenèse normale. Cette absence de phénotype pourrait être due à la présence de *Mage-b-3*.

Au cours de ce travail, nous avons construit un vecteur d'inactivation conditionnelle qui devrait permettre d'obtenir des souris knock-out pour ce gène. Le croisement de ces souris avec des souris double knock-out *Mage-b-1/Mage-b-2* devrait permettre d'obtenir des animaux triple knock-out, dépourvus de toute protéine Mage-b, et ainsi de déterminer la fonction de ces protéines chez la souris.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques Humaines Septembre 2005 **Promoteur:** O. De Backer Merci à Olivier De Backer, mon promoteur, pour l'accueil au sein de son équipe et le suivi au cours de ce mémoire.

Merci à Carine Michiels, Aurélie Tacheny, Stéphanie Zdanov et Jean Vandenhaute, membres du jury, pour la lecture critique de ce mémoire.

Merci à Carlos, Coraline, Christiane, Dominique, Marie, Than et Yeliz pour leur soutien, leur aide et leurs conseils quotidiens.

Merci Jenny pour tous les moments passés ensemble ces deux dernières années.

Merci à ma maman de m'avoir permis de faire des études et d'avoir toujours été là pour moi aux cours de ces années.

Merci à Nicolas d'être présent tous les jours à mes côtés et de me soutenir dans les bons moments comme dans les plus difficiles.

Enfin, merci à tous ceux que je n'aurais pas cité et qui, de près ou de loin, m'ont aidé lors de ce mémoire.

Abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
CAT	Chloramphénicol Acétyl
CREB	cAMP Response Element Binding Protein.
dNTP	déoxynucléotides triphosphate
E12.5	12 ^{ème} jour embryonnaire
GnRH	Gonadotropin releasing hormone
HmB	Hygromycine Transférase
Jsd/jsd	Juvénile Spermatogonial Déplétion mutation
Kan ^R	résistance à la anamycine
Kan ^S	sensibilité à la kanamycine
Kb	Kilo bases
KO	Knock out
MAGE	protéine MAGE humaine
MAGE	gène MAGE humain
Mage	gène MAGE murin
MAGE	Melanoma AntiGen
Mage	protéine MAGE murine
MCD	Mage conserved domain
ndnl2	gène necdin-like2
O/N	Overnight
Pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
pRB	protéine du rétinoblastome
PWS	Syndrome de Prader-Willi
RT	Room Temperature

Table des matières

Introduction

I.1. Les gènes MAGE	3
I.1.1. Les gènes MAGE de type I	4
I 1 1 1 Contrôle transcriptionnel : le gène MAGE-A1	5
$I = 112$ Les gènes $M4GF_R$	6
1.1.1.2. Les genes MAOL-D	0
I.1.2. Les gènes MAGE de type II	10
I.1.2.1. Les gènes MAGE-D	11
I.1.2.2. Le gène Necdin	13
I.1.2.3. Le gène necdin-like 2 de Danio rerio	14
I.2. La spermatogenèse	14
1.3 L'inactivation ciblée de gènes dans le génome de la souris	
(«knock-out »)	18
(" KIOCK-Out ")	10
I.3.1. Obtention d'une souris knockout	18
I.3.2. Analyse du phénotype des souris knock-out	21
I.3.3. La mutagenèse conditionnelle impliquant le système Cre/LoxP	22
I.3.3.1. Le système Cre/LoxP	22
I.3.3.2. Obtention d'une souris knockout conditionnelle	23
I.4. Objectif du mémoire	24
Résultats et discussion	
II.1. Stratégie élaborée afin de générer des souris déficientes en Mage-b3	25
II.2. Résultats	30
II.2.1. Insertion du site LoxP en amont du gène Mage-b3	30
II.2.2. Insertion de la cassette néolox en aval de Mage-b3	37
II 2 Discussion	40
II.5. Discussion	42
Matériel et méthodes	
III.1. Matériel	44
III.1.1. Souches et plasmides	44
III.1.1.1. Souche bactérienne	44
III.1.1.2. Plasmides	44
III.1.2. Milieux de culture	
III 1.3 Tampons et Solutions	45
III 1.4 Enzymes de restriction	4 5 46
III.I.T. Diagnucléatides	1 0 46
m.r.g. Ongonucleondes	+0

III.2.1. Techniques relatives à l'utilisation d'ADN	. 47
III.2.1.1. PCR (Polymerase Chain Reaction)	. 47
III.2.1.2. Électrophorèse en gel d'agarose	. 48
III.2.1.3. Restriction sur plasmide	. 48
III.2.1.4. Déphosphorylation d'un plasmide linéarisé	. 49
III.2.1.5. Ligation d'un plasmide	. 49
III.2.1.6. Purification d'ADN sur colonne (Kit Promega Wizard® SV Gel and PCR	1
Clean-Up System)	. 49
III.2.1.7. Préparation d'ADN plasmidique	. 49
III.2.1.8. Séquençage	. 50
III.2.2. Techniques relatives à l'utilisation de bactéries	. 51
III.2.2.1. Transformation bactérienne par choc électrique	. 51

Introduction

I.1. Les gènes MAGE

MAGE-A1, le premier gène de la famille MAGE, a été découvert en 1991 par l'équipe de T. Boon de l'Institut Ludwig de Bruxelles. Il fut appelé MAGE (pour Melanoma AntiGEne) car il gouverne l'expression d'un antigène tumoral exprimé par certains mélanomes humains et reconnus par des lymphocytes T cytotolytiques ^{van der Bruggen et al., 1991}. Ce gène appartient à un groupe de 12gènes, les gènes *MAGE-A*, localisés dans la région q28 du chromosome X De Plaen et al., 1994

Par la suite, d'autres études ont permis d'identifier deux autres groupes de gènes MAGE : les *MAGE-B* dans la région Xp21.3 et les MAGE-C en Xq26-q2

Le séquençage complet du génome humain a permis d'identifier 55 gènes *MAGE* répartis en 13 sous-familles, en fonction de leurs similarités de séquence et de leur localisation chromosomique (Fig.1) Chomez *et al.*, 2001.



Figure 1. Localisation chromosomique des sous-familles de gènes MAGE humains (Chomez et al., 2001)

Chez la souris, la famille des gènes *Mage* est composée de 30 membres regroupés en 9 sous familles ^{Chomez et al., 2001}.

Les protéines MAGE possèdent toutes un domaine conservé d'environ 200 acides aminés, le MCD (MAGE Conserved Domain). Ce domaine, dont la fonction est inconnue, est habituellement situé du côté carboxy-terminal (Fig. 2). La partie amino-terminale des protéines MAGE est très variable d'une sous-famille à l'autre.



Figure 2. Représentation schématique des protéines humaines MAGE-A1, -B1, -D2, -E1, -H1. Les zones noires représentent le Domaine Mage Conservé. Le pourcentage d'identité en acides aminés entre les différents domaines mage est indiqué. Les régions N- et C-terminales ne partagent pas d'homologie ^(d'après Chomez et al.,2001).

Les gènes *MAGE* peuvent être classés en deux groupes selon leur profil d'expression : les gènes *MAGE* de type I et les gènes *MAGE* de type II.

I.1.1. <u>Les gènes MAGE de type I</u>

Les gènes MAGE-A, -B et -C sont exprimés dans des tumeurs de divers types histologiques ainsi que dans les testicules et, parfois dans le placenta, mais sont silencieux dans tous les tissus somatiques adultes ^{De Plaen et al., 1994}. Leur expression limitée à la lignée germinale suggère un rôle dans la spermatogenèse. Leur expression dans les cellules tumorales génère des antigènes qui sont des cibles de choix pour l'immunothérapie anti-tumorale car ces antigènes sont complètement spécifiques des tumeurs. Des études préliminaires montrent que l'immunisation de patients porteurs de mélanomes avec un peptide antigénique encodé par le gène *MAGE-A3* entraîne une régression tumorale chez 10 à 20% des patients ^{Marchand et al., 1999;Thurner et al., 1999}.

Tous les gènes *Mage* de type I ont une structure simple : seul le dernier exon est codant et il est précédé d'un ou de quelques exons non codants (figure 3).

Les gènes de type I évoluent rapidement chez les mammifères, ce qui rend impossible l'établissement de relations d'orthologie entre les gènes humains et murins.



Figure 3. Structure génomique des gènes *Mage* de type I. Les exons sont représentés par des boîtes. Les traits noirs épais représentent les grilles de lecture. Plusieurs exons 1, alternatifs, sont mentionnés pour *Mage-b2*.

I.1.1.1. Contrôle transcriptionnel : le gène MAGE-A1

Il semble que l'expression du gène *MAGE-A1* soit régulée essentiellement par l'état de méthylation du promoteur.

Des études réalisées sur la région promotrice de *MAGE-A1* ont montré que l'activité transcriptionelle de ce gène dépendait de facteurs de transcription ubiquistes de type Ets et Sp1 ^{De Smet et al., 1995}.

Des expériences de transfection montrent que le promoteur de *MAGE-A1* est actif dans toutes les lignées cellulaires testées, y compris dans des lignées non transformées, qui n'expriment pas *MAGE-A1*. Cela implique que les cellules n'exprimant pas le gène *MAGE-A1* contiennent les facteurs de transcription capables d'activer son promoteur.

La méthylation des cytosines au niveau des séquences CpG joue un rôle dans le contrôle de l'expression génique chez les mammifères. La méthylation de l'ADN est capable de réprimer la transcription des gènes soit directement en empêchant la liaison de facteurs de transcription, soit indirectement en recrutant des protéines capables de lier l'ADN méthylé et d'empêcher la liaison des facteurs de transcription ou de remodeler la structure de la chromatine.

La région promotrice de *MAGE-A1* est riche en CpG. Ceux-ci sont majoritairement déméthylés dans les cellules tumorales qui expriment *MAGE-A1*, alors qu'ils sont méthylés dans les cellules qui ne l'expriment pas. L'expression de *MAGE-A1* peut être induite en traitant les cellules avec un agent déméthylant, la 5'-aza-2'-déoxycytidine. Les autre gènes de la famille *MAGE*, possédant une région riche en CpG du côté 5' sont également activés par un traitement à la 5'-aza-2'-déoxycytidine, ce qui suggère que l'expression de ces gènes est régulée par la méthylation de l'ADN.

Les gènes possédant des îlots CpG associés à la région promotrice ne sont méthylés que dans deux cas : sur le chromosome X inactif dans les cellules somatiques femelles et sur les allèles silencieux des gènes soumis à l'empreinte parentale. La plupart du temps, ils sont déméthylés dans tous les tissus normaux. Ce sont soit des gènes de maintenance exprimés dans tous les types cellulaires soit, des gènes dont l'expression est spécifique de certains tissus et dépend de la présence des facteurs de transcription seulement présents dans les tissus où le gène est exprimé. Les gènes *MAGE* de type I représentent donc une exception. Leur expression limitée à la lignée germinale mâle ne dépendrait pas de la présence de facteurs de transcription spécifiques, comme les autres gènes porteurs d'îlots CpG, mais résulterait, de manière primaire, de la déméthylation de leur région promotrice qui se produit au cours de la spermatogenèse. Leur réactivation dans les cellules tumorales serait due à la déméthylation du promoteur. Celle-ci serait causée par un processus de déméthylation généralisé du génome qui se produit fréquemment dans les cancers et est associé à la progression tumorale ^{De Smet et al., 1999;Lee et al., 1992; Robertson, 2005}

I.1.1.2. Les gènes MAGE-B

Contrairement aux gènes *Mage-a* qui sont exprimés dans les spermatogonies, l'expression des gènes *Mage-b* est localisée dans les spermatides rondes ^{Clotman et al., 2000}.

Chez la souris, les gènes *Mage-b1* et -b2 sont localisés sur le chromosome X, entre les gènes *Dmd* et *Ar* (figure 5). Ils forment un tandem dans une région synténique à la région p21.1-22.1 du chromosome X humain où se situent les gènes *MAGE-B* ^{De Backer et al., 1995}. Le gène *Mage-b3* est situé sur le chromosome 2 (figures 4 et 5).



Figure 4. Localisation chromosomique des membres des sous-familles de gènes *MAGE-A*, -*B* et -*C* humains ^{(De} Plaen et al.,1998)



Figure 5. Localisation chromosomique des membres des sousfamilles de gènes *Mage-a* et *Mage-b* de souris ^(De Plaen et al.,1998).

Les gènes *Mage-b1* et *Mage-b2* codent pour la même protéine de 330 acides aminés. La protéine encodée par le gène *Mage-b3* ne diffère que de 11 acides aminés par rapport aux protéines Mage-b1 et -b2. La séquence de *Mage-b3* indique que ce gène est un variant *Mage-b2* rétrotransposé sur le chromosome 2. En effet, il ne contient pas d'introns et sa séquence est identique à 98% à celle d'un transcrit *Mage-b2* (Figure 3).

Afin d'étudier la fonction des gènes *Mage-b*, différentes souris knock-out ont été produites : des souris knock-out pour le *Mage-b1*, d'autres pour le *Mage-b2* et enfin, des souris doubles mutantes pour *Mage-b1* et *Mage-b2*.

Pour réaliser les souris mutantes *Mage-b1*, on a remplacé un morceau de l'ORF de *Mage-b1* (depuis le codon ATG, initiateur de la traduction jusqu'au site EcoRI) par une cassette contenant l'ORF du gène rapporteur LacZ suivie d'un signal de polyadénylation et d'un gène de résistance à la néomycine sous contrôle d'un promoteur PGK (PhosphoGluco Kinase) (Figure 6).

La construction du knock-out *Mage-b2* a été effectuée en remplaçant un fragment débutant par l'ATG et couvrant toute l'ORF de *Mage-b2* par l'ORF du gène rapporteur CAT (Chloramphénicol Acétyl Transférase), suivie d'un gène de résistance à l'hygromycine (HmB) (figure 7).

Le double mutant *Mage-b1/Mage-b2* a été obtenu par inactivation séquentielle du gène *Mage-b1* puis du gène *Mage-b2* dans les cellules ES car les deux gènes sont trop proches pour obtenir des recombinants méïotiques à une fréquence raisonnable.



Figure 6. Vecteur d'inactivation de *Mage-b1* contenant le gène rapporteur LacZ suivi du gène de résistance à la néomycine.



Figure 7. Vecteur d'inactivation de *Mage-b2* contenant le gène rapporteur CAT suivi d'un gène de résistance à l'hygromycine.

Des études d'hybridation *in situ* ont montré que les gènes *Mage-b* sont exprimés de façon spécifique dans les spermatides rondes. Il est également possible de mettre en évidence le profil d'expression des gènes *Mage-b1* par une coloration au X-gal des coupes histologiques de testicules des souris déficientes en ce gène. Etant donné la présence du gène rapporteur LacZ codant pour la β -galactosidase à la place de l'ORF de *Mage-b1*, l'expression est mise en évidence par une coloration bleue au niveau des spermatides rondes et allongées (figure 8).



Figure 8. Coloration X-gal sur une coupe de testicule de souris adulte KO pour le gène Mage-b1. L'expression de Mage-b1 est localisée dans les spermatides rondes.

Des d'hybridations *in situ* réalisées sur des coupes transversales de testicules de souris knock-out pour *Mage-b1* et *Mage-b2* ont permis de déterminer le profil d'expression des trois gènes *Mage-b*^(De Backer, résultats non publiés).

Le profil d'expression de *Mage-b1* est révélé en utilisant une sonde spécifique de LacZ tandis que les cellules exprimant normalement *Mage-b2* sont détectées par une sonde spécifique de CAT. Les résultats indiquent que les deux gènes sont exprimés dans les mêmes tubules séminifères, *Mage-b2* présentant un signal d'intensité plus faible ^(De Backer, résultats non publiés). Une sonde spécifique *Mage-b* a permis de localiser l'expression de *Mage-b3*. Le profil d'expression de ce dernier recouvre celui des deux autres mais *Mage-b3* est également exprimé dans des tubules qui n'expriment pas *Mage-b1/Mage-b2* (figure 9).



Figure 9. Hybridations *in situ* de coupes transversales de testicules de souris knock-out pour *Mage-b1* et *Mage-b2*. Une sonde *Mage-b* indique le profil d'expression de *Mage-b3* (à gauche) et une sonde spécifique de LacZ, révèle l'expression de Mage-b1 (à droite).

Introduction

L'étude des souris double mutantes Mage-b1/Mage-b2 n'a révélé aucun phénotype anormal (Dirix, 2003, résultats non publiés)

Ces souris sont viables et fertiles. Puisque les ARNm de *Mage-b1* et *Mage-b2* sont exprimés dans les spermatides rondes, cette étude a consisté en la recherche d'un phénotype testiculaire.

Trois éléments ont été analysés au cours de ce travail :

1) La taille et la composition des portées chez les souris déficientes en Mage-b1/Mage-b2.

2) Les caractéristiques histologiques des testicules des animaux mutés.

3) Le nombre de spermatozoïdes des souris doubles mutantes Mage-b1/Mage-b2.

Afin d'étudier la composition de la descendance des souris déficientes en *Mage-b1/Mage-b2*, différents croisement ont été réalisés (femelles hétérozygotes x mâles hémizygotes, femelles hétérozygotes x mâles sauvages et femelles homozygotes x mâles hémizygotes). La taille de portées, le sex-ratio ainsi que la proportion de chaque génotype ont été observés. La fertilité n'est pas affectée chez les souris déficientes en *Mage-b1/Mage-b2* : la taille des portées est similaire dans les différents croisements réalisés et ne diffère pas de celles observées dans les colonies de souris sauvages.

L'histologie des testicules de souris knock-out pour *Mage-b1* et *Mage-b2* a été comparée à celle de mâles sauvages issus de même portées (background génétique semblable). On a prélevé les testicules à différents âges : à 22 jours, lorsque le stade de différenciation le plus avancé est le stade spermatide ; à 29 jours, quand les spermatozoïdes apparaissent dans la lumière des tubules séminifères et à 38 jours (maturité sexuelle), où les tubules séminifères et l'épididyme contiennent de nombreux spermatozoïdes. Les testicules ont été pesés et, après fixation au bouin, enrobés dans de la paraffine. L'examen histologique des coupes en paraffine des testicules de souris mutées n'a pas permis de mettre en évidence d'anomalie majeure chez les souris knock-out *Mage-b1/Mage-b2*. Les testicules provenant de ces souris contenaient de nombreux tubules séminifères et un espace interstitiel limité comme c'est le cas pour les testicules normaux. Le diamètre des tubules séminifères, 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.

Finalement, on a isolé et dénombré les spermatozoïdes de l'épididyme de souris knock-out *Mage-b1/Mage-b2* et de souris sauvages du même âge. Le nombre de spermatozoïdes par épididyme des souris sauvages semblait supérieur à celui des souris double mutantes mais une étude portant sur un plus grand nombre d'animaux serait nécessaire afin de confirmer ce résultat.

I.1.2. <u>Les gènes MAGE de type</u> <u>II</u>

Les gènes MAGE de type II, dont font partie les gènes MAGE-D et le gène NECDIN, sont ubiquistes dans le sens qu'ils sont exprimés dans de nombreux tissus somatiques au cours du développement et chez l'adulte ^{Bertrand et al., 2004}.

I.1.2.1. Les gènes MAGE-D

Cette sous-famille regroupe 3 gènes *Mage-d* chez la souris et 4 chez l'être humain, situés dans la région Xp11.3.

Leur structure génomique comportant 13 exons dont seulement 11 codent pour la protéine indique que les *MAGED* sont les gènes « originaux » à partir desquels tous les membres de la famille MAGE auraient été générés par des événements de rétroposition et de duplication (Figure 10).



Figure 10. Organisation génomique des gènes *Mage-d* murins par rapport aux autres gènes *Mage*. Les exons sont représentés par des rectangles. La phase ouverte de lecture est indiquée en gris et la séquence encodant le MCD en noir ^(Modifié d'après Chomez et al., 2001).

Contrairement aux autres gènes *MAGE*, les gènes *MAGE-D* sont très conservés chez les mammifères. Par exemple, les orthologues murins et humains de MAGE-D1 et MAGE-D2 partagent 99% d'identité en acides aminés au niveau du MCD. Cela indique que ces deux gènes existaient avant la séparation phylogénique de ces deux espèces et aussi que ces protéines exercent probablement des fonctions distinctes (Figure 11).



Figure 11. Comparaison des séquences en acides aminés des MCD des protéines MAGE-D2 chez l'homme et chez la souris ^(Chomez et al.,2001).

Une analyse comparative détaillée a été réalisée sur les profils d'expression de Mage-d1, Mage-d2 et Mage-d3 pendant l'embryogenèse.

Des expériences d'hybridations *in situ* ont été réalisées sur des sections d'embryon de souris à différents moments du développement embryonnaire, en utilisant des ribosondes radioactives, spécifiques de chacun des trois gènes *Mage-d*.

Au cours de l'embryogenèse, *Maged2* est principalement exprimé dans les tissus dérivés du mésoderme (muscles intercostaux, diaphragme, muscles périvertébraux,...). L'expression de *Maged3* est surtout détectée dans le système nerveux, tandis que le profil d'expression de *Maged1* recouvre globalement celui des deux autres (figure 12) Bertrand *et al.*, 2004.



Figure 12. Hybridation *in situ* montrant l'expression de *Maged1, -d2, -d3* à différents stades du développement embryonnaire chez la souris. Des sondes d'ARN marquées au ³³P ont été hybridées sur des coupes parasagitales d'embryons à différents stades (E12.5, E14.5 et E17.5) et ont été révélées par autoradiographie ^{(Bertrand et al., 2004).}

Selon des études réalisées sur les cellules PC12 ou dans des cellules embryonnaires rénales 293, Maged1 bloque la progression du cycle cellulaire lorsqu'il est surexprimé. Maged1 interagit avec le récepteur aux neurotrophines, p75^{NTR}. Les neurotrophines appartiennent à une famille de protéines affectant la plupart des fonctions des neurones des vertébrés. Lorsque des neurotrophines se lient à p75^{NTR}, celui-ci recrute Maged1. Le domaine MCD de Maged1 se lie à la partie intracellulaire de p75^{NTR} et cela déclenche une transduction de signal qui aboutit à l'apoptose^{Salehi et al., 2000;Salehi et al., 2002}.

I.1.2.2. Le gène Necdin

Necdin est le premier membre de la famille des gènes *Mage* de type II à avoir été identifié. Le gène *Necdin* encode une protéine de 325 acides aminés hautement conservée entre la souris et l'homme (91% d'identité pour le MCD).

Chez l'homme, ce gène se trouve dans la région q11.2-12 du chromosome 15 soumise à une empreinte maternelle. De grandes délétions du chromosome paternel dans cette région sont la cause la plus fréquente du syndrome de Prader-Willi (PWS), une maladie neurogénétique touchant un enfant sur 10000 à 15000. Les principaux symptômes de ce désordre sont une hypotonie importante et une détresse respiratoire à la naissance, un retard mental, une petite stature, un hypogonadisme et une hyperphagie menant à une obésité sévère. Des troubles du comportement tels que des difficultés à s'adapter à un nouvel environnement, des prurits incessants et des accès de rage ont également été observés.

Les patients atteints du PWS ont un nombre réduit de neurones hypothalamiques produisant de l'ocytocine. Etant donné qu'une des fonctions de ces neurones semble être la satiété, cela expliquerait l'obésité observée chez les patients PWS.

De plus, l'altération de neurones hypothalamiques GnRH responsables de la libération d'hormones sexuelles, comme les gonadotropines et la prolactine, conduit à la stérilité et à la présence d'organes reproducteurs atrophiés.

Chez la souris, *Necdin* est situé sur le chromosome 7 dans la région synténique de la région 15q11-12 humaine. Afin de tester l'implication de la déficience en NECDIN dans le PWS, des souris dépourvues de Necdin ont été générées par trois groupes distincts.

L'équipe de Tsai a été la première à obtenir des souris déficientes en *Necdin*. Ils n'ont remarqué aucun phénotype chez ces souris ^{Tsai *et al.*, 1999.}

Gérard et ses collègues ont observé chez un autre mutant *Necdin*, une létalité qui survient dans les 30 heures après la naissance, associée à un stress respiratoire. Cette létalité dépendait du fond génétique des animaux, ce qui pourrait expliquer l'absence de phénotype observé par le premier groupe. Les souris survivantes sont normales et ne présentent pas de symptômes observés chez les Prader-Willi ^{Gerard et al., 1999}.

L'équipe de F. Muscatelli a obtenu une troisième lignée de souris déficientes en Necdin. L'analyse du phénotype de ces animaux a permis de confirmer les résultats de Gérard et al. mais montre, de plus, que les survivants déficients en *Necdin* souffrent d'hypotonie, de retard de croissance, et ont des troubles comportementaux rappelant certains symptômes du syndrome de Prader-Willi. Elles se grattent davantage, possèdent une plus grande aptitude pour l'apprentissage temporel et ont une meilleure capacité de mémorisation ^{Muscatelli et al.,}

Necdin interagit avec E2F1, un facteur de transcription régulant l'expression de gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire, et plus particulièrement à l'entrée des cellules en phase S. Pendant la phase G1 du cycle cellulaire la protéine du rétinoblastome, pRb, séquestre E2F1. Lors de la transition G1-S, pRb est phosphorylée et libère E2F1 lui permettant d'aller activer la transcription des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN. Dans les neurones différenciés, Necdin se comporterait comme Rb en empêchant l'entrée des neurones dans le cycle cellulaire.

Necdin a aussi la capacité de se lier à p53 et de réprimer son activité transcriptionnelle. Une surexpression de Necdin protégerait les cellules de l'apoptose induite par p53.

Ces résultats suggèrent que Necdin serait responsable du maintien de l'état post-mitotique des neurones et aurait un rôle dans la survie de certaines cellules du système nerveux central Taniura *et al.*, 1999;Taniura *et al.*, 1998

I.1.2.3. Le gène necdin-like 2 de Danio rerio

Un des avantages du poisson zèbre par rapport au modèle murin est que son génome ne possède qu'un seul gène Mage, ce qui évite les problème de redondance fonctionnelle ^{Bischof et} ^{al., 2003}. Le poisson zèbre est un modèle particulièrement intéressant étant donné son développement embryonnaire externe, rapide, bien documenté et la transparence des embryons facilitant son étude durant l'organogenèse. Il existe également chez ce poisson une technique rapide permettant l'inactivation ou la répression génique ^{Nasevicius and Ekker, 2000}. Cette technique consiste à injecter dans le zygote des oligonucléotides antisens modifiés (morpholinos) qui sont capables de se lier aux molécules d'ARNm et d'inhiber leur traduction. Afin de connaître le profil d'expression de ce gène *mage* de zebrafish, des expériences d'hybridation in situ sur des poissons adultes ont récemment été réalisées au laboratoire ^{Pilka,} ^{2005, résultats non publiés}. Les résultats montrent une forte expression limitée aux oocytes à différents stades de la vitéllogenèse (stade protoplasmique, en prévitéllogenèse et en vitéllogenèse).

I.2. La spermatogenèse

D'après *Spermatigenesis Overview*, Encyclopédia of Reproduction, Vol.4, p.539-545, Academy Press, 1999. et Gilbert Scott F., *Spermatogenesis*, Developmental Biology, Scott F. Gilbert, p.628-631, Sinauer Associates Inc., 2003.

La spermotagenèse est le processus qui transforme les cellules germinales mâles en spermatozoïdes au sein des tubules séminifères des testicules. Ce processus comporte trois phases : une phase de prolifération cellulaire par divisions mitotiques répétées, une phase de divisions méiotiques afin d'obtenir des cellules haploïdes et enfin, une phase de différenciation au cours de laquelle il y a formation des spermatzoïdes.

Les tubules séminifères sont bordés par un épithélium séminifère qui comporte deux types de cellules: les cellules somatiques et germinales. On trouve les cellules germinales à différents stades de différenciation depuis la base vers la lumière du tubule. Ces cellules sont entourées du cytoplasme des cellules somatiques, les cellules de Sertoli. Celles-ci nourrissent et protègent les cellules germinales en développement. Les jonctions entre deux cellules de Sertoli séparent les spermatogonies du compartiment luminal où les spermatocytes et les spermatides se développent (Figure 13).



Figure 13. Coupe transversale d'un tubule séminifère montrant les relations entre les cellules de Sertoli et le développement des spermatozoïdes. Au cours de la maturation, les cellules germinales migrent vers la lumière du tubule ^(Gilbert Scott F., Developmental biology p. 629).

Les cellules germinales primordiales (PGC) se multiplient dans les crêtes génitales chez l'embryon puis dans le compartiment germinal entre les cellules de Sertoli jusqu'à la puberté en formant des cellules souches germinales, les spermatogonies de types A1. Ces cellules sont capables de se régénérer et de donner naissance à d'autres types cellulaires. On observe également un grand nombre de dégénérescences par apoptose des spermatogonies souches. L'initiation de la spermatogenèse pendant la puberté est régulée par la synthèse de la BMP8b (Bone Morphogenetic Protéine 8b), produite par les spermatogonies de type A1. Lorsque la BMP8b atteint une certaine concentration, les cellules germinales commencent à se différencier. Les spermatogonies de type A1 caractérisées par un noyau ovoïde dans lequel la chromatine est associée à la membrane nucléaire, vont se diviser pour donner des spermatogonies de type A2, plus pâles. Deux autres divisions mitotiques vont alors produire les spermatogonies de types 3 et 4. Ensuite, les spermatogonies de type 4 vont soit reformer de nouvelles spermatogonies de type 4, soit se différencier en spermatogonies intermédiaires qui, par divisions mitotiques, deviendront des spermatogonies de type B, capables de générer les spermatocytes primaires. Les spermatogonies qui se divisent restent reliées par des ponts cytoplasmiques et forment ainsi des clones dont les mitoses sont synchronisées.

La transition entre les spermatogonies et les spermatocytes est régulée par le GDNF (Glial cell line- derived neurotrophic factor) libéré par les cellules de Sertoli. Chaque spermatocyte primaire subit une première division méiotique aboutissant à la formation de deux spermatocytes secondaires. Ceux-ci, en subissant la deuxième division de la méiose, engendrent des cellules haploïdes non flagellées appelées spermatides rondes. L'étape suivante consiste en la différenciation des spermatides rondes en spermatides allongées, porteuses d'un flagelle et capables de se modifier en spermatozoïdes (Figure14).



Figure 14. Les différents stades de développement des cellules germinales mâles (Gilbert Scott F., Developmental biology p. 630)

Dans toute région de l'épithélium séminifère sont superposées des cellules germinales à différentes étapes de la spermatogenèse. En effet, une nouvelle génération de spermatogonies commence à se multiplier avant que les cellules de la génération précédente ne soient devenues spermatozoïdes. Des vagues de mitoses se succèdent à un rythme régulier mais ne débute pas simultanément sur toute la longueur d'un tubule séminifère. Une vague mitotique commence à l'extrémité d'un tubule et se poursuit le long du tubule jusqu'à l'autre extrémité. Ceci explique qu'on ne retrouve pas le même stade de la spermatogenèse dans des coupes transversales passant par différentes régions d'un même tubule.

En fonction de la durée du cycle spermatogénique (26 jours chez la souris) et de celle précise de chaque étape du cycle, on peut identifier un certain nombre de stades de la spermatogenèse (12 ou 14 stades, selon les auteurs, chez la souris) correspondant à différentes combinaisons possibles de cellules spermatiques présentes à un niveau donné du tubule vu en coupe transversale (Figures 15 et 16).



Figure 15. Les vagues de spermatogenèse dans les tubules séminifères. Une vague comporte les stades I à XIV de la spermatogenèse. Selon l'endroit du tubule, on trouve différentes combinaisons de cellules spermatiques.



Figure16. Les 12 stades de la spermatogenèse chez la souris, comportant différentes combinaisons de cellules spermatiques. Spermatogonies (A et B); spermatocytes (Pl, préleptotène; L, leptotène; Z, zygotène; P, pachytène; D, diplotène); spermatides (1-16).

I.3. <u>L'inactivation ciblée de gènes dans le génome de la souris</u> (« knock-out »)

D'après Tymms M.J. et Kola I., *Gene Knockout Protocols*, Human Press, New Jersey, 2001; Torres R.M. et Kühn R., *Laboratory Protocols for Conditionnal Gene Tagreting*, Oxford University Press, Oxford, 1997 et Panthier J.J., Montagutelli X. et Guénet J.L., *La génétique de la souris*, Belin, Paris, 2003.

A la fin des années 1980, la première lignée de souris « knock-out » a été réalisée. Cette méthode constitue un des progrès les plus important dans la compréhension de la fonction des produits d'un gène. Elle consiste en la génération d'une lignée de souris possédant une mutation ciblée au niveau d'un gène d'intérêt. La technique utilisée pour générer de tels animaux repose sur la recombinaison homologue dans des cellules souches embryonnaires (cellules ES).

Depuis, cette technique a été utilisée sous différentes formes afin de générer des mutations nulles pour de très nombreux gènes, permettant de comprendre la fonction de ces gènes au niveau d'un organisme ainsi que d'y voir plus clair sur le fonctionnement de la cellule. Le séquençage complet du génome humain a favorisé l'utilisation de cette technologie étant donné la volonté de connaître la fonction de chaque gène.

Certaines souris knock-out sont des modèles murins de maladies génétiques humaines prouvant qu'un seul gène défectueux peut provoquer une maladie. Le croisement de souris homozygotes ou hétérozygotes pour des mutations spécifiques peut aussi fournir des informations importantes sur les maladies génétiques causées par plusieurs gènes défectueux.

I.3.1. Obtention d'une souris knock-out

L'obtention d'une souris knock-out comporte les étapes suivantes (figure 17) :

1) Construction du vecteur d'inactivation :

Le vecteur d'inactivation doit contenir des régions identiques avec celles du locus cible (bras d'homologie), un marqueur qui permettra de sélectionner les cellules ES transfectées (ex : gène de résistance à la néomycine), ainsi que des modifications permettant d'inactiver l'expression du gène cible.

2) Introduction du vecteur d'inactivation linéarisé par électroporation de cellules ES :

Lorsqu'on introduit un fragment d'ADN génomique dans une cellule de mammifère, il peut recombiner avec les séquences homologues endogènes. Le remplacement du gène par l'allèle modifié se fait dans des cellules totipotentes : les cellules souches embryonnaires (ES). Après la transfection, il faut sélectionner les clones de cellules ES qui ont intégré la mutation c'està-dire ceux qui présentent une résistance à la néomycine. Ces transfectants sont ensuite criblés par PCR ou analysés par Southern blot.

3) Micro-injection des cellules ES modifiées dans un blastocyste de souris sauvages ou agrégation avec des morules au stade 8-16 cellules :

L'introduction des cellules ES modifiées dans un embryon précoce leur permet de participer au développement de celui-ci. Le blastocyste est transféré dans l'utérus d'une souris sauvage pseudogestante.

4) Formation de souris chimériques :

Les cellules ES dérivent généralement de la lignée de souris 129 qui ont un pelage agouti. La couleur du pelage des souris donneuses des embryons est généralement différente, si bien que les chimères sont aisément identifiables par leur pelage en patchwork. Les cellules ES modifiées participent à la formation des gamètes dans la chimère, qui est alors capable de transmettre la modification à la descendance.

5) Croisement des mâles chimériques avec des femelles sauvages :

La transmission de la mutation à la descendance peut être visualisée par l'aquisition d'un pelage brun uniforme. Ces animaux sont porteurs de l'allèle muté à l'état hétérozygote (gène autosomique) ou hémizygote (gène sur le chromosome X).

6) Croisement des individus hétérozygotes entre eux :

Cela permet d'obtenir des souris homozygotes pour la mutation.



Figure 17. Représentation schématique des différentes étapes nécessaires à l'obtention d'une souris knockout. Dans ce cas, le gène cible est le gène BMP7. (A) Culture de cellules ES provenant d'un blastocyste de souris. (B) Construction du vecteur d'inactivation (le gène de résistance à la néomycine est inséré dans la séquence codante du gène cible), électroporation de la construction dans des cellules ES et sélection des clones de cellules ES qui ont subi la recombinaison homologue (résistance à la néomycine). (C) Injection des cellules ES dans un blastocyste de et réimplantation de celui-ci dans l'utérus d'une femellle pseudogestante. Obtention d'une chimère qui, par croisement avec une souris sauvage, donnera des animaux hétérozygotes pour la mutation. Ceux-ci sont alors croisés entre-eux afin d'obtenir des souris homozygotes pour l'allèle muté (Scott F. Gilbert, Developmental biology p.102). Afin de s'assurer que la mutation est nulle, il est nécessaire de démontrer qu'aucune protéine fonctionnelle n'est produite chez la souris mutée. Mais comme il n'est pas toujours possible de connaître toutes les activités de chacun des domaines d'une protéine, il est peut être plus sûr de s'assurer que la protéine n'est plus produite. Il faut également vérifier que l'expression du seul gène cible est affectée. En effet, il se peut que l'expression d'un gène voisin soit perturbée par la mutation.

I.3.2. Analyse du phénotype des souris knock-out

Le phénotype résultant de l'inactivation d'un gène peut être dû à deux facteurs : à la perte de fonction du gène cible, mais aussi à la réaction déclenchée par l'organisme pour compenser cette perte de fonction.

Il est très important d'interpréter le phénotype observé avec grande précaution. En effet, nous sommes peut être capables d'analyser de manière précise les éléments de certains organes ou cellules mais, d'autres systèmes restent encore flous. Il peut donc être impossible d'identifier un phénotype à cause de notre manque de connaissances. Cela constitue une importante limitation du knock-out.

Différentes catégories de phénotype peuvent être observées :

- certaines souris knock-out ont un phénotype prédictible grâce à des études réalisées précédemment

Ex. : la protéine p53 a une activité suppressive de tumeur *in vitro*, elle médie l'apoptose et est la mutation la plus fréquente dans les tumeurs humaines. Les souris ayant une mutation nulle dans le gène p53 sont fortement susceptibles de développer des tumeurs spontanées Donehower *et al.*, 1992

- le phénotype obtenu peut être inattendu ou surprenant.

Ex. : CREB (cAMP response element binding protéin) est un régulateur clé de beaucoup de gènes importants. Cependant, les souris déficientes en ce gène apparaissent normales Blendy *et al.*, 1996

- le phénotype peut passer inaperçu jusqu'à ce que la souris soit exposée à un stimulus particulier.

Ex. : La glutathion peroxydase est une enzyme impliquée dans la détoxification des composés oxygénés. Une souris déficiente en cette enzyme est normale mais lorsqu'elle est exposée à un stress oxydatif, elle présente une sensibilité accrue par rapport au contrôle de Haan *et al.*, 1998.

- beaucoup de knock-out conduisent à une létalité embryonnaire montrant un rôle important du gène dans le développement embryonnaire. Cela empêche l'analyse de la fonction du gène chez l'adulte.

Ex. : Le gène Rb est un suppresseur de tumeurs dont la perte entraîne la formation de rétinoblastomes chez l'être humain. Les souris possédant une mutation nulle homozygote dans le gène Rb meurent *in utero* Lee *et al.*, 1992.

Il est cependant possible d'étudier la conséquence d'une délétion d'un tel gène chez une souris adulte. Pour ce faire, il existe deux systèmes de recombinase site spécifiques, CRE/LoxP et FLP/FRT, permettant de réaliser des knock-out « conditionnels » dans le but de surmonter le phénotype de létalité embryonnaire. Cela rend dès lors possible l'analyse du phénotype d'une souris adulte possédant la mutation.

Le système Cre/LoxP est plus efficace dans les systèmes mammaliens incluant les cellules ES. Il est donc plus largement utilisé que le système FLP/FRT.

I.3.3. La mutagenèse conditionnelle impliquant le système Cre/LoxP

I.3.3.1. Le système Cre/LoxP

Ce système fait intervenir la recombinase Cre, une enzyme essentielle intervenant dans le cycle de reproduction du phage P1. Elle joue deux rôles dans le cycle viral. Premièrement, elle est responsable de la circularisation de l'ADN du phage P1 qui se trouve sous forme d'une molécule double brin mais doit se circulariser quand il pénètre dans l'hôte. Deuxièmement, Cre résout les dimères d'ADN P1 résultant d'une réplication ou d'une recombinaison homologue.

Cre reconnait spécifiquement une séquence d'ADN de 34 pb présente dans le génome du bactériophage P1. Cette séquence, appelée LoxP pour « *locus of X-over of P1* », est formée de deux séquences palindromiques de 13 pb séparées par une région espaceur, de 8 pb (Figure 18). La séquence de 8 pb est asymétrique et est responsable de l'orientation du site LoxP tandis que les segments de 13 pb sont des sites de reconnaissance pour la recombinase Cre. Chaque site LoxP comprend donc deux domaines de fixation pour Cre.



Cre possède la propriété de catalyser, entre deux sites LoxP, deux types de recombinaison donnant des résultas différents selon l'orientation de ces sites. (1) Lorsque les deux sites LoxP sont orientés dans le même sens, les séquences comprises entre ces deux sites sont excisées sous la forme d'un ADN circulaire et il ne subsiste sur l'ADN cible qu'un seul site LoxP (figure19).

(2) La recombinaison induite par Cre entre deux sites LoxP d'orientation opposée aboutit à l'inversion du fragment situé entre les deux séquences LoxP ^{Abremski and Hoess, 1984;Hoess and Abremski, 1984;Nagy, 2000}



Figure 19. La recombinaison catalysée par la recombinase Cre produit deux types de remaniements en fonction de l'orientation des sites LoxP.

L'activité catalytique de Cre n'implique aucun co-facteur et ne requiert pas de disposition particulière de l'ADN hormis la présence de sites LoxP. Cette enzyme peut donc être utilisée chez la souris à condition qu'elle soit exprimée dans le noyau des cellules. C'est pourquoi un peptide signal de localisation nucléaire eucaryote a été inclus dans sa séquence.

De plus, les séquences des sites LoxP sont absentes des génomes eucaryotes ^{Nagy, 2000}. La recombinase Cre peut donc être exprimée dans les cellules eucaryotes sans risque de recombinaison intra- ou inter-chromosomiques.

I.3.3.2. Obtention d'une souris knockout conditionnelle

L'inactivation conditionnelle d'un gène peut être réalisée à l'aide du système de recombinaison Cre-loxP. L'insertion de sites loxP dans des introns bordant la grille de lecture du gène (allèle "floxé") ne modifie normalement pas son expression. Cependant, le croisement des animaux porteurs d'un allèle "floxé" avec des souris transgéniques exprimant Cre permet l'excision du fragment "floxé" dans les cellules où Cre est exprimée (Figure 20).



Figure 20. Le croisement d'une souris portant un allèle "floxé" avec une souris transgénique exprimant Cre permet d'obtenir une souris dont le fragment "floxé" a été excisé dans les cellules où Cre est exprimée. Cre peut être ubiquiste (Cre deleter) ou bien, spécifique d'un tissu ou encore, inductible (ex : par le Tamoxifène).

I.4. Objectif du mémoire

L'étude des souris double mutantes *Mage-b1/Mage-b2* n'a révélé aucun phénotype anormal. Etant donné la présence d'un gène *Mage-b3* intact chez ces animaux, il est possible que l'effet des mutations *Mage-b1* et *Mage-b2* soit compensé par l'activité de *Mage-b3*. En effet, malgré sa structure de rétrogène, *Mage-b3* a une ORF qui spécifie une protéine très semblable à celle encodée par *Mage-b1* et *Mage-b2* et, il est transcrit en ARN suivant un profil qui englobe celui de *Mage-b1* et de *Mage-b2* dans la lignée germinale mâle. Il est donc utile de produire des souris knock-out pour *Mage-b3* afin d'obtenir, par croisement avec des souris double knock-out *Mage-b1*, une lignée de souris « triple mutantes » déficientes en protéine Mage-b3 en utilisant le système Cre/LoxP.

Résultats et discussion

L'étude du phénotype des souris double mutantes *Mage-b1/Mage-b2* n'a rien révélé d'anormal à part, peut être, un nombre de spermatozoïdes plus bas par rapport aux souris sauvages.

Cela pourrait s'expliquer par la présence du gène *Mage-b3*, intact, dont l'activité compenserait l'effet des mutations de *Mage-b1* et de *Mage-b2*. Nous voulions, dès lors, inactiver ce gène chez la souris afin d'obtenir, par croisement avec des souris double mutantes *Mage-b1/Mage-b2*, une souris déficiente en protéine Mage-b, et ainsi révéler le rôle de cette protéine.

II.1. <u>Stratégie élaborée afin de générer des souris déficientes</u> <u>en Mage-b3</u>

Nous disposions, au début de ce travail, d'un plasmide (pMB3.18) dérivé du vecteur pTZ19R et contenant un fragment de 18 Kb d'ADN génomique de souris 129/Ola, renfermant *Mage-b3* (figure 22). Ce fragment d'ADN provient d'une bibliothèque génomique de souris (digestion partielle par Sau3A), cloné dans le vecteur de remplacement, λ EMBL3.

D'autre part, nous possédions une cassette, que nous appellerons « néolox », constituée d'un gène de résistance à la néomycine (*Neo*) sous la dépendance du promoteur du gène Pgk (phosphoglucokinase) conférant, aux cellules mammaliennes, une résistance à la néomycine. Ce gène *Neo* s'exprime aussi chez Escherichia coli (grâce à son promoteur originel bactérien (Tn5)) à qui il confère une résistance à la kanamycine (F. Stewart, communication personnelle). Le gène *Neo* est flanqué de deux sites LoxP (figure 21).



Figure 21. Schéma représentant la cassette "néolox". Neo est sous la dépendance des promoteurs des gènes PGK (eucaryote) et Tn5 (E.coli). Deux sites LoxP bordent la cassette. Les oligonucléotides, utilisés pour amplifier la cassette et pour cribler les bactéries, sont indiqués en vert.



26

Stratégie utilisée pour obtenir des souris déficientes en Mage-b3 :

1) Construire un vecteur d'inactivation conditionnelle de Mage-b3.

Afin de permettre la recombinaison homologue dans les cellules ES, le vecteur doit contenir de grands fragments d'ADN, appelés "bras d'homologie".

Nous avons choisi un grand bras d'homologie en amont (5') de Mage-b3, et un bras plus court en aval (3') du gène. Le petit bras doit avoir une taille suffisamment petite pour permettre son amplification par PCR lors de l'étape de criblage des clones de cellules ES. Le site LoxP 5' sera inséré dans le site BstBI situé à 1,6 Kb en amont de *Mage-b3*, en espérant que cette petite insertion ne perturbera pas l'expression normale du gène. La cassette "néolox" sera insérée dans le site MluI situé à 135 pb en aval de *Mage-b3*. Cette cassette sera ensuite recombinée par Cre dans les cellules ES afin d'obtenir un allèle conditionnel le plus « propre » possible (figure 24).

- 2) Introduire le vecteur d'inactivation, linéarisé, dans des cellules ES. Cette étape sera réalisée par électroporation.
- 3) Sélectionner les colonies résistantes à la néomycine.
- 4) Cribler les colonies Neo^R par PCR afin d'identifier les clones ayant subit une recombinaison homologue (Figure 23).



Figure 23. Amorces utilisées pour cribler les colonies Neo^R par PCR.

- 5) Vérifier, par PCR, la présence du site LoxP en 5'.
- 6) Vérifier qu'il n'y a pas eu de réarrangement du locus par Southern Blot.
- Vérifier qu'il n'y a pas une copie supplémentaire du vecteur d'inactivation, intégrée ailleurs dans le génome.
- 8) Vérifier que le caryotype des cellules ES comporte bien les 20 chromosomes.
- 9) Injecter les cellules ES modifiées dans un blastocyste de souris sauvages ou les agréger avec des morules au stade 8-16 cellules. Réimplanter les embryons chimériques dans l'utérus d'une « mère porteuse ».
- 10) Croisement des mâles chimériques obtenus avec des femelles sauvages.
- 11) Croisement des individus hétérozygotes entre eux afin d'obtenir des animaux homozygotes pour la mutation.

- 12) Croisement de ces animaux homozygotes pour la mutation avec des souris transgéniques Cre de façon à obtenir des souris hétérozygotes pour la mutation nulle.
- 13) Croisement des individus hétérozygotes pour la mutation nulle entre eux pour générer des souris homozygotes nulles.



Figure 24. A. Schéma du vecteur d'inactivation de *Mage-b3*. Un grand bras d'homologie se trouve du côté 5' du gène et un petit bras, du côté 3'. Un site LoxP est intégré en amont du gène. La cassette "néolox" est insérée en aval du gène. Les oligonucléotides utilisés, au cours de ce mémoire sont indiqués en vert. Les flèchent indiquent le sens de transcription de *Mage-b3* et de *Neo*. B. Fragment d'ADN génomique de souris contenu dans pMB3.18. Après digestion partielle, par Sau3A, de la bibliothèque génomique de souris et clonage dans le site BamHI du vecteur de remplacement, λEMBL3, une restriction par SalI a permis d'obtenir le fragment d'intérêt. Celui-ci est cloné dans le site SalI de pMB3.18.

II.2. Résultats

Durant ce mémoire, nous avons réalisé la construction du vecteur d'inactivation du gène *Mage-b3*.

II.2.1. Insertion du site LoxP en amont du gène Mage-b3

Nous avons digéré le pMB3.18 par l'enzyme de restriction *Bst*BI afin de linéariser le plasmide. Celui-ci a ensuite été déphosphorylé par la phosphatase alcaline intestinale de veau (CIP) de manière à éviter qu'il ne se referme sur lui-même (figure 25).

Parallèlement, nous avons amplifié par PCR, la cassette "néolox" en utilisant les amorces, néolox 327 et néolox 2153 dont la séquence possède un site *Cla*I. La digestion par *Cla*I de ce produit PCR libère des extrémités cohésives qui pourront être liguées avec le pMB3.18. linéarisé par *Bst*BI (figure 27). Le produit PCR a été analysé par électrophorèse en gel d'agarose (figure 26).



Figure 25. Photographie après électrophorèse en gel d'agarose du pMB3.18 digéré par *Bst*BI et déphosphorylé. La seconde piste montre du pMB3.18 non linéarisé. $\lambda/HindIII =$ marqueur de poids moléculaire.



Figure 26. Photographie après électrophorèse en gel d'agarose de la cassette "néolox" amplifiée par PCR avec les oligonucléotides néolox 327 et néolox 2153 contenant la séquence du site *Cla*I. Le contrôle négatif est réalisé sur de l'eau. 1Kb = marqueur de poids moléculaire.



Figure 27. Schéma récapitulant les différentes étapes, au niveau de l'ADN, de la construction du vecteur d'inactivation de *Mage-b3*.

Le produit PCR a été digéré par l'enzyme de restriction *Cla*I. Nous avons contrôlé le clivage par électrophorèse en gel d'agarose (figure 28).



Figure 28. Photographie après électrophorèse en gel d'agarose de la cassette "néolox" amplifiée par PCR avec les oligonucléotides néolox 327 et néolox 2153 contenant la séquence du site *Cla*I, et digérée par *Cla*I. 1Kb = marqueur de poids moléculaire.

Nous avons ligué le vecteur, pMB3.18, linéarisé par *Bst*BI et déphosphorylé, avec la cassette "néolox" possédant des extrémités *Cla*I. Le produit de ligation a servi à électroporer des bactéries électrocompétentes, "Gene Hogs one shot". Nous avons étalé ces bactéries sur du LB-Agar contenant de la kanamycine afin de sélectionner celles qui contenaient la cassette "néolox". Seules les bactéries, ayant incorporé la cassette dans leur ADN, sont capables de pousser sur ce milieux.

Pour vérifier que les clones Kan^R (pMB3.18-néolox) contenaient bien le plasmide attendu et pour connaître l'orientation de la cassette "néolox", nous avons criblé douze colonies Kan^R par PCR avec une amorce spécifique de la cassette, néolox 810 ou néolox 1692 (figure 21), et une amorce s'hybridant sur l'ADN du pMB3.18, B3-8909 (figure 24). Les produits PCR ont été déposés sur gel d'agarose. Six clones ont inséré la cassette "néolox" : les clones pMB3.18-néolox-4, -9 et -10 ont "néolox" en « SENS » ; les clones pMB3.18-néolox-1, -11 et -12 ont "néolox" en « ANTI-SENS » (figure 29).

Nous avons préparé de l'ADN à partir de ces six clones et l'avons digéré par *Hind*III. Après électrophorèse en gel d'agarose, nous avons analysé le profil de restriction *Hind*III de chaque clone. La taille du plus grand fragment obtenu pour les clones pMB3.18-néolox-1, -9, -10,

-11 et -12, est augmentée de 1834 pb par rapport à celle de pMB3.18 (figure 30). Cela indique que ces clones ont bien intégré la cassette néolox (figure 31).



Figure 29. Photographie après électrophorèse en gel d'agarose des produits PCR. Les clones pMB3.18-néolox-4, -9 et -10 ont inséré la cassette "néolox" dans la même orientation que *Mage-b3*; les clones pMB3.18-néolox-1, -11 et -12 ont "néolox" dans l'orientation inverse. 1Kb = marqueur de poids moléculaire.



Figure 30. Représentation schématique du fragment de restriction *Hind*III dont la taille varie de 1834 pb en fonction de la présence ou non de la cassette "néolox". En présence de la cassette "néolox", la taille du fragment obtenu après digestion par *Hind*III, est de 8974 pb (au-dessus). Lorsque la cassette n'est pas insérée, ce fragment mesure 7140 pb (en-dessous).



Figure 31. Photographie après électrophorèse en gel d'agarose comparant les profils de restriction par *Hind*III de pMB3.18 et des différents clones pMB3.18-néolox. 1Kb = marqueur de poids moléculaire.

Afin de vérifier l'intégrité de la construction, nous avons réalisé, sur l'ADN de chaque clone pMB3.18-néolox, une série de PCR avec différents couples de primers (figure 24 et table 1). Les produits PCR ont été déposés sur gel d'agarose. Le couple d'oligonucléotides 1 n'a rien amplifié car la distance entre eux est trop importante. Les couples 5 et 6 permettent d'orienter la cassette néolox. Le couple 5 amplifie la cassette "néolox" si elle est positionnée en « sens » par rapport à *Mage-b3*, et le couple 6, si elle est en « anti-sens ». L'ADN des clones pMB3.18-néolox-1 et -11 sont amplifiés par le couple de primers 5 tandis que le couple 6 amplifie les clones pMB3.18-néolox -4, -9, -10 et -12 (table1).

	Primer	Primer	Taille	Taille
	# SONG W	" anti-sons »	Attendue (Kb)	Observée
	« sens »	« anti-sens //	Attenute (Kb)	Observee
				(Kb)
1	R	CD02	4,627	0
2	B3.1582	B3.3977	2,414	~ 2,5
3	B3.3912	B3.24948	1,207	~ 1
4	B3.24379	B3.5945	1,433	~ 1.5
	- Additional of the Additional Traditional Additional Additional			
5	néolox 810	B3.9110	0.655	~ 0.6
c .			.,	
6	néolox 1692	B3.9110	0.568	~ 0.5
v	neoron 1092	25.5110	0,000	0,0
7	B3 8000	B3 10772	1 802	~ 2
/	D3.0909	D5.10772	1,002	14 <u>Z</u>
0	D2 10556	D2 12020	2 202	2
8	B3.10556	B3.12839	2,302	~ 2
9	B3.12267	B3.15200	2,952	~ 3
10	B3.14982	F	0,4	$\sim 0,4$

9	hI	P	
1 4		•	

Les différents couples de primers utilisés dans les PCR sur l'ADN des clones pMB3.18-néolox et les tailles, attendues et observées, des fragments, en Kb.

Nous voulions éliminer le gène *Neo*, floxé, par recombinaison Cre-dépendante dans des bactéries qui expriment Cre. Nous avons utilisé une souche d'E.coli (Gene Hogs / p705Cre) qui contient le plasmide p705Cre permettant de réaliser une expression transitoire de Cre. Ce plasmide est pourvu d'une origine de réplication thermo-sensible qui permet la réplication à 30°C, mais pas à 37°C. Il contient aussi un gène de résistance au chloramphénicol, et le gène *Cre* placé sous la dépendance d'un promoteur thermo-inductible, CI857.

Nous avons électroporé ces bactéries avec l'ADN des clones pMB3.18-néolox-1 et pMB3.18néolox-10. Les bactéries transformées ont été étalées sur des boîtes LB-agar contenant de l'ampicilline et du chloramphénicol, et incubées à 30°C de façon à ce que Cre s'exprime. Nous avons obtenu plusieurs colonies isolées que nous avons repiquées, parallèlement, sur des boîtes LB-agar contenant de l'ampicilline et sur des boîtes LB-agar contenant de la kanamycine. Après incubation à 37°C, les clones ayant perdu le gène *Neo* par recombinaison ne poussaient pas sur les boîtes contenant de la kanamycine. Nous avons préparé de l'ADN à partir de 5 clones Kan^S (pMB3.18-LoxP) provenant des clones pMB3.18-néolox-1 et pMB3.18-néolox-10 (figure 27). Nous avons confirmé l'excision du gène *Neo* par digestion *Hind*III et analysé en gel d'agarose. La recombinaison médiée par Cre est visualisée par une diminution de taille, de 1834 pb, du fragment le plus grand (figure 32).



Figure 32. Photographie après électrophorèse en gel d'agarose comparant les profils de restriction par *Hind*III de pMB3.18 et pMB3.18-néolox/HindIII avec ceux des différents clones pMB3.18-LoxP. Chaque clone pMB3.18-LoxP présente un fragment plus grand, indiquant que Cre a bien catalysé la recombinaison entre les 2 sites loxP. 1Kb = marqueur de poids moléculaire.

Nous nous sommes focalisés sur les clones pMB3.18-LoxP-1-4 et pMB3.18-LoxP-10-4 dont nous avons préparé de l'ADN. Cet ADN contient, à la fin de cette première étape, un site LoxP inséré à 1,6 Kb en amont de *Mage-b3*.

II.2.2. Insertion de la cassette néolox en aval de Mage-b3

La cassette néolox doit être insérée en aval de Mage-b3 et orientée dans le même sens que le premier site LoxP.

Nous avons digéré l'ADN de pMB3.18-LoxP-1-4 et de pMB3.18-LoxP-10-4 par *Mlu*I et puis, nous les avons traités à la CIP (figure 33).



Figure 33. Photographie après électrophorèse en gel d'agarose. Les clones pMB3.18-LoxP-1-4 et -10-4 sont digérés par *MluI* et déphosphorylés. λ /HindII = marqueur de poids moléculaire.

Parallèlement, nous avons amplifié, par PCR, la cassette "néolox" en utilisant les amorces, néolox 327 et néolox 2153 dont les séquence contiennent chacune le site *MluI*. L'amplification a été vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose (figure 34). Après avoir digéré le produit PCR par *MluI*, nous l'avons purifié sur une colonne Wizard (figure 35).



Figure 34. Photographie après électrophorèse en gel d'agarose de la cassette "néolox" amplifiée par PCR avec les oligonucléotides néolox 327 et néolox 2153 contenant la séquence du site *MluI*. Le contrôle est réalisé sur de l'eau.

1Kb = marqueur de poids moléculaire.



Figure 35. Cassette "néolox-*Mlu*I" purifiée sur colonne Wizard.

Nous avons continué la suite des manipulations sur le clone pMB3.18-LoxP-10-4. Nous voulions, à ce stade, insérer une cassette "néolox" dont le gène *Neo* aurait la même orientation que *Mage-b3*.

Nous avons ligué le vecteur pMB3.18-LoxP-10-4, linéarisé par *Mlu*I et déphosphorylé, avec la cassette "néolox" possédant des extrémités *Mlu*I.

Le produit de ligation a ensuite servi à transformer des bactéries, Gene Hogs, électrocompétentes. Nous avons étalé ces bactéries sur des boîtes de culture contenant du LB-Agar contenant de la kanamycine.

Afin de vérifier que les clones obtenus possédaient bien la cassette "néolox", nous avons réalisé des PCR sur 24 colonies Kan^R (pMB3.18-LoxP-néolox). Nous avons utilisé l'amorce néolox 810, spécifique de la cassette, et l'amorce B3.12267, s'hybridant sur l'ADN du vecteur pMB3.18-LoxP-néolox (figure 27).

Les produits PCR ont été déposés sur gel d'agarose. De manière étonnante, toutes les colonies testées avaient inséré la cassette "néolox" dans l'orientation voulue (figure 36).



Figure 36. Photographie après électrophorèse en gel d'agarose des produits PCR obtenus par amplifications de pMB3.18-LoxP-néolox avec les amorces néolox 810 et B3.12267. Le contrôle est réalisé avec de l'eau. 1Kb et 100bp = marqueurs de poids moléculaire.

Nous avons préparé de l'ADN à partir de clones (pMB3.18-LoxP-néolox-5,-6 et -7) et réalisé une série de PCR avec différents couples de primers (figure 24 et table 3). Ces PCR étaient destinées à vérifier l'intégrité de la construction (figure 37 et table 3).

Ta	ble	3.

	Primer « sens »	Primer « anti-sens »	Taille (Kb)		Primer « sens »	Primer « anti-sens »	Taille (Kb)
1	R	CD02	4,7	7	B3.8909	B3.10772	1,8
2	B3.1582	B3.3977	2 ,4	8	B3.10556	B3.12839	2,3+1,8
3	B3.3912	B3.24948	1,2	9	néolox 1692	B3. 12839	0,98
4	B3.24379	B3.5945	1,4	10	B3.12267	B3.15.200	2,9+1,8
5	B3. 5856	B3.7930	2,0	11	B3.14982	F	0,4
6	B3.7859	B3.9110	1,25				

Les différents couples de primers utilisés dans les PCR sur l'ADN des clones pMB3.18-néolox-5, -6 et-7 et la taille attendue, en Kb, des fragments.



Figure 37. Photographie après électrophorèse en gel d'agarose des produits PCR. Onze couples d'amorces, numérotés de 1 à 11 ont été utilisés pour réaliser les PCR sur l'ADN des clones pMB3.18-LoxP-néolox-5, -6 et -7. Afin de vérifier le caractère fonctionnel des sites LoxP, nous avons, électroporé les bactéries électrocompétentes, Gene Hogs / p705 Cre avec l' ADN des clones pMB3.18-LoxP-néolox-5, pMB3.18-LoxP-néolox-6 et pMB3.18-LoxP-néolox-7.

Nous avons repiqué 32 colonies Amp^R isolées, obtenues pour chaque clone pMB3.18-LoxPnéolox-5, -6 et - 7, parallèlement, sur des boîtes LB-agar contenant de la kanamycine. Les sites LoxP sont probablement fonctionnels car les bactéries ne poussent pas en présence de kanamycine.

Pour vérifier la délétion induite par Cre dans ces clones, nous avons préparé de l'ADN à partir de 6 clones Kan^S et nous avons effectué des PCR avec les primers B3.8909 et B3.12839. Les sites LoxP sont fonctionnels car il y a eu amplification d'un fragment de 620 pb (figure 38). Sans la recombinaison catalysée par Cre entre les deux sites loxP, aucune amplification n'aurait été possible car le fragment aurait été trop grand (5764 pb).



Figure 38. Photographie après électrophorèse en gel d'agarose des produits PCR. La fonctionnalité des sites LoxP est vérifiée par l'amplification d'un fragment de 620 pb par les amorces B3.8909 et B3.12839.

II.3. Discussion

Le premier gène *Mage* de type I (cancer-testicules) a été découvert en 1991, et depuis cette date, des dizaines de gènes de cette famille ont été identifiés chez l'homme, la souris et d'autres mammifères. Ces gènes sont principalement localisés sur le chromosome X, ils ne sont exprimés que dans les cellules de la lignée germinales mâle (certains sont aussi exprimés dans le placenta). Ces gènes semblent être apparus chez les mammifères car on n'en trouve pas dans le génome des vertébrés non mammaliens tels que les poissons, les oiseaux et les amphibiens. On ne connaît rien de la fonction des protéines spécifiées par ces gènes et elles ne comportent aucun motif particulier. Cependant, comme elles sont exprimées spécifiquement et de manière régulée à certains stades de la spermatogenèse, on peut supposer qu'elles jouent un rôle dans ce processus.

Le génome de la souris comporte 3 gènes spécifiant des protéines Mage-b : Mage-b1 et -b2 sont situés en tandem sur le chromosome X et encodent la même protéine, alors que Mage-b3 encode une protéine très proche (319 aa identiques sur 330) ^{De Backer et al., 1995}. Ces 3 gènes sont exprimés spécifiquement dans les spermatides ^{Clotman et al., 2000}. La séquence de Mage-b3 indique que ce gène est une copie rétroposée de Mage-b2. Le fait qu'en dépit de sa rétroposition, Mage-b3 soit exprimé selon un profil d'expression très spécifique et semblable à celui de Mage-b1 et de Mage-b2 dans le testicule est intrigant. Ceci peut s'expliquer que de deux façons non exclusives : soit la partie transcrite comporte les éléments de régulation nécessaires à la spécificité d'expression, soit le locus dans lequel s'est inséré Mage-b3 permet son expression et la spécificité de celle-ci. Cette question reste ouverte.

Dans le but de dévoiler la fonction des protéines Mage-b, des souris knock-out pour Mage-b1 et Mage-b2 ont été obtenues par inactivation séquentielle des deux gènes dans des cellules ES. Ces souris sont normales, fertiles, et ont une spermatogenèse normale en dehors d'une possible réduction du nombre de spermatozoïdes produits. Plusieurs faits suggèrent que, malgré qu'il soit un rétrogène, Mage-b3 soit fonctionnel et pourrait même être le plus important des 3 gènes Mage-b : (1) sa grille de lecture est conservée et spécifie une protéine très semblable à celles encodées par Mage-b1/b2 ; (2) il est transcrit à un niveau plus important que Mage-b1/b2; (3) il est exprimé dans les mêmes cellules que Mage-b1/b2. Emerson et al. (2004) ont récemment étudié le phénomène de rétroposition à l'échelle globale du génome. Ils ont calculé que le phénomène de rétroposition était responsable d'environ 10.000 événements de duplication dans le génome humain, dont environ 10% ont généré des rétrogènes fonctionnels. Les gènes « parentaux » résident préférentiellement sur le chromosome X (plutôt que sur les autosomes)^{Emerson et al., 2004}. Ce biais en faveur du X pourrait être lié à l'inactivation du X au cours de la méiose mâle, qui provoque un « silencing » de nombreux gènes du X. Ce processus pourrait pousser le X à exporter des rétrogènes fonctionnels sur les autosomes. Un tel scénario pourrait expliquer l'origine de Mage-b3. Dans ce cas, on pourrait s'attendre à observer un dysfonctionnement de la spermatogenèse chez les souris avec une délétion de Mage-b3.

Bien que rien ne soit connu de la fonction des Mage de type I, plusieurs études montrent que la protéine Mage-d1 (type II), est impliquée dans le contrôle de l'apoptose à différents niveaux, y compris en modulant la stabilité des protéines anti-apoptotiques de la famille IAP Jordan *et al.*, 2001. Dans le testicule, le site majeur d'apoptose est le compartiment des spermatogonies. Les protéines Mage-a qui sont exprimées dans ces cellules pourraient donc

réguler l'apoptose à ce niveau. Les Mage-b sont exprimées dans les spermatides. Ces cellules ne subissent pas d'apoptose au sens strict, mais leur maturation (la spermiogenèse) implique l'élimination de petites masses de cytoplasme du côté caudal (les « corps résiduels »). Les mécanismes responsables de la formation des corps résiduels sont très semblables à ceux de l'apoptose et sont assimilables à une apoptose limitée à un compartiment cytoplasmique limité ^{Blanco-Rodrigez et Martinez-Garcia, 1999}. On peut donc imaginer que les Mage-b jouent un rôle dans ce processus. L'obtention et l'étude de souris, dépourvues de protéines, Mage-b devraient permettre d'examiner cette hypothèse.

Matériel et méthodes

III.1. Matériel

III.1.1. Souches et plasmides

III.1.1.1. Souche bactérienne

- GeneHogs one shot électrocompétentes (Invitrogen)

<u>Génotype</u>: F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galU galK λ rpsL(Str^R) nupG

Cette souche est dérivée de la souche de *Escherichia coli DH10B*TM. Elle est utilisée pour l'amplification d'un plasmide ou d'un produit de ligation de grande taille. L'introduction de cet ADN circulaire s'effectue suivant la technique dite de transformation bactérienne.

III.1.1.2. Plasmides

- pMB3.18

Ce plasmide est constitué d'un fragment d'ADN génomique de souris 129/Ola de 18 Kb contenant le gène d'intérêt, *Mage-b3*, cloné dans le site SalI du vecteur pTZ19R. Ce fragment d'ADN provient d'une bibliothèque génomique de souris (digestion partielle par Sau3A), cloné dans le vecteur de remplacement, λ EMBL3.

- p705-Cre

Ce plasmide permet l'expression de la recombinase Cre. Il est transformé dans une souche de *E.coli*, contenant un plasmide, porteur d'un marqueur de sélection floxé (ex. : gène de résistance PGK-neo).

L'expression de Cre est induite par le promoteur cI578, thermosensible. Elle est réprimée à 30°C et induite entre 37 et 42°C.

Ce plasmide porte un gène de résistance au chloramphénicol.

- Cassette "néolox"

Cette cassette est constituée d'un gène de résistance à la néomycine (*Neo*) sous la dépendance du promoteur du gène *Pgk* (phosphoglucokinase) conférant, aux cellules mammaliennes, une résistance à la néomycine et du promoteur bactérien (Tn5) grâce auquel il confère une résistance à la kanamycine à Escherichia coli. Le gène *Neo* est flanqué de deux sites LoxP reconnus par la recombinase Cre. Cette cassette nous a été fournie par F.Stewart.

III.1.2. Milieux de culture

	Forme liquide	Forme solide
LB (Difco)	10 g	10 g
Agar	_	8 g
H ₂ O milliQ	500 ml	500 ml

- Milieu Luria Bertani (LB) : Milieu riche pour E. coli

Après leur préparation, tous les milieux de culture sont à autoclaver ($120^{\circ}C$ pendant 20 min). Laisser refroidir, en évitant la solidification, et ajouter éventuellement 500 μ l d'un antibiotique 100 mg/ml. Couler le milieu solide dans des boîtes de pétri.

III.1.3. Tampons et Solutions

-	Tampon TE 1x Tris HCl pH 8.0 EDTA	10 mM 1 mM
-	Tampon TAE 50x Tris-HCl pH 8,0 EDTA Acide acétique glacial Porter à un volume de 1000 ml avec de	40mM 50mM 57.1 ml l'eau distillée
-	Solution d'alourdisseur Xylène cyanol Ficoll Bleu de bromophénol ou méthyl orange	0,25 % 15% 0,25%
-	GTE Glucose Tris pH 8 EDTA	50 mM 25 mM 10 mM
-	NaOH / SDS NaOH SDS	0,2 N 1 %

-	KAC / HAc	
	KAc	6 ml
	Acide acétique glacial	1,15 ml
	H ₂ O	2,85 ml
-	Agarose 0,6 %	
	Agarose	3 g
	Tampon TAE 1x	500 ml

III.1.4. *Enzymes de restriction*

Les enzymes proviennent de chez New England Biolabs (NEB).

Enzyme	Site de restriction	Tampon
BstBI	TT / CGAA	4
ClaI	AT / CGAT	4
MluI	A / CGCGT	3

III.I.5. Oligonucléotides

Les oligonucéotides proviennent de chez Eurogentec.

Oligonucléotides	Séquences de 5' en 3'
CD02	GATATTTTGGGATGGAGTGAG
B3.1582	CTAGTTGTGACACTGGCCTT
B3.3912	GCCAGTCCTATACTTGGACT
B3.3977	CCGACCCAAGCAATTCTTGA
B3.24379	CCTGAGATACAGTGAGATC
B3.24948	GGATATAGGAGTGTTGGCTAG
B3.5869	ACCACCTAGGTCTACCTATG
B3.5945	AGTAAGTACATCACGACAGC
B3.7859	GGACTCAGGCTGTCTAAACT
B3.7930	AGATTTAGGAGTGACCTGGG
B3.8909	GGATGTCTGTAAGAGCTCAAG
B3.9110	TGCGGCCTGTGTTGTGATTT
B3.10556	ACACTGGTCTAGATAGCACT
B3.10772	GGAGCGGCTCTTACTCTTT
B3.12267	AATAGCCACTGCGTTCCCAG

Matériel et Méthodes

Oligonucléotides	Séquences de 5' en 3'
B3.12839	TCTGTGCTCGGTATACCATC
B3.14982	GCTCCATGGATATGATGATC
B3.15200	CAAGAGAGGCTTCCAGGAGA
R	TCACACAGGAAACAGCTATGAC
F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
Néolox 327 ClaI	CCTCATCGATTCCGTCAATAACTTCGT
	ATAGCATACA
Néolox 327 MluI	CCTCACGCGTACTCCGTCAATAACTTC
Néolox 2153 ClaI	CCTCTTATCGATAGCGTATAACTTCGT
	ATAATGTAT
Néolox 2153 MluI	TCTACGCGTCAGAGCGTATAACTTCGT
	ATAATGT
Néolox 810	GCGCTTTTGAAGCGTGCAGAAT
Neolox 1692	GCTATCAGGACATAGCGTTG

III.2. Méthodes

III.2.1. <u>Techniques relatives à l'utilisation d'ADN</u>

III.2.1.1. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Cette technique est utilisée pour amplifier rapidement un fragment d'ADN d'intérêt. Les séquences bordant le fragment doivent être connues pour pouvoir concevoir des amorces oligonucléotidiques (encore appelées primers). La matrice d'ADN est dénaturée par chauffage en présence d'un excès d'oligonucléotides et de dNTP's. Le mélange est ensuite soumis à une diminution de température (en fonction des amorces), qui permet l'hybridation spécifique des amorces. La séquence comprise entre les deux amorces est amplifiée par une ADN Polymérase thermorésistante (la *Taq* DNA Polymérase de Biotools) à une température optimale pour le fonctionnement de la polymérase. Le cycle de dénaturation/hybridation/élongation est répété 30 fois. Ce procédé fournit une amplification exponentielle.

Réactifs	Quantité
Tampon Taq DNA Polymérase 10X	5 µl
Mix dNTP's (5 mM pour chaque)	5 µl
Primer sens (10 µM)	5 µl
Primer antisens (10 µM)	5 µl
Taq DNA polymérase	1 µl
Template	$\sim 40 \text{ ng}$
Eau distillée et autoclavée	Porter à 50 µl

Programme :

- Dénaturation de 5 minutes à 94°C.
- 30 cycles d'amplification divisés en 3 étapes :
 - a. 30 secondes à 94°C pour dénaturer.
 - b. 30 secondes à X°C pour hybrider où X = Tm-10°C
 - c. Y minute(s) à 72°C pour l'élongation où Y = la taille (Kb) du fragment à amplifier.
- Elongation finale de 10 minutes à 72°C

La température de melting (Tm) des amorces est égale au quadruple de la somme des bases G et C additionné du double de la somme des bases A et T. En bref, Tm = 4(G+C) + 2(A+T). Ce calcul ne prend en compte que la partie s'hybridant au premier cycle de dénaturation et pas les ajouts de séquence exotique en 5'.

Remarquons que l'ADN génomique peut être remplacé par une culture bactérienne (PCR sur colonies) sans extraction d'ADN. Les bactéries sont alors lysées lors de la première étape de dénaturation à 94°C.

III.2.1.2. Électrophorèse en gel d'agarose

L'électrophorèse en gel d'agarose sépare les fragments d'ADN dans un champ électrique en fonction de leur taille. Le pourcentage d'agarose à utiliser sera inversement proportionnel aux tailles des fragments à séparer. La taille des fragments est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Nous utilisons les marqueurs de poids moléculaire λ /HindIII, 1Kb et 100bp de chez Invitrogen. La révélation d'ADN est réalisée grâce au bromure d'éthidium (BrEth), composé fluorescent qui rend la double hélice visible sous UVs en s'intercalant entre ses bases. La fluorescence d'un fragment d'ADN est proportionnelle à sa taille, ainsi qu'à la quantité d'ADN. En connaissant la quantité d'ADN des marqueurs de poids moléculiare, nous pouvons estimer la quantité d'ADN du fragment par comparaison des intensités de fluorescence.

Fabrication du gel :

- Prendre X ml d'agarose 0,6 % (en fonction de la taille du gel).
- Ajouter 1 µl de bromure d'éthidium 1%.
- Couler le gel dans un support adéquat muni d'un peigne délimitant les puits et laisser se solidifier.
- Charger les échantillons auxquels a été ajouté un sizième de solution d'alourdisseur, sans oublier de charger le marqueur moléculaire en parallèle (12μl/puits).

III.2.1.3. Restriction sur plasmide

- $2 \mu l$ de tampon 10X en fonction de l'enzyme.
- 1 unité d'enzyme de Restriction par μg d'ADN.

- X µl de plasmide,
- Porter à un volume final de 20 µl avec de l'eau distillée.
- Incuber une heure dans un bain-marie à 37°C

III.2.1.4. Déphosphorylation d'un plasmide linéarisé

- Ajouter 1 ml de CIP (NEB) au produit de restriction.
- Incuber 1 heure à 37°C.
- Ajouter 1µl d'EDTA 500mM.
- Incuber 10 minutes à 65°C.

III.2.1.5. Ligation d'un plasmide

La réaction est réalisée 2 heures à température ambiante (sur la paillasse) ou O/N à 14° C. Le volume final n'est jamais supérieur à 20 μ l. Le mélange de réaction contient :

- Vecteur et insert dans un rapport moléculaire 1/3.
- 2 μl de Tampon T4 DNA Ligase 10X (NEB).
- 1 µl de T4 DNA Ligase (NEB).
- Porter à 20 µl avec de l'eau.

III.2.1.6. Purification d'ADN sur colonne (Kit Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System)

Ce kit est prévu pour purifier des fragments d'ADN simple ou double brin de réactions PCR ou d'autres réactions enzymatiques. Le principe du Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System est basé sur la liaison sélective de l'ADN sur une membrane de silice en condition fortement salée. Les contaminants ne sont pas retenus sur la membrane et sont éliminés par lavage. L'ADN est, ensuite, élué en condition de faible salinité.

- Ajouter, au produit PCR, 1 volume de Membrane Binding Solution.
- Déposer le mélange sur la colonne et laisser 1 minute à RT.
- Centrifuger 1 minute à 14000 rpm.
- Laver avec 700 µl de Membrane Wash Solution.
- Centrifuger 1 minute à 14000 rpm.
- Laver avec 500 µl de Membrane Wash Solution.
- Centrifuger 5 minute à 14000 rpm.
- Transférer la colonne sur un nouveau tube.
- Eluer avec 20 µl de Nuclease Free Water.

III.2.1.7. Préparation d'ADN plasmidique

- Lancer une culture de bactéries de 5 ml de LB additionnée d'antibiotique(s) et incuber O/N à 37°C.

Matériel et Méthodes

- Centrifuger 10 minutes à 2500 rpm pour culoter les bactéries.
- Décanter.
- Resuspendre le culot dans 3,35 ml de GTE et laisser 10 minutes à RT.
- Ajouter 5 ml de NaOH/SDS et laisser 10 minutes à 4°C.
- Ajouter 4 ml de KAc/HAc et mélanger.
- Centrifuger 15 minutes à 2500 rpm et reprendre le surnageant.
- Ajouter 1 volume de phénol-CIAA et vortexer.
- Centrifuger 15 minutes à 2500 rpm et reprendre la phase aqueuse.
- Ajouter 2 volumes d'éthanol 100 % et laisser 10 minutes à température ambiante.
- Centrifuger 20 minutes à 5000 rpm et décanter.
- Ajouter de l'éthanol 70 % pour rincer le culot.
- Décanter et laisser sécher le culot.
- Reprendre le culot dans du TE.

III.2.1.8. Séquençage

Pour séquencer les fragments d'ADN, nous avons utilisé le kit ABI PRISM dye terminator de Perkin Elmer. La réaction de séquençage est basée sur le principe de Sanger (1977). Cette technique est basée sur la polymérisation d'un fragment d'ADN par PCR, à partir d'une amorce nucléotidique. Le mélange de réaction contient des déoxynucléotides et des didéoxynucléotides marqués à la fluorescéine. La présence de didéoxyribonucléotides arrête la polymérisation, ce qui permet d'obtenir une population de brins tronqués représentant la séquence d'ADN, chacun émettant à une longueur d'onde bien précise. Le produit de réaction de séquençage est mis sur gel de polyacrylamide: les brins tronqués de différentes tailles migrent dans le gel. Grâce aux quatre couleurs différentes, représentant chacune un nucléotide, le parcours du gel donne la séquence.

Protocole : kit Perkin Elmer

Le mélange de réaction est réalisé dans un tube de 100 µl :

- Entre 200 et 500 ng d'ADN (bicaténaire) à séquencer.
- 10 picomoles de primer.
- Ajouter 2 μl du mix de réaction (ABI PRISM) contenant les dNTP, les ddNTP, l'enzyme polymérase.
- Ajouter 6 µl de tampon Tris-HCl MgCl₂.
- Amener le volume final à 20 µl avec de l'eau distillée.

Cycles

- 1. Dénaturation de 1 minute à 96°C.
- 2. 25 cycles de :
 - a. 10 secondes à 96°C.
 - b. 10 secondes à 50°C.
 - c. 4 minutes à 60°C.
- 3. Maintenir à 4°C ou stocker à -20°C.

Matériel et Méthodes

III.2.2. <u>Techniques relatives à l'utilisation de bactéries</u>

III.2.2.1. Transformation bactérienne par choc électrique

La transformation bactérienne consiste à faire rentrer de l'ADN exogène (dans ce cas, un plasmide) dans une bactérie.

- Placer 50 µl de bactéries électrocompétentes dans un eppendorf sur glace.
- Une fois les bactéries décongelées, ajouter de 1 à 2 µl du plasmide.
- Transférer les bactéries dans une cuvette d'électroporation, préalablement refroidie sur glace.
- Choc électrique.
- Ajouter rapidement 250 µl de milieu LB liquide.
- Transférer la solution dans un tube de 15 ml.
- Incuber une heure, sous agitation, à 37°C.
- Etaler sur un milieu sélectif approprié et laisser pousser toute la nuit à 37°.

- Abremski, K. & Hoess, R. Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J Biol Chem* **259**, 1509-1514 (1984).
- Bertrand, M., Huijbers, I., Chomez, P. & De Backer, O. Comparative expression analysis of the MAGED genes during embryogenesis and brain development. *Dev Dyn* 230, 325-334 (2004).
- Bischof, J. M., Ekker, M. & Wevrick, R. A MAGE/NDN-like gene in zebrafish. *Dev Dyn* 228, 475-479 (2003).
- Blanco-Rodriguez J., Martinez-Garcia C. Apoptosis is physiological restricted to a specialized cytoplasmic compartment in rat spermatids. *Bio. Rep.***61**, 1541-1547 (1999).
- Blendy, J. A., Kaestner, K. H., Schmid, W., Gass, P. & Schutz, G. Targeting of the CREB gene leads to up-regulation of a novel CREB mRNA isoform. *Embo J* 15, 1098-1106 (1996).
- Chomez, P., De Backer, O., Bertrand, M., De Plaen, E., Boon, T. & Lucas, S. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res* **61**, 5544-5551 (2001).
- Clotman, F., De Backer, O., De Plaen, E., Boon, T. & Picard, J. Cell- and stage-specific expression of mage genes during mouse spermatogenesis. *Mamm Genome* 11, 696-699 (2000).
- De Backer, O., Verheyden, A. M., Martin, B., Godelaine, D., De Plaen, E., Brasseur, R., Avner, P. & Boon, T. Structure, chromosomal location, and expression pattern of three mouse genes homologous to the human MAGE genes. *Genomics* 28, 74-83 (1995).
- de Haan, J. B., Bladier, C., Griffiths, P., Kelner, M., O'Shea, R. D., Cheung, N. S., Bronson, R. T., Silvestro, M. J., Wild, S., Zheng, S. S., Beart, P. M., Hertzog, P. J. & Kola, I. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 273, 22528-22536 (1998).
- De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J. J., Szikora, J. P., De Smet, C., Brasseur, F., van der Bruggen, P., Lethe, B., Lurquin, C. & et al. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 40, 360-369 (1994).
- De Smet, C., Courtois, S. J., Faraoni, I., Lurquin, C., Szikora, J. P., De Backer, O. & Boon, T. Involvement of two Ets binding sites in the transcriptional activation of the MAGE1 gene. *Immunogenetics* **42**, 282-290 (1995).
- De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F. & Boon, T. The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7149-7153 (1996).

- De Smet, C., Lurquin, C., Lethe, B., Martelange, V. & Boon, T. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol* **19**, 7327-7335 (1999).
- Donehower, L. A., Harvey, M., Slagle, B. L., McArthur, M. J., Montgomery, C. A., Jr., Butel, J. S. & Bradley, A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-221 (1992).
- Emerson, J. J., Kaessmann, H., Betran, E. & Long, M. Extensive gene traffic on the mammalian X chromosome. *Science* 303, 537-540 (2004).
- Gilbert Scott F., *Spermatogenesis*, Developmental Biology, Scott F. Gilbert, p.628-631, Sinauer Associates Inc., 2003.
- Gerard, M., Hernandez, L., Wevrick, R. & Stewart, C. L. Disruption of the mouse necdin gene results in early post-natal lethality. *Nat Genet* 23, 199-202 (1999).
- Hoess, R. H. & Abremski, K. Interaction of the bacteriophage P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 1026-1029 (1984).
- 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 276, 39985-9 (2001).
- Lee, E. Y., Chang, C. Y., Hu, N., Wang, Y. C., Lai, C. C., Herrup, K., Lee, W. H. & Bradley, A. Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* 359, 288-294 (1992).
- Lucas, S., De Smet, C., Arden, K. C., Viars, C. S., Lethe, B., Lurquin, C. & Boon, T. Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis. *Cancer Res* **58**, 743-752 (1998).
- Lurquin, C., De Smet, C., Brasseur, F., Muscatelli, F., Martelange, V., De Plaen, E., Brasseur, R., Monaco, A. P. & Boon, T. Two members of the human MAGEB gene family located in Xp21.3 are expressed in tumors of various histological origins. *Genomics* 46, 397-408 (1997).
- Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., Tessier, M. H., Rankin, E., Parmiani, G., Arienti, F., Humblet, Y., Bourlond, A., Vanwijck, R., Lienard, D., Beauduin, M., Dietrich, P. Y., Russo, V., Kerger, J., Masucci, G., Jager, E., De Greve, J., Atzpodien, J., Brasseur, F., Coulie, P. G., van der Bruggen, P. & Boon, T. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 80, 219-230 (1999).
- Muscatelli, F., Abrous, D. N., Massacrier, A., Boccaccio, I., Le Moal, M., Cau, P. & Cremer, H. Disruption of the mouse Necdin gene results in hypothalamic and behavioral alterations reminiscent of the human Prader-Willi syndrome. *Hum Mol Genet* 9, 3101-3110 (2000).

- Nagy, A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* **26**, 99-109 (2000).
- Nasevicius, A. & Ekker, S. C. Effective targeted gene 'knockdown' in zebrafish. *Nat Genet* **26**, 216-220 (2000).
- Panthier J.J., Montagutelli X.et Guénet J.L., *La génétique de la souris*, J.J.Panthier, X.Montagutelli et J.L.Guénet, Belin, Paris,2003.

Robertson, K.D.DNA methylation and human disease. Nat Genet 6, 597-610 (2005).

- Salehi, A. H., Roux, P. P., Kubu, C. J., Zeindler, C., Bhakar, A., Tannis, L. L., Verdi, J. M. & Barker, P. A. NRAGE, a novel MAGE protein, interacts with the p75 neurotrophin receptor and facilitates nerve growth factor-dependent apoptosis. *Neuron* 27, 279-288 (2000).
- Salehi, A. H., Xanthoudakis, S. & Barker, P. A. NRAGE, a p75 neurotrophin receptorinteracting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 277, 48043-48050 (2002).
- Spermatigenesis Overview, Encyclopédia of Reproduction, Vol.4, p.539-545, Academy Press, 1999.
- Taniura, H., Matsumoto, K. & Yoshikawa, K. Physical and functional interactions of neuronal growth suppressor needin with p53. *J Biol Chem* **274**, 16242-16248 (1999).
- Taniura, H., Taniguchi, N., Hara, M. & Yoshikawa, K. Necdin, a postmitotic neuron-specific growth suppressor, interacts with viral transforming proteins and cellular transcription factor E2F1. J Biol Chem 273, 720-728 (1998).
- Thurner, B., Haendle, I., Roder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., von den Driesch, P., Brocker, E. B., Steinman, R. M., Enk, A., Kampgen, E. & Schuler, G. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 190, 1669-1678 (1999).
- Torres R.M. et R.Kühn R., *Laboratory Protocols for Conditionnal Gene Tagreting*, Oxford University Press, Oxford, 1997
- Tsai, T. F., Armstrong, D. & Beaudet, A. L. Necdin-deficient mice do not show lethality or the obesity and infertility of Prader-Willi syndrome. *Nat Genet* **22**, 15-16 (1999).
- Tymms M.J. et Kola I., Gene Knockout Protocols, Human Press, New Jersey, 2001
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A. & Boon, T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* **254**, 1643-1647 (1991).

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

24 AOUT 2005