



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Isolement par microdissection de marqueurs de la région reeler

Paternotte, Caroline

Award date:
1993

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

291193



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

**Isolement par microdissection de marqueurs
de la région *reeler*.**

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

PATERNOTTE Caroline

Décembre 1993

**Isolement par microdissection de marqueurs
de la région *reeler*.**

PATERNOTTE Caroline

Résumé

Reeler est une mutation autosomale récessive localisée dans la région centromérique du chromosome 5 de souris. Ce gène joue un rôle essentiel dans le développement du système nerveux central des mammifères. Pour mieux comprendre le mode d'action de *reeler*, dont le produit est inconnu, l'isolement du gène par clonage positionnel est en cours. Cette stratégie nécessite la recherche de marqueurs proches de *reeler*. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail.

Nous avons microdisséqué la région centromérique du chromosome 5. Les fragments récoltés ont été amplifiés, clonés et caractérisés. Parmi les clones obtenus, la sonde 121 a été cartographiée à moins de 1 cM de *reeler*. D'autres ont été localisés dans une région proche, mais n'ont pu faire l'objet d'une cartographie précise. Ces marqueurs sont donc utiles pour la suite du clonage positionnel du gène.

En parallèle, nous avons mis au point la technique d'hybridation fluorescente *in situ* qui nous a permis de démontrer la fiabilité de la microdissection.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)
Décembre 1993

Promoteur : Prof. J. VANDENHAUTE

Co-promoteur : Prof. A. M. GOFFINET

Je tiens à remercier le professeur Jean Vandenhoute qui a permis la réalisation de ce mémoire.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance au professeur André M. Goffinet pour m'avoir acceptée dans son laboratoire et pour avoir suivi mon travail.

Aucun mot ne pourrait décrire ma gratitude envers le docteur Thanh Huynh-Thu qui a eu la patience et le courage de m'enseigner une partie de son savoir. Cám ơn!

Je tiens à remercier les professeurs E. Depierreux, J. P. Descy, J. Remacle et R. Wattiaux pour avoir accepté de lire ce mémoire.

Un immense merci à Marie-Claire, Christiane, Danièle, Catherine et messieurs Becsei et Lannoy pour leur disponibilité, leur compétence et leur bonne humeur.

Comment remercier Emmanuelle, Isabelle et Inès pour leur aide si précieuse... à charge de revanche!

Un grand merci également à Tom, qui, de la poule aux galettes de riz soufflé, a contribué à faire de cette troisième licence une année "mémorable"...

Anche se siete rilegati in fine pagina, è chiaro che i miei ringraziamenti sono destinati per primo a voi, papà e mamma, Pholly e Zuzz per gli incoraggiamenti e l'aiuto che mi avete dato. Grazie.

Liste des abréviations

ADN	= acide désoxyribonucléique
B6	= lignée de souris C57B1/6
BM3C3	= lignée cellulaire hybride contenant le chromosome 5 de souris sur fond de hamster
C	= lignée de souris BALB/c
cM	= centimorgan
dNTPs	= 2'-déoxyribonucléotides 5'-triphosphates
<i>E. coli</i>	= <i>Escherichia coli</i> .
Kb	= kilobases
pb	= paire de base
pB SK-	= plasmide Bluescript SK-
PCR	= Réaction de Polymerisation en Chaîne
RFLP	= Polymorphisme de Longueur de Fragments de Restriction (Restriction Fragment Length Polymorphism)
rpm	= rotations par minute
SEG	= souche de souris <i>Musspretus</i>
SNC	= système nerveux central
Sp	= souche de souris <i>Musspretus</i>
TE	= Tampon Tris-EDTA
U. V.	= lumière ultra-violette
YAC	= Chromosome Artificiel de Levure (Yeast Artificial Chromosome)

Table des matières

Introduction

A. INTRODUCTION GENERALE.	
I. La mutation <i>reeler</i> .	p 1
II. Développement du système nerveux central.	p 2
III. L'évolution du cerveau et <i>reeler</i> .	p 3
IV. Objectifs du laboratoire.	p 4
V. Objectifs du mémoire.	p 7
B. MICRODISSECTION DE FRAGMENTS PROXIMAUX DU CHROMOSOME 5 ¹² .	
I. Principe.	p 7
II. Aspects techniques généraux.	p 9
II. 1. Culture de cellules porteuses de la translocation.	p 9
II. 2. Microdissection.	p 9
II. 3. Microdissection laser.	p 10
III. Amplification des produits de microdissection.	p 10
III. 1. Prétraitements.	p 10
III. 2. Amplification en chaîne (PCR).	p 11
III. 3. Klenow-kinase-ligase.	p 15
III. 4. Clonage.	p 16
III. 5. Récupération des inserts clonés.	p 16
III. 6. Polymorphisme.	p 16
C. HYBRIDATION FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> (FISH).	
I. Introduction.	p 17
II. Le FISH et ses utilisations.	p 18
III. Choix de la technique.	p 19
IV. Méthodes directes et indirectes.	p 19
IV. 1. les méthodes directes.	p 19
IV. 2. Les méthodes indirectes.	p 20
V. Hybridation d'acides nucléiques - Aspects généraux.	p 20
V. 1. Facteurs influençant l'hybridation.	p 21
V. 2. Autres variables influençant l'hybridation.	p 24
V. 3. Séquences répétées.	p 25
VI. Marquage d'acides nucléiques avec la biotine.	p 26
VII. Mécanisme de détection de l'hybridation.	p 27

Matériel et méthodes

A. TAMPONS, ENZYMES ET SOLUTIONS STOCKS.	p 28
B. CULTURE CELLULAIRE.	p 31
C. PREPARATION DE LAMES.	p 32
I. Préparation de caryotypes.	p 32
II. Coloration des lames.	p 33
D. MICRODISSECTION.	p 33
E. HYBRIDATION <i>IN SITU</i> .	p 35
F. NICK TRANSLATION.	p 38
G. PREPARATION D'ADN GENOMIQUE DE LEVURE.	p 39
H. PURIFICATION D'ACIDES NUCLEIQUES :	
EXTRACTION PAR PHENOL-CHLOROFORME.	p 40
I. DIGESTIONS ENZYMATIQUES.	p 41
J. ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE.	p 42
K. SOUTHERN BLOTTING ALCALIN.	p 44
I. Séparation des fragments de restriction d'ADN génomique par électrophorèse sur gel d'agarose.	p 44
II. Transfert de l'ADN sur membrane de nylon : Southern blotting alcalin.	p 45
L. TECHNIQUES D'HYBRIDATION A L'AIDE DE SONDES REDIOACTIVES.	p 46
I. Marquage redioactif d'une sonde.	p 48
II. Préhybridation des membranes.	p 49
III. Lavage des membranes.	p 50
IV. Autoradiographie des membranes.	p 50
V. Pour enlever la radioactivité d'une membrane Hybond-N ⁺ .	p 51
M. TECHNIQUE DE PCR.	p 51
N. KLENOW-KINASE-LIGASE.	p 57
O. RECUPERATION DES INSERTS CLONES.	p 58
P. TECHNIQUES D'ADN RECONBINANTS.	p 60
I. Souche bactérienne.	p 60
II. Le plasmide bactérien.	p 60
III. Principe du test blanc-bleu.	p 61
IV. Réaction de ligation.	p 62
V. Réaction de transformation par électroporation.	p 63

Résultats & discussion

A. MICRODISSECTION.	p 65
I. Introduction.	p 65
II. Microdissection du chromosome 5 ¹² .	p 66
II. 1. Introduction.	p 66
II. 2. Résultats.	p 67
III. Amplification de l'ADN microdisséqué par DOP-PCR.	p 68
III. 1. Introduction.	p 68
III. 2. Résultats.	p 69
IV. Hybridation des produits de microdissection.	p 71
IV. 1. Préparation de la sonde redioactive.	p 72
IV. 2. Préparation des membranes.	p 72
IV. 3. Résultats.	p 73
V. Conclusions et discussion.	p 73
B. HYBRIDATION FLUORESCENTE <i>IN SITU</i> .	
I. Introduction.	p 75
II. Amplification par DOP-PCR bioyinylée.	p 76
III. Analyse en FISH.	p 77
III. 1. Préparation de la sonde.	p 77
III. 2. Résultats.	p 77
IV. Conclusions et discussion.	p 79
C. CLONAGE DE L'ADN MICRODISSEQUE.	
I. Introduction.	p 80
II. Traitements de l'ADN avant le clonage.	p 81
III. Clonage de l'ADN microdisséqué.	p 81
III. 1. Introduction.	p 81
III. 2. Transformation des bactéries.	p 82
IV. Récupération des inserts clonés.	p 83
V. Sélection des inserts.	p 84
V. 1. Introduction.	p 84
V. 2. Marquage des inserts.	p 84
V. 3. Préparation des membranes.	p 85
V. 4. Résultats.	p 86
VI. Cartographie des inserts sélectionnés.	p 86
VI. 1. Introduction.	p 86
VI. 2. Recherche de polymorphysme de restriction.	p 88
VI. 3. Résultats.	p 88
VI. 4. Séquençage de l'insert 121.	p 90
VI. 5. Analyses futures.	p 90
VII. Conclusions et discussion.	p 91
Conclusion et perspectives.	p 93
Bibliographie.	

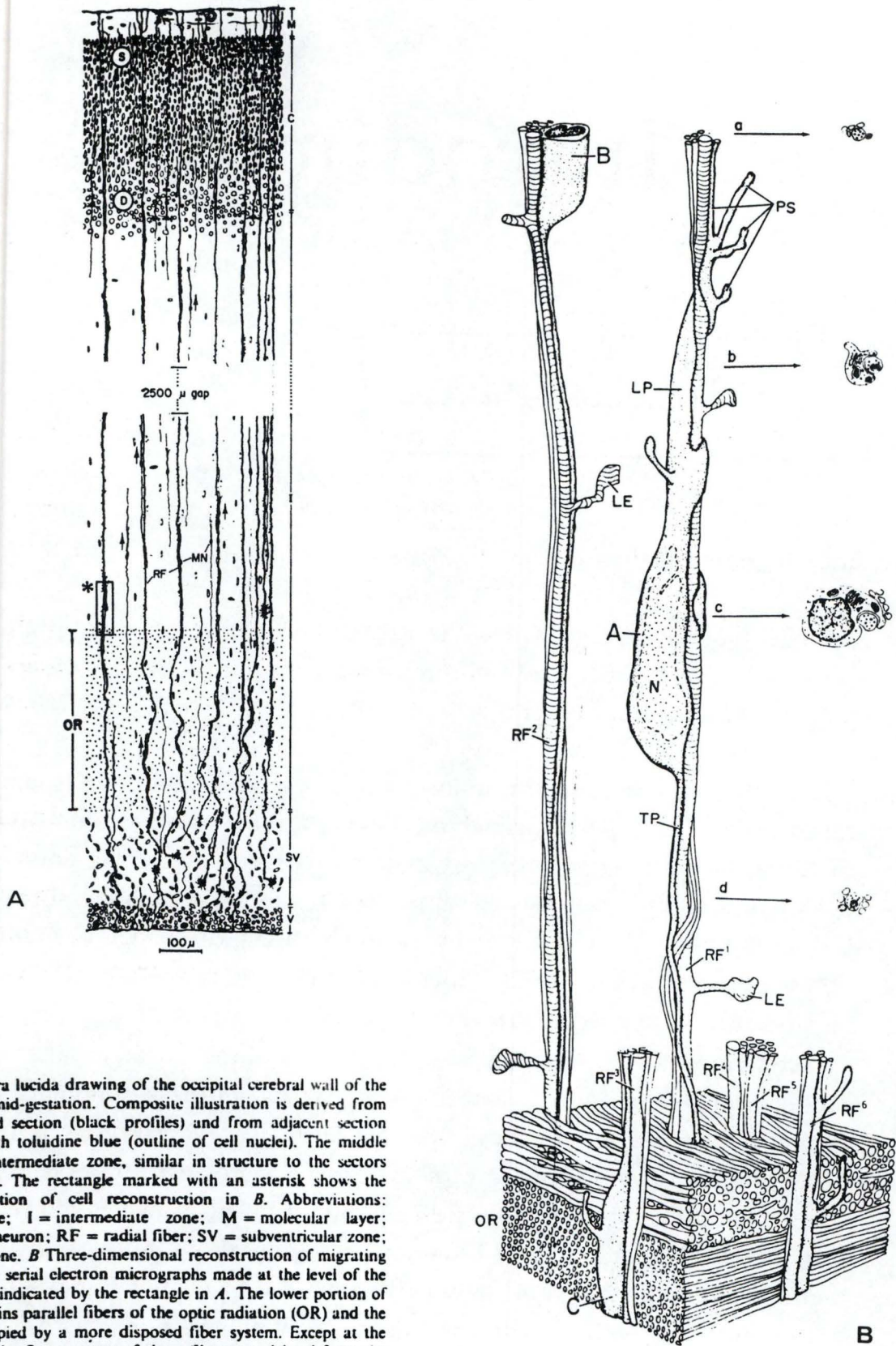
Introduction

A. INTRODUCTION GENERALE.

I. La mutation *reeler*.

Ce mémoire s'inscrit dans le cadre d'un projet de cartographie de l'extrémité centromérique du chromosome 5 de souris en vue de localiser puis de cloner le gène *reeler*.

Reeler est une mutation autosomale récessive isolée pour la première fois à Edimbourg par Falconer en 1948 (symbole *rl*) (Falconer, 1951) et cartographiée sur la région proximale du chromosome 5 de souris. Une deuxième mutation du gène est apparue en 1969 à Orléans (symbole *rl^{Orl}*). Les mutants *reeler* ont diverses malformations du SNC. Les animaux homozygotes peuvent être identifiés vers le 15^{ème} jour après la naissance par la présence d'une forte ataxie et de tremblements, leurs principales caractéristiques comportementales étant néanmoins normales. Les souris mutées pour ce gène sont caractérisées par de multiples anomalies dans l'agencement des cellules du système nerveux central (SNC). L'étude génétique du développement cérébral des vertébrés est intéressante vu la complexité du cerveau et le mystère entourant les mécanismes qui régissent son développement. Outre l'aspect fondamental de telles études, une meilleure compréhension des principes de base impliqués dans le développement cérébral est un prérequis pour une gestion plus efficace de problèmes médicaux tels que les malformations cérébrales ou les retards mentaux.



A Camera lucida drawing of the occipital cerebral wall of the monkey fetus at mid-gestation. Composite illustration is derived from Golgi impregnated section (black profiles) and from adjacent section counterstained with toluidine blue (outline of cell nuclei). The middle 2000 μm of the intermediate zone, similar in structure to the sectors drawn, is omitted. The rectangle marked with an asterisk shows the approximate position of cell reconstruction in **B**. Abbreviations: C = cortical plate; I = intermediate zone; M = molecular layer; MN = migrating neuron; RF = radial fiber; SV = subventricular zone; V = ventricular zone. **B** Three-dimensional reconstruction of migrating neurons, based on serial electron micrographs made at the level of the intermediate zone indicated by the rectangle in **A**. The lower portion of the diagram contains parallel fibers of the optic radiation (OR) and the remainder is occupied by a more disposed fiber system. Except at the lower portion of the figure, most of these fibers are deleted from the diagram to expose the radial fibers (striped vertical shafts RF₁₋₆) and their relations to the migrating cells A, B, and C. The soma of migrating cell A, with its nucleus (N) and voluminous leading process (LP), is situated within the reconstructed space, except for the terminal part of the attenuated trailing process and the tip of the vertical ascending pseudopodium. Cross sections of cell A in relation to the several vertical fibers in the fascicle are drawn at levels a through d at the right side of the figure. The perikaryon of cell B is cut off at the top of the reconstructed space, whereas the leading process of cell C is shown just penetrating between fibers of the optic radiation (OR) on its way across the intermediate zone. LE indicates lamellate expansions; PS indicates pseudopodia.

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

II. Développement du SNC et *reeler*.

Le SNC dérive de l'ectoderme embryonnaire. Celui-ci, via des inductions mésodermiques inconnues, forme la plaque neurale qui se transforme en gouttière neurale. En se refermant, cette dernière engendre le tube neural. Les cellules des crêtes neurales migrent dans le mésoderme et donnent naissance à certaines cellules endocrines et au système nerveux périphérique, tant somatique qu'autonome.

Toutes les cellules du SNC dérivent de la paroi du tube neural, et les ventricules cérébraux de sa cavité. Les neurones et les cellules gliales proviennent de précurseurs qui prolifèrent autour des ventricules primitifs, formant des zones à haute densité cellulaire et à haut indice mitotique (zones germinatives ou ventriculaires). Les cellules germinales se divisent selon un schéma bien défini : leur prolongement externe se raccourcit, puis disparaît ; à ce stade la cellule entre en mitose et donne deux cellules filles dont les prolongements se développent à nouveau en direction des méninges.

Vers le 13^{ème} jour de l'embryogenèse, après s'être divisés un certain nombre de fois, les neurones perdent leur capacité mitotique. Ils migrent alors depuis le lieu de leur dernière division, le long des prolongements des autres cellules germinales, vers l'endroit qu'ils occuperont dans le cerveau mature. Cette migration suit des motifs spatio-temporels précis, sous contrôle de facteurs encore inconnus (figure 1).

La mutation *reeler* affecte certains événements impliqués dans ces mouvements. Les cellules neuronales apparaissent normalement au cours de l'embryogenèse et leur migration de la zone ventriculaire vers leur région finale se fait correctement, de même que la différenciation et l'établissement de jonctions synaptiques après la migration. Néanmoins, les motifs architectoniques organisés en fin de migration sont anormaux chez les souris homozygotes récessives *rl/rl*. Ceci a pour effet un développement anarchique à différents niveaux du cerveau, et plus spécialement au niveau du cervelet qui, très atrophié, est à l'origine des troubles neurologiques observés. Dans le cervelet, les cellules de Purkinje sont mal agencées, ce qui

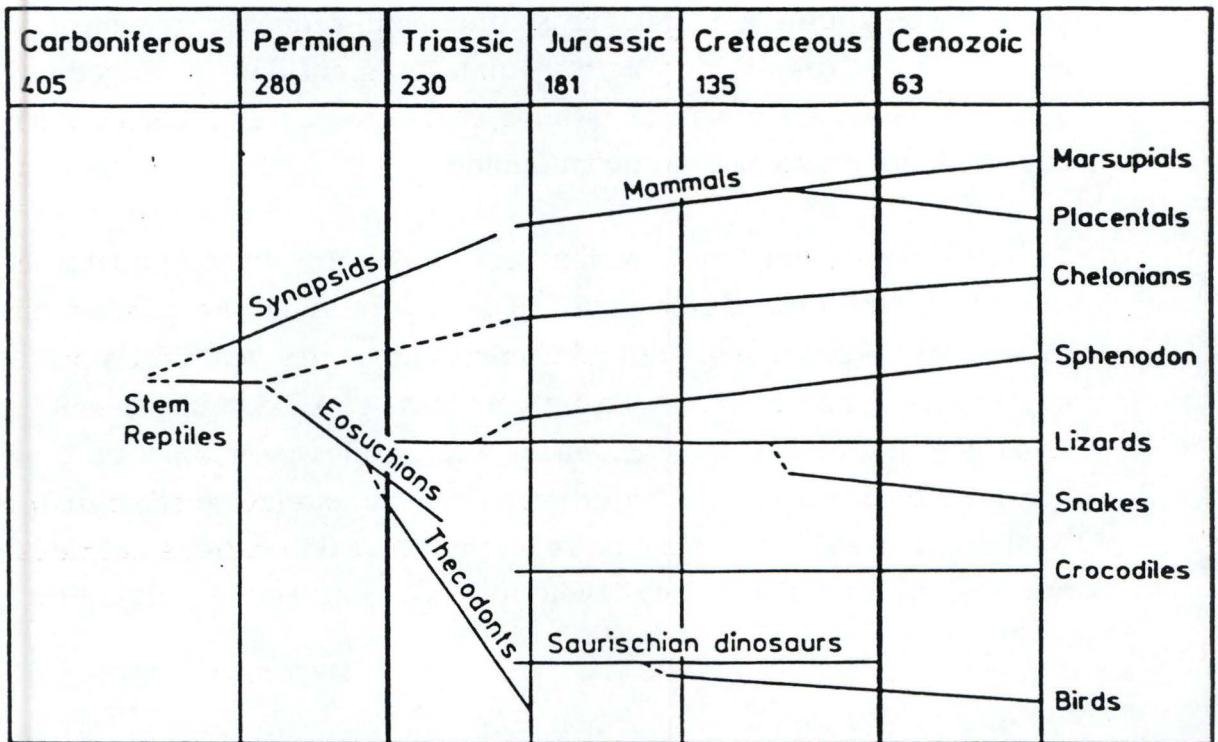


Figure 2 : évolution des filiations des vertébrés supérieurs (exprimés en millions d'années depuis le début de la période géologique) (d'après Goffinet, 1992).

empêcherait la foliation normale du cervelet. D'autres anomalies sont également visibles dans d'autres régions du SNC, et sont explicables par le même mécanisme.

Ces observations suggèrent que *reeler* code pour un facteur de stabilisation nécessaire à la formation des motifs architectoniques. En d'autres termes, un allèle sauvage de *reeler* est nécessaire au positionnement neuronal embryonnaire correct en fin de migration. Le développement architectonique cérébral est donc sous contrôle génétique. Les facteurs régissant l'instauration des structures neuronales sont encore mal connus, bien que des interactions de type neurone-neurone, neurone-cellule gliale ou encore mixtes soient évoquées. Le produit du gène *reeler* pourrait être responsable de certaines interactions de ce type.

L'isolement du gène *reeler*, la caractérisation de son produit et l'étude de son mode d'action pourraient éclaircir une étape essentielle de l'ontogenèse du SNC.

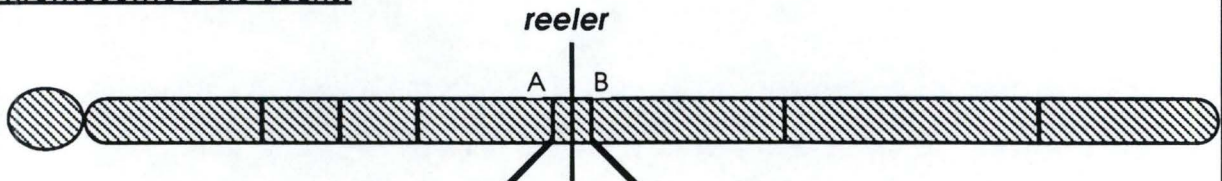
III. L'évolution du cerveau et *reeler*:

Le gène *reeler* pourrait avoir eu une certaine importance au cours de l'évolution. En ce qui concerne le SNC, l'évolution peut se traduire par :

- une augmentation de la taille du SNC,
- une augmentation du nombre de neurones,
- une augmentation du nombre de connexions entre les cellules,
- une variation de l'organisation architectonique
(possible intervention de *reeler*).

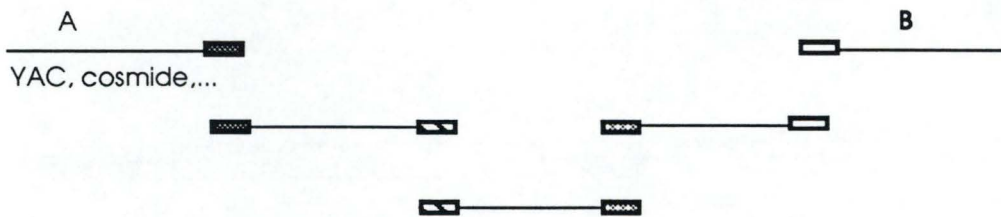
L'ordre dans l'organisation des neurones (dont pourrait être responsable *reeler*) aurait été acquis dans la lignée conduisant des reptiles ancestraux aux mammifères (figure 2). Le fait que les lézards possèdent une organisation des neurones corticaux qui rappelle celle des mammifères, pourrait refléter un phénomène de convergence évolutive (homoplasie).

Chromosome 5 de souris.



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

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



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

Figure 3 : principe du clonage positionnel.

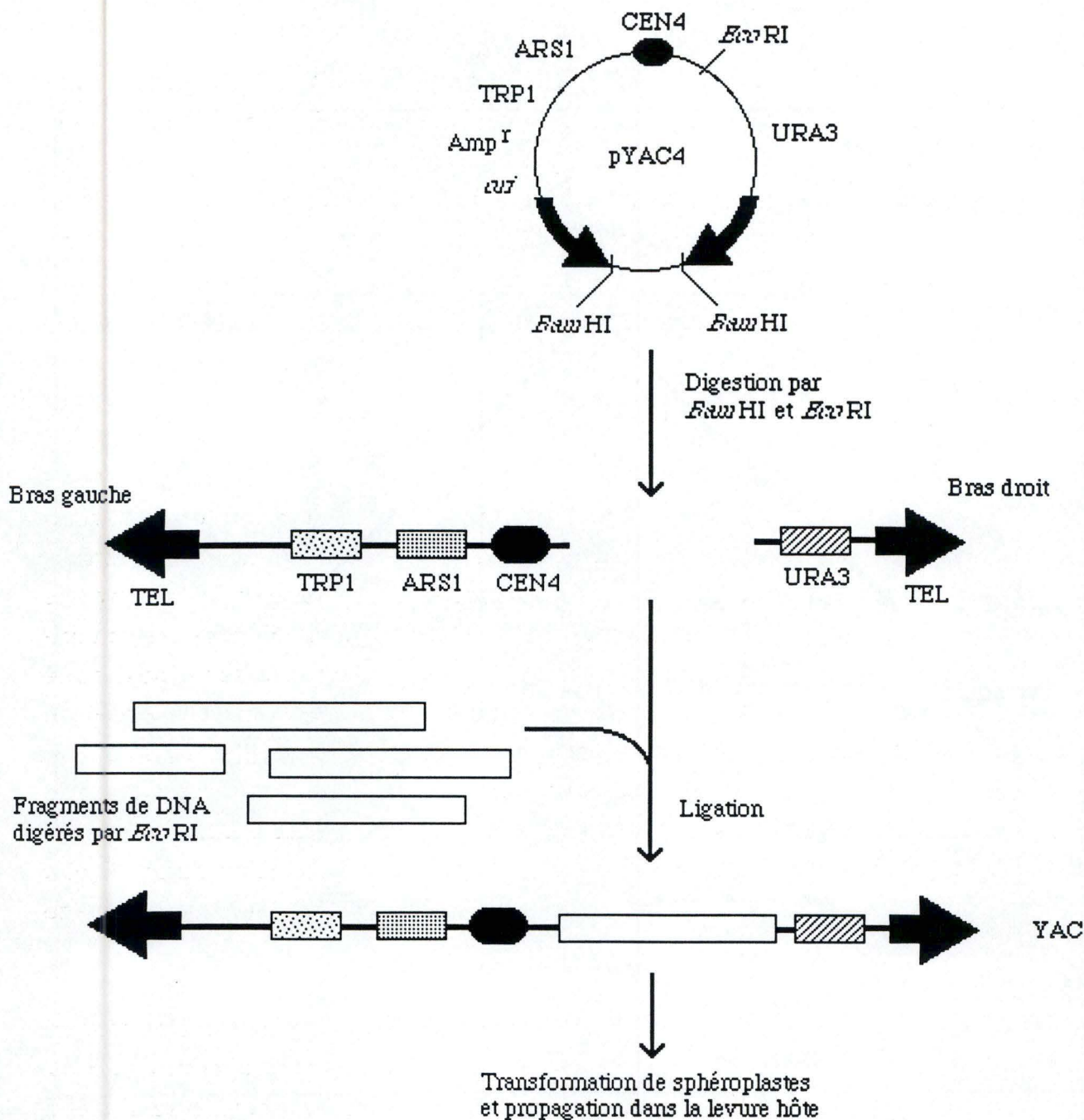


Figure 4 : clonage de fragments de DNA dans les chromosomes artificiels de levure (YAC).

Le vecteur utilisé est pYAC4. Il contient les séquences nécessaires à sa réplication et sa stabilité sous forme linéaire dans les cellules de levure. Ces séquences sont : le centromère (CEN), les deux télomères (TEL), une origine de réplication autonome (ARS) et deux gènes pour la sélection des cellules de levure transformées (URA3 et TRP1). Pour la croissance dans les cellules bactériennes, le vecteur possède une origine de réplication bactérienne (*ori*) et un gène de résistance à l'ampicilline (Amp^r).

Le vecteur est digéré par *Bam*HI et *Eco*RI pour produire les deux bras du vecteur. Le DNA à cloner (de haut poids moléculaire) est digéré partiellement par *Eco*RI et les fragments obtenus sont ligués entre les bras du vecteur pour former le YAC. Ensuite, des sphéroblastes sont transformés avec ces YACs.

Il est peu probable que le gène *reeler* ait pu être acquis indépendamment par deux lignées phylétiques au cours de l'évolution. Cependant, la fonction pourrait être apparue deux fois, par convergence, ce qui indiquerait une certaine utilité. L'élucidation de l'action du gène *reeler* permettrait d'aborder ces questions intéressantes qui, sinon, restent du domaine spéculatif (Goffinet, 1992).

IV. Objectifs du laboratoire.

Le clonage d'un gène dont le produit protéique est connu est devenu relativement simple. Grâce à la connaissance de quelques acides aminés terminaux de cette protéine, il est possible de synthétiser une sonde nucléique et d'isoler le gène dans une banque d'ADN complémentaire (ADNc). En revanche, quand son produit est inconnu, la seule possibilité d'approcher un gène est de procéder par clonage positionnel, c'est-à-dire "voyager" le long du chromosome, de proche en proche ("marche" sur le chromosome) (figure 3). Cette technique a été utilisée avec succès dans le clonage de gènes responsables de pathologies humaines comme la mucoviscidose (Rommens *et al.*, 1989) ou la maladie d'Huntington (1993). Chez la souris, le gène *Brachyury* a également été isolé par clonage positionnel (Hermann *et al.*, 1990).

Aucun produit anormal du gène *reeler* n'a jamais pu être mis en évidence, de sorte que le clonage positionnel est la stratégie à suivre. Pour cela, il faut isoler des marqueurs situés à moins de 1 centimorgan (cM) (10^6 à 2×10^6 pb) de *reeler*, cette distance étant abordable pour la construction d'un contig de YACs (un contig est un ensemble de clones contigus ; le YAC, ou Yeast Artificial Chromosome, est un système de clonage capable de contenir plusieurs centaines de kilobases d'ADN exogène) (figure 4).

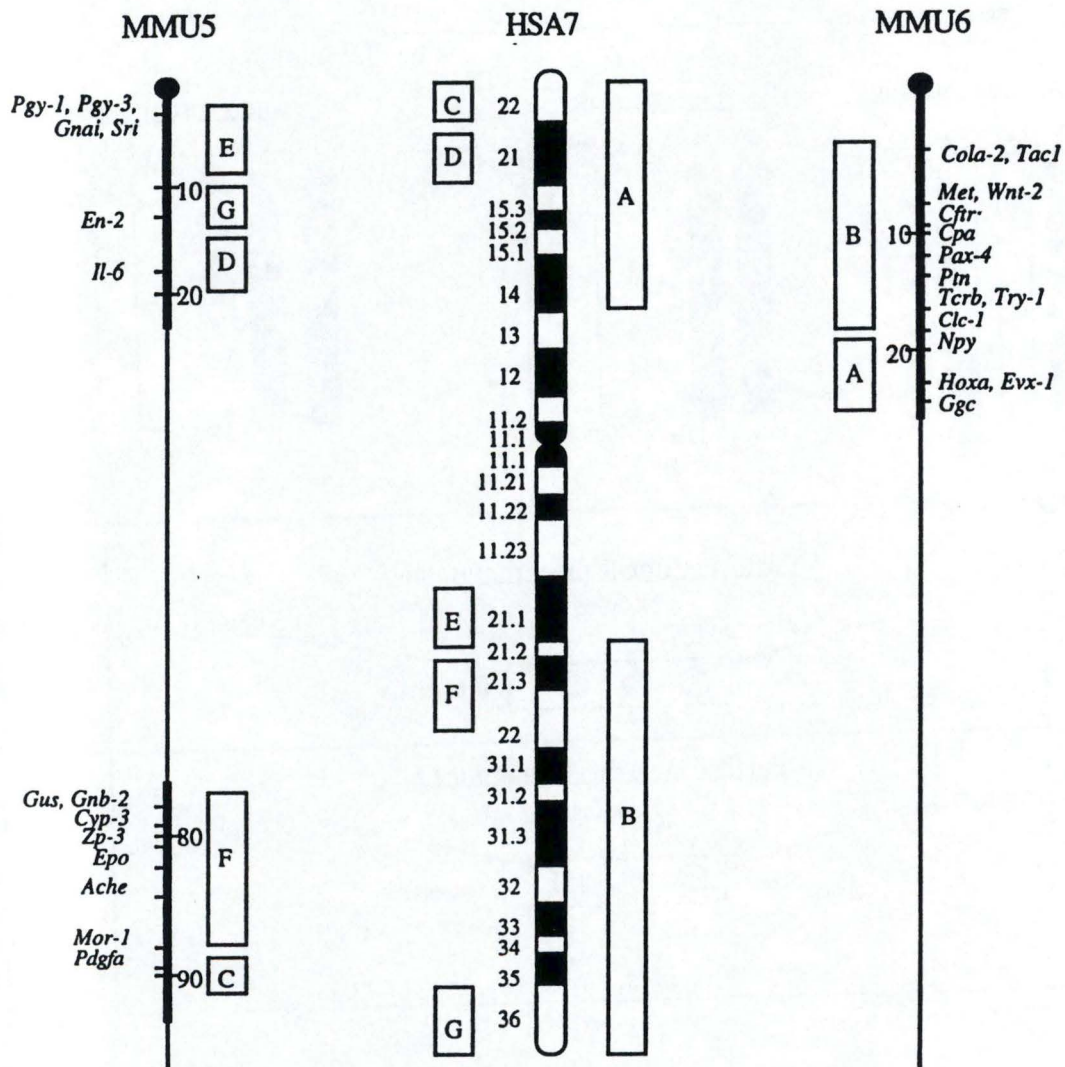


Figure 5 : cartes comparatives des régions d'homologie entre le chromosome 5 de souris (MMU5 et MMU6) et le chromosome 7 humain (HSA7) (First international workshop on human chromosome 7, Marburg, Allemagne, 1993).

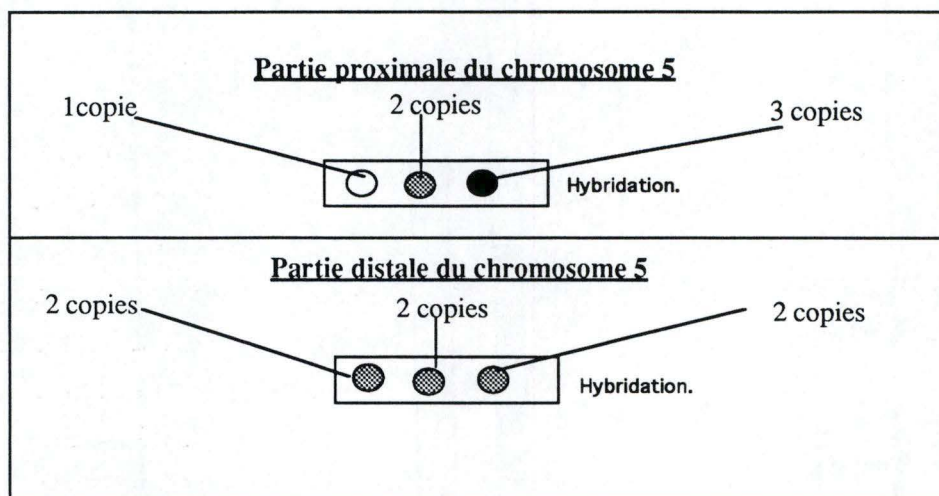
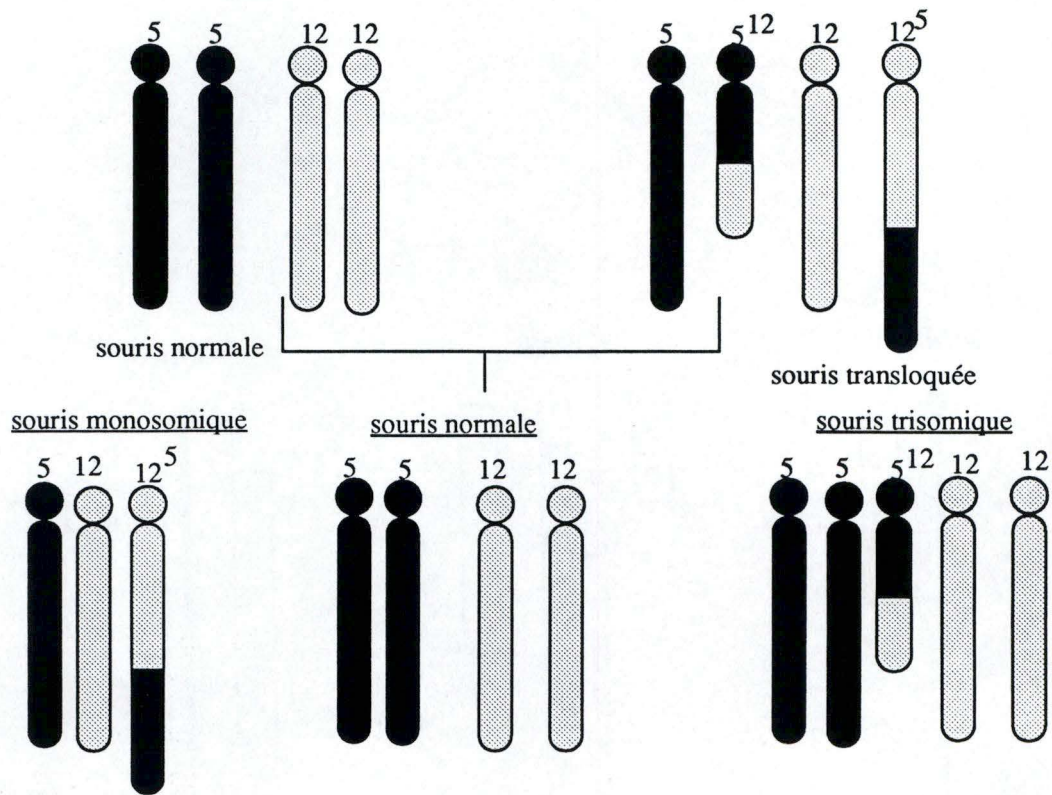


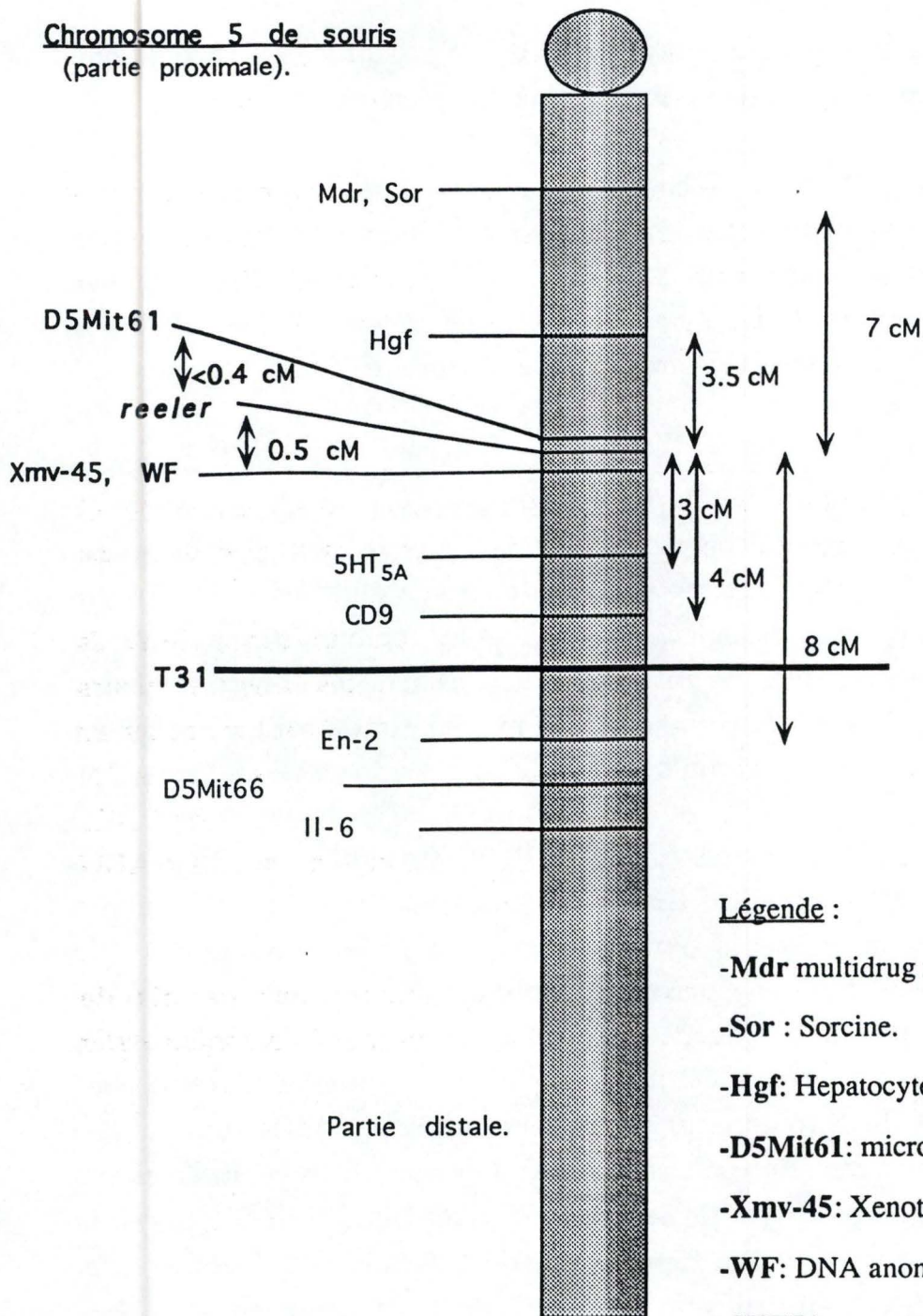
Figure 6 : principe du dosage génique (effet de dose).

Reeler est localisé en position proximale par rapport au point de translocation T31H, évènement qui affecte de manière réciproque les chromosomes 5 et 12 de souris. Par divers croisements, on peut obtenir des souris monosomiques tertiaires pour la partie proximale du 5 (caryotype 5, 12 et 12⁵) et trisomiques tertiaires (caryotype 5,5,12,12 et 5¹²) ; les souris transloquées normales possèdent deux copies de la portion proximale du chromosome 5. Après hybridation avec des quantités identiques d'ADN de souris mono-, di- et trisomiques fixés sur des membranes, une sonde marquée (au ³²P) révèle un effet de dose 1-2-3 (en intensités de signal) si elle est située dans la région centromérique du chromosome 5 (ou distale du 12) et un effet de dose 2-2-2 dans le cas contraire (si elle est distale par rapport au point de translocation)

Afin de trouver des marqueurs sur la partie proximale du chromosome 5, différentes tactiques sont envisageables (et complémentaires) :

1. La littérature. On peut y rechercher des marqueurs trouvés par d'autres laboratoires et les tester pour les situer par rapport à *reeler*. Nos sources principales de marqueurs sont la carte des microsatellites publiée régulièrement par E. Lander et ses collègues (Dietrich *et al.*, 1991) et le rapport annuel sur le chromosome 5 publié dans *Mammalian Genome*.
2. Recherche de marqueurs par homologie avec le chromosome 7 humain. La comparaison de cartes génétiques humaines et de souris montre l'existence d'une région de cosynténie entre la partie proximale du chromosome 5 de souris et les régions 7q36 ou 7q21 du chromosome 7 humain (**figure 5**). Les sondes **5HT-5A** et **Hgf**, localisées en premier lieu sur le chromosome 7 humain, ont ainsi été également cartographiées sur le chromosome 5 de souris.
3. Recherche de marqueurs par IRS-PCR (Interspersed Repetitive Sequences - Polymerase Chain Reaction) sur une lignée cellulaire hybride hamster/souris contenant uniquement le chromosome 5 de souris. Cette méthode permet l'amplification de fragments d'ADN compris entre deux séquences répétées. Si l'on utilise des amorces de séquences répétées spécifiques de souris, seules des séquences provenant du chromosome murin sont amplifiées. Elles sont ensuite clonées et caractérisées. Les fragments potentiellement intéressants sont sélectionnés par à un test de dosage génique (Dot Blot) dont le principe est expliqué à la **figure 6**. Par cette technique d'IRS-PCR, deux marqueurs ont été trouvés : **3R2** et **CD9**. La distance entre **CD9** et *reeler* a ensuite été estimée à 4,2 cM, alors que celle entre **3R2** et *reeler* n'a pu être déterminée avec précision.

Chromosome 5 de souris
(partie proximale).



Légende :

- Mdr multidrug resistance amplicon.
- Sor : Sorcine.
- Hgf: Hepatocyte growth factor.
- D5Mit61: microsatellite.
- Xmv-45: Xenotropic murine leukemia virus -45.
- WF: DNA anonyme flanquant le provirus Xmv-45.
- 5HT_{5A}: recepteur à la sérotonine, de type 5A.
- CD9: DNA anonyme.
- En-2: Engrailed-2.
- D5Mit66: microsatellite.
- IL-6: Interleukine-6.

Figure 7 : carte génétique du chromosome 5 de souris contenant *reeler* (1993).

4. Par microdissection de la région centromérique du chromosome transloqué 5¹², facilement reconnaissable sur un caryotype. Les fragments ainsi obtenus sont amplifiés par DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide-Primed - Polymerase Chain Reaction), clonés dans le vecteur Bluescript pSK⁻ et les inserts sont sélectionnés en fonction des résultats de leur hybridation sur de l'ADN de souris C57BI/6J (B6) et BALB/c (C), de BM3C3 et de hamster. Un effet de dose 1-2-3 est également recherché.
5. Par criblage de deux banques d'ADN complémentaire préparées à partir d'ARN messager de cerveaux d'embryons normaux au stade E14 (14^{ème} jour de développement embryonnaire) et d'embryons totaux normaux.
6. Par criblage de banques de YACs. La construction d'un contig de YACs recouvrant la région du chromosome 5 contenant les trois marqueurs les plus proches de *reeler* (*Wf*, *D5Mit61* et *D5Mit72*) est en cours au laboratoire. Il est également possible de sélectionner les ADN complémentaires (des deux banques) qui hybrident avec des YACs possédant une portion de l'ADN d'intérêt. Quelques fragments d'ADN complémentaires ont ainsi été sélectionnés.

Tous les marqueurs mentionnés précédemment ont permis de compléter la carte génétique de la région du chromosome 5 contenant *reeler* (figure 7).

V. Objectifs du mémoire.

Dans le cadre du projet sur le clonage de *reeler*, notre mémoire a pour buts :

- d'engendrer des marqueurs supplémentaires de la région proximale du chromosome 5 par microdissection,
- de mettre au point la technique d'hybridation fluorescente *in situ* (Fluorescent *in situ* Hybridization ou FISH) en utilisant les fragments microdisséqués, permettant de valider en même temps la microdissection,
- appliquer le FISH à la détermination de la provenance de certains YACs du contig recouvrant la région.

B. MICRODISSECTION DE FRAGMENTS PROXIMAUX DU CHROMOSOME 5¹².

I. Principe.

La technique de microdissection chromosomique a été développée pour cloner des fragments d'ADN d'une région chromosomique donnée. Les premiers essais concernaient le chromosome X polytène de *Drosophila melanogaster* (Scalenghe *et al.*, 1981), un matériel de choix pour la microdissection, vu la taille du chromosome géant et la facilité de reconnaître les différentes régions par banding.

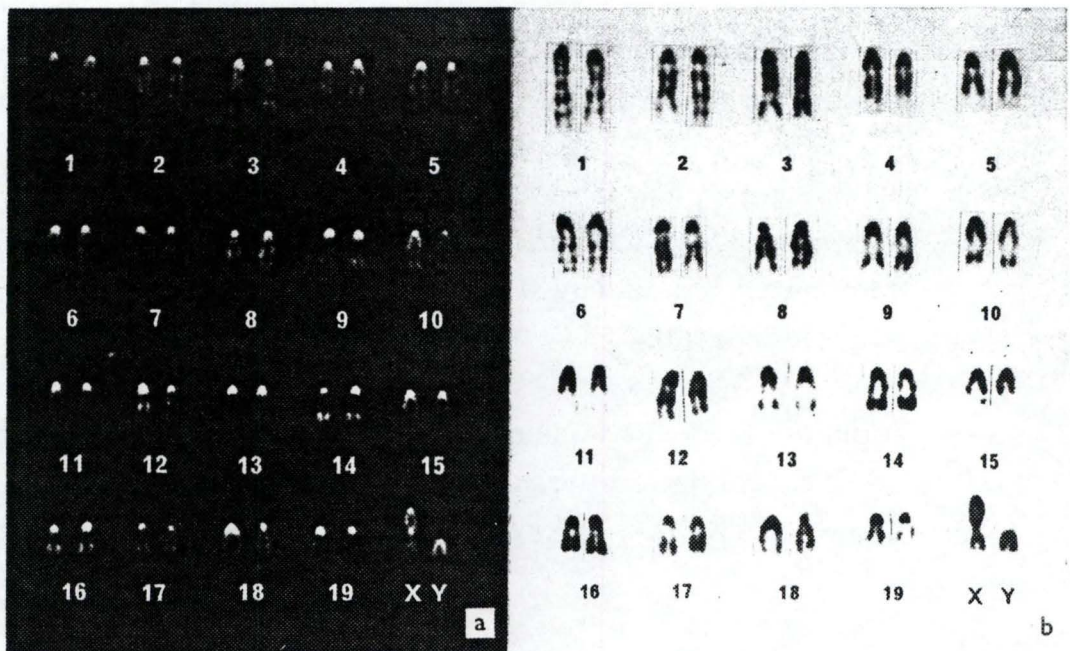


Fig. 5. Karyographic arrangement of a metaphase of a male laboratory mouse. (a) Fluorescence banding after benzimidazole staining. (b) Reverse photographic print of the same karyotype.

Figure 8 : caryotype de souris (d'après A. Gropp).

La microdissection de chromosomes se fait au moyen d'une aiguille contrôlée par un micromanipulateur, avec laquelle on gratte une portion de chromosome préalablement identifié. Un protocole utilisant un faisceau laser à Argon commandé par ordinateur a aussi été développé (Hadano *et al.*, 1991), et sera brièvement discuté plus loin. Les premières expériences de microdissection nécessitaient un microclonage des fragments : le matériel était recueilli dans une microgoutte, restreint par une enzyme puis cloné dans le phage lambda. La taille réduite des chromosomes de mammifères (par rapport aux polytènes de la drosophile) et la complexité plus grande de leur génome ont posé de grandes difficultés aux premières tentatives de microdissection (Röhme *et al.*, 1984). Un problème majeur limitant le clonage des produits de microdissection était lié à la faible quantité de matériel obtenu. Cet obstacle a été levé par la mise au point de l'amplification *in vitro* d'ADN par PCR, au moyen d'amorces dégénérées (Telenius *et al.*, 1992).

Afin d'isoler de nouveaux marqueurs proches du gène *reeler*, la microdissection est envisagée parmi d'autres techniques. Elle est un outil de choix, fréquemment utilisé pour engendrer rapidement des sondes d'une région particulière d'un chromosome. Il faut pour cela être en mesure de discerner le chromosome et la région intéressante. Cette identification aurait pu nous poser des problèmes, étant donné l'impossibilité d'identifier le chromosome 5 de la souris en l'absence de banding (tous les chromosomes de souris étant acrocentriques (**figure 8**)) et la difficulté connue de réaliser un banding de bonne qualité des chromosomes de cet animal. La solution à ce problème a été d'utiliser des souris porteuses de la translocation T31H. Cette translocation engendre un grand chromosome, le 12⁵, et un petit, le 5¹², dont la taille et la forme caractéristiques ("en cerise") permettent de le reconnaître facilement sur un caryotype. La région du chromosome 5 qui contient le gène *reeler* se trouve dans la portion proximale du chromosome 5¹² et est donc facilement identifiée.

II. Aspects techniques généraux.

II. 1. Culture de cellules porteuses de la translocation T31H.

Les étalements chromosomiques réalisés à partir de cellules de moëlle ou de rate de souris sont de mauvaise qualité. Le nombre et la qualité des plaques métaphasiques sont faibles, ce qui rend le processus de microdissection lent et fastidieux. Par contre, les étalements réalisés à partir de cellules en culture sont meilleurs. C'est pourquoi une culture primaire de cellules d'embryons porteurs de la translocation a été développée au laboratoire par M. C. Beckers. Cette lignée, stabilisée par passages successifs, est devenue aneuploïde mais contient les chromosomes anormaux 12⁵ et 5¹² facilement identifiables. Ces cellules, dont la nature biochimique n'a pas été démontrée, sont cultivées dans du milieu DMEM additionné de FCS 10% (Foetal Calf Serum).

II. 2. Microdissection.

Le principe de la microdissection est de prélever une région de chromosome à l'aide d'une aiguille de verre siliconée, de récupérer le fragment dans une gouttelette de collection (solution tampon dans laquelle l'ADN peut être conservé un certain temps) en vue d'une amplification ultérieure. Les étalements chromosomiques sont colorés au Giemsa et les chromosomes visualisés sur un microscope inversé équipé d'une platine tournante. Les lames sont installées face vers le haut sur un disque de plastique contenant un orifice de la forme de la lame, mais de dimensions plus réduites. La face inférieure de la lame est enduite d'huile d'immersion pour permettre le travail à l'objectif Planapo 100. Les figures métaphasiques sont identifiées à moyen grossissement (40x) puis le chromosome 5¹² est orienté dans un axe perpendiculaire ou légèrement oblique par rapport à l'angle de dissection. Une aiguille contrôlée par manipulateur est amenée à proximité du chromosome à microdisséquer, en ayant soin de ne pas toucher de noyaux ou d'autres chromosomes. Une fois en place, la vitesse de progression de l'aiguille est diminuée et la région d'intérêt est coupée.

En déplaçant l'aiguille sur le fragment, celui-ci adhère à la pointe et il devient possible de le retirer de la préparation. Le fragment, accolé à l'aiguille, est déposé dans la gouttelette de collection, dans un tube eppendorf de 1,5 ml. Lors de cette dernière manoeuvre, la partie terminale de l'aiguille est cassée, afin d'être sûr que l'ADN se trouve dans le tube de collection. Ces opérations sont répétées jusqu'à récolter 10 à 50 fragments de chromosome.

II. 3. Microdissection laser.

Une technique utilisant un micromanipulateur commandé par ordinateur et un laser à argon a été développée par Hadano *et al.* (1991). Elle permet la dissection de n'importe quelle région chromosomique, avec une précision atteignant le μm , correspondant à quelques mégabases. En balayant et en irradiant sélectivement un étalement, tous les chromosomes ou les régions chromosomiques non désirés peuvent être éliminés. Ceci diffère donc de la technique classique de microdissection qui permet de couper un chromosome à un point donné et qui nécessite la manipulation physique des fragments. La microdissection par laser est plus rapide et les manipulations du fragment désiré sont diminuées, entraînant ainsi une réduction des pertes, cassures ou autres dégâts mécaniques infligés aux fragments. Néanmoins, elle a comme inconvénient de nécessiter un appareillage et de compétences techniques sophistiqués.

III. Amplification des produits de microdissection.

III. 1. Prétraitements.

Les fragments microdisséqués contenus dans la gouttelette de collection sont incubés en présence de protéinase K afin de dégrader les protéines chromosomiques ou matricielles. La protéinase K est ensuite inactivée par la chaleur avant l'amplification de l'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Une mauvaise inactivation de la protéinase K conduirait en effet à l'inactivation de l'ADN polymérase thermostable utilisée pour l'amplification.

III. 2. Amplification en chaîne (Polymerase Chain Reaction = PCR).

a) PCR.

Bien que la PCR ait été introduite afin d'amplifier un seul locus dans l'ADN-cible (Saiki *et al.*, 1985), elle permet également d'amplifier de multiples loci simultanément. Cette amplification "générale" de l'ADN a été appliquée dans divers domaines, comme le "fingerprinting" d'hybrides (Ledbetter *et al.*, 1990a) et de génomes (Welsh & McClelland, 1990 ; Williams *et al.*, 1990). L'amplification par polymérisation en chaîne est une technique rapide permettant, *in vitro*, l'amplification par voie enzymatique, d'un fragment d'ADN donné, que cet ADN soit sous forme purifiée ou dans un mélange complexe.

Elle nécessite :

1. La présence de la séquence cible à amplifier, purifiée ou dans un mélange complexe, sous forme bicaténaire.
2. Deux oligonucléotides capables de s'hybrider chacun à l'un des 2 brins de l'ADN cible, délimitant ainsi la séquence à amplifier.
3. Une ADN polymérase thermostable comme la Taq polymérase.
4. Des désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP et dTTP).
5. Un tampon adéquat, dans lequel la concentration en Mg^{++} est optimale, en général entre 1 et 3 mM.

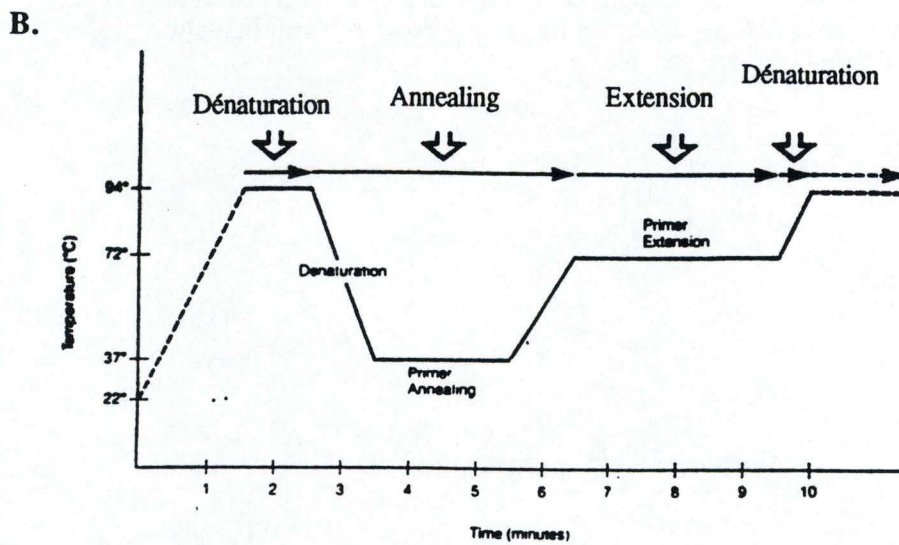
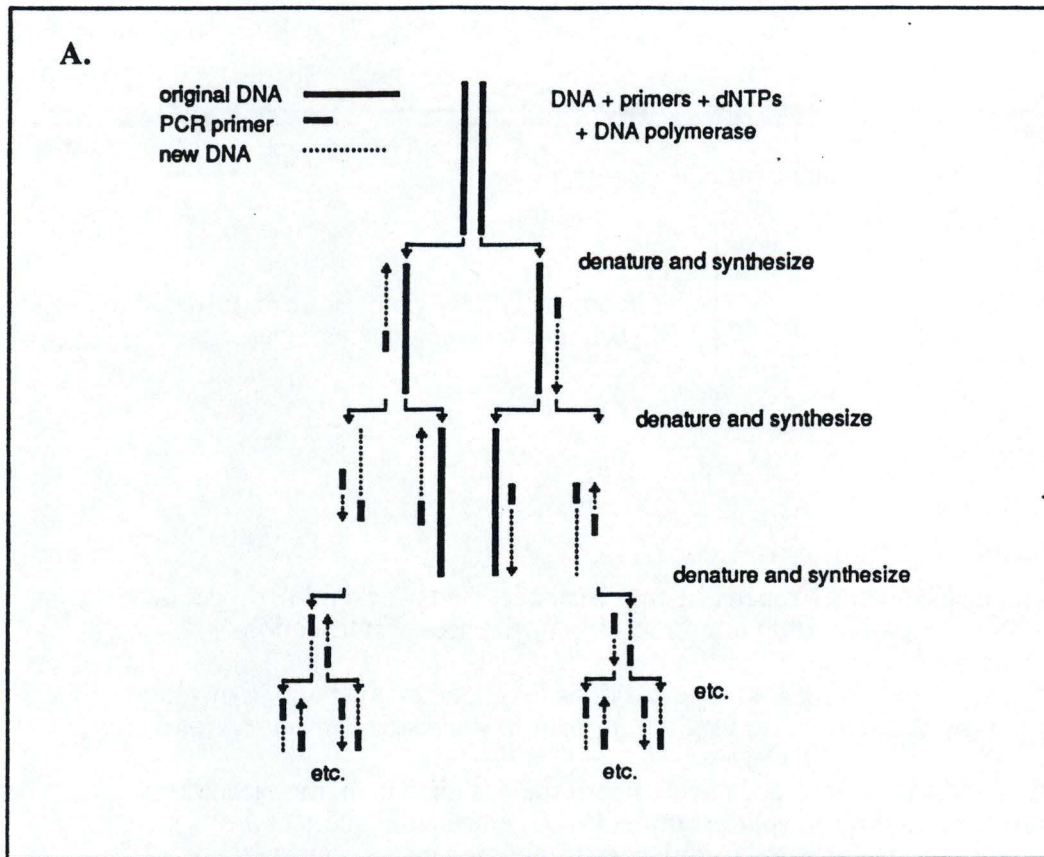
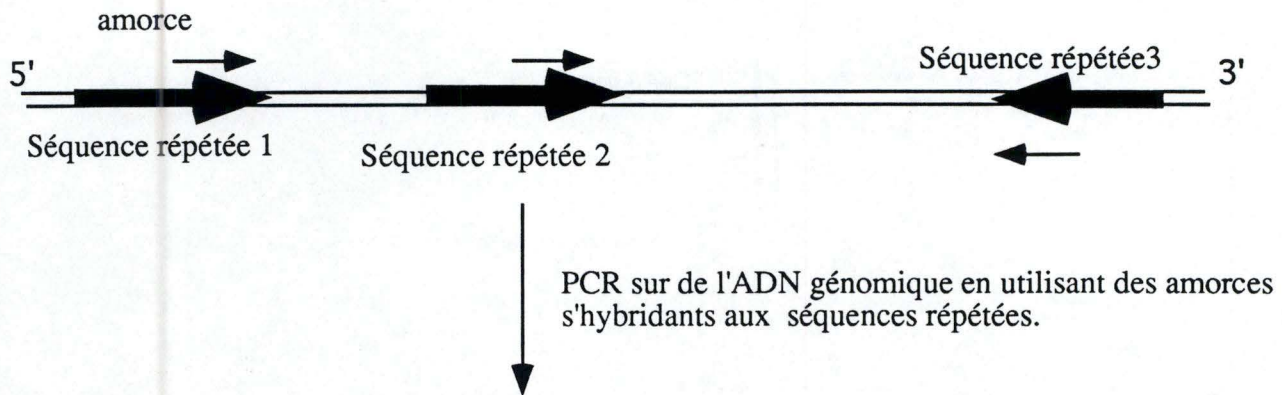


Figure 9 : en A., mécanismes de la polymérisation en chaîne (PCR). En B., conditions de température au cours de chaque étape de la PCR.



Puisque les séquences répétées sont distribuées dans l'ensemble du génome, il est possible d'obtenir de nombreuses bandes après amplification.

L'orientation des séquences répétées dans le génome, ainsi que la distance séparant ces séquences, est importante pour le succès de l'amplification :

- L'ADN compris entre deux séquences répétées dans la même orientation ne pourra être amplifié (par exemple, l'ADN entre les séquences 1 et 2).
- L'ADN compris entre deux séquences trop éloignées ne pourra être amplifié (par exemple l'ADN compris entre 1 et 3)
- L'ADN compris entre les séquences répétées 2 et 3 pourra être amplifié, car ces séquences sont suffisamment proche pour permettre l'amplification par PCR, et orientée de manière appropriée.

Figure 10 : principe de l'IRS-PCR.

Cette technique met en jeu la répétition (souvent de 20 à 50 fois) d'un cycle de 3 étapes (figure 9) :

1. Dénaturation de l'ADN cible par chauffage à 95°C.
2. Hybridation des amorces au brin complémentaire de la séquence cible.
3. Extension par l'ADN polymérase à partir de l'extrémité 3' libre de chaque amorce.

La quantité de matériel synthétisé double donc lors de chaque cycle, conduisant à une accumulation exponentielle de la séquence comprise entre les deux amorces.

b) Interspersed Repetitive Sequence - PCR.

Les amorces utilisées pour cette amplification générale correspondent à des séquences répétées du génome en permettant l'amplification des segments compris entre ces séquences. L'IRS-PCR) a été utilisée pour créer des banques chromosome- ou région-spécifiques (Nelson *et al.*, 1989 ; Cotter *et al.*, 1990 ; Ledbetter *et al.*, 1990b ; Cotter *et al.*, 1991) (figure 10). Chez l'homme, le motif répété le plus abondant est la famille *Alu* dont on estime le nombre d'éléments dans le génome haploïde à 900 000, ce qui correspond à un espacement moyen de 3-4 Kb (Hwu *et al.*, 1986). Chez la souris, l'IRS-PCR se fait à partir des séquences répétées B1 (180 000 copies dans le génome haploïde), B2 (120 000 copies) et L1md (100 000 copies) (Hastie, 1989). L'IRS-PCR a de nombreux avantages pour des amplifications spécifiques d'espèces lorsque des génomes sont mélangés, comme dans des hétérokaryons humains/rongeurs ou même entre espèces de rongeurs (comme par exemple pour BM3C3). Néanmoins, ces répétitions ne sont pas réparties uniformément. Les éléments *Alu*, par exemple, se retrouvent préférentiellement dans les bandes pauvres en G des chromosomes humains (Korenberg & Rykowski, 1988), ce qui entraîne des biais dans les amplifications. De plus, l'IRS-PCR ne s'applique qu'aux espèces pour lesquelles des familles de répétitions abondantes ont été découvertes.

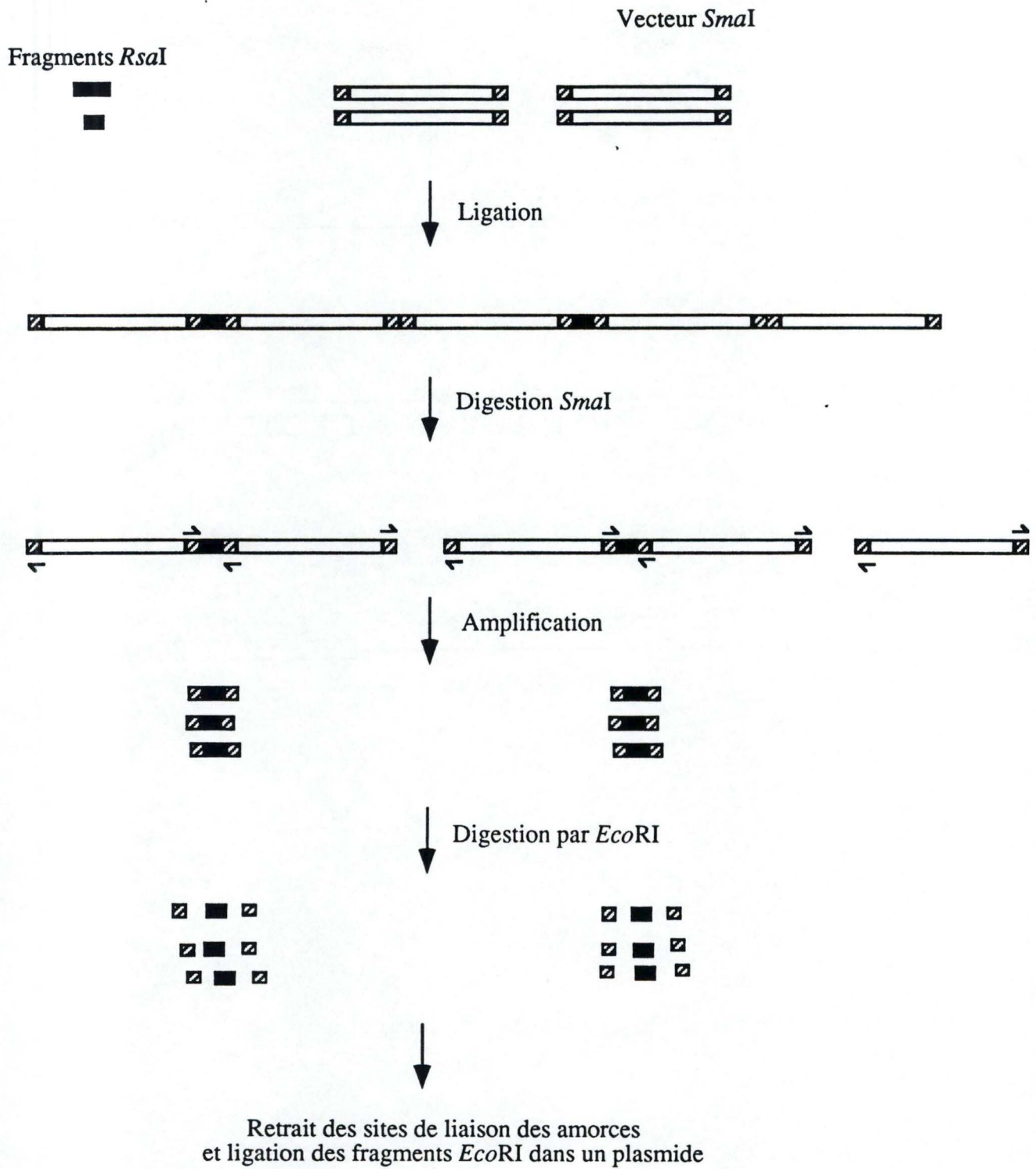


Figure 11: principe de la LA-PCR.

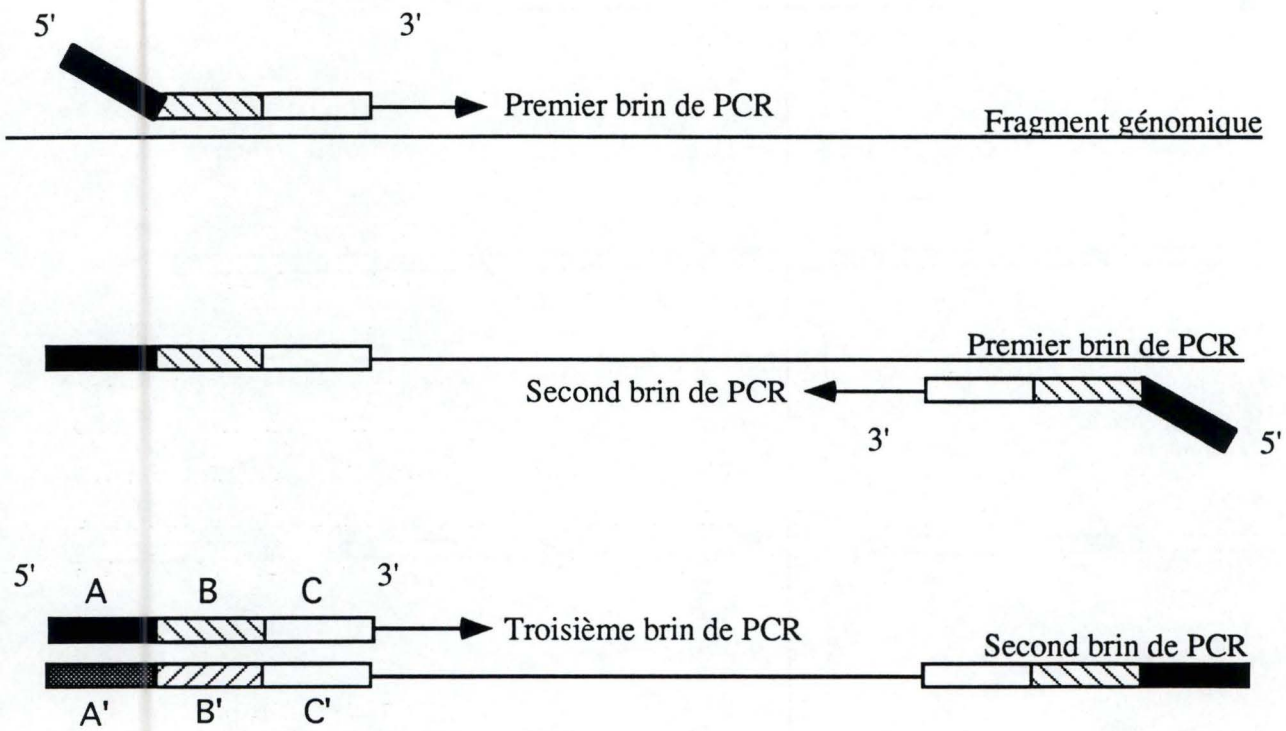


Figure 12 : principe de la DOP-PCR.

c) Linker Adapter - PCR.

Les limitations de l'IRS-PCR peuvent être contournées dans une certaine mesure par la technique de Linker Adapter - Polymerase Chain Reaction (LA-PCR) (Lüdecke *et al.*, 1989 ; Saunders *et al.*, 1989) (**figure 11**).

Dans cette procédure, un petit nombre de bandes de chromosomes microdisséqués, ou des chromosomes séparés par cytométrie de flux sont digérés avec une enzyme de restriction qui coupe fréquemment, comme *RsaI*. Les fragments résultants sont liés à des adaptateurs et les amorces complémentaires de ces adaptateurs permettent l'amplification. Après amplification, les fragments peuvent être clonés. Etant donné que les sites de restriction de *RsaI* peuvent être considérés comme répartis de manière aléatoire dans le génome, cette technique permet de résoudre les problèmes de biais des régions (plus ou moins riches en GC) et de dépendance d'espèce rencontrés avec l'IRS-PCR. Néanmoins, la LA-PCR est, au point de vue technique, difficilement applicable aux produits de microdissection.

d) Degenerate Oligonucleotide-Primed - PCR.

Pour cette raison, nous avons utilisé une nouvelle technique de PCR : la DOP-PCR (Degenerate Oligonucleotide-Primed-Polymerase Chain Reaction). L'utilisation d'un amorçage sur de multiples loci entraîne une amplification plus générale de l'ADN (**figure 12**), et peut être appliqué à n'importe quel ADN (ADN isolé par cytométrie de flux, chromosomes microdisséqués, YACs isolés etc...). L'amorçage multiple est réalisée par une séquence dégénérée qui contient trois régions :

- un site de restriction d'une enzyme qui coupe rarement,
- une zone où les nucléotides sont incorporés au hasard,
- une région dont la séquence sert d'amorce lors de l'hybridation à basse température.

L'amorce que nous avons utilisée afin d'amplifier nos fragments de microdissection est la suivante :

5' CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG 3'

*Xho*I

où N= A, T, C ou G

L'amorce contient à son extrémité 5' le site de restriction d'une enzyme qui coupe rarement dans le génome, ici *Xho*I (CTCGAG) et à son extrémité 3' une séquence spécifique d'amorce (ATGTGG). Les six positions notées N sont occupées (de manière aléatoire) par une guanine, une thymine, une cytosine ou une adénine. Le site de restriction permet de cloner les produits de PCR.

La DOP-PCR repose sur le principe d'amorçage par de courtes séquences spécifiques de la région 3' des oligonucléotides utilisés, et ce pendant des cycles à basses températures d'hybridation de la PCR. Etant donné la haute fréquence d'occurrence de ces courtes séquences, l'amplification de l'ADN cible intervient à de multiples loci simultanément. L'hybridation de la séquence 3' spécifique de l'amorce est souvent stabilisée par au moins une des 6 positions dégénérées adjacentes. L'extrémité 5' permet également une hybridation efficace de l'amorce sur de l'ADN déjà amplifié avec la même amorce, que ce soit dans des cycles de la même PCR ou dans une PCR précédente. Lors de l'utilisation d'amorces dégénérées, il est indispensable que les températures d'hybridation des premiers cycles de la PCR soient basses, ou que l'ADN ait auparavant été amplifié avec la même amorce.

Si l'efficacité d'amplification de deux amorces (une contenant 3 et l'autre 6 nucléotides dégénérés) est comparée, on remarque que l'amorce possédant 6 sites aléatoires donne de meilleurs résultats (Telenius *et al.*, 1992).

Si de l'ADN génomique est amplifié en utilisant des amorces *Alu*-spécifiques ou des amorces dégénérées, que les produits de PCR sont marqués avec de la biotine et qu'ils sont utilisés dans des expériences d'hybridation fluorescente *in situ*, les résultats sont différents. Les signaux fluorescents sont plus généraux et nécessitent une amplification immunocytochimique moindre avec les produits amplifiés par amorces dégénérées (Telenius *et al.*, 1992).

Les raisons de notre choix d'utiliser des amorces dégénérées sont donc les suivantes :

- une efficacité et une uniformité d'amplification de l'ADN génomique supérieures aux autres amorces,
- la présence dans l'amorce d'un site de restriction permettant un clonage ultérieur des fragments microdisséqués amplifiés,
- des résultats meilleurs en FISH.

Les fragments microdisséqués amplifiés par DOP-PCR ont été clonés en vue de les utiliser comme sondes, et marqués par la biotine pour réaliser les analyses en FISH (Chapitre C.).

III. 3. Klenow-kinase-ligase.

Les amorces de PCR utilisées contiennent la séquence du site de restriction *Xho*I. Afin de cloner les produits de PCR, plusieurs approches sont possibles, dont une faisant intervenir la succession de trois étapes : l'enzyme klenow lisse les extrémités protrudentes de l'ADN double brin, la kinase phosphoryle les extrémités, et enfin, la ligase concatémérise les fragments entre eux. Par la suite, la restriction par *Xho*I peut avoir lieu.

III. 4. Clonage.

Les fragments obtenus après digestion par *XhoI* sont liés dans le vecteur Bluescript pSK⁻ restreint par *SalI*. Les sites de restriction de *XhoI* et de *SalI* sont compatibles. Des cellules compétentes (*E. Coli*) sont ensuite transformées (par électroporation) avec le vecteur, et la sélection des clones ayant reçu le plasmide se fait sur base du test blanc-bleu et de résistance à l'ampicilline.

III. 5. Récupération des inserts clonés.

Les inserts ayant été restreints par *XhoI* et le plasmide par *SalI*, aucun de ces deux sites de restriction n'est restitué dans le vecteur complet après ligation. Pour pouvoir sortir l'insert, il a donc fallu synthétiser deux amorces flanquant l'insert, et l'amplifier par PCR. Les produits d'amplification sont visualisés sur gel d'agarose et les inserts récupérés par des membranes DEAE. L'ADN est ensuite repris par élution et précipitation à l'alcool/acétate d'ammonium.

III. 6. Polymorphismes de restriction.

Pour chaque insert récupéré, l'étape suivante est la recherche d'un effet de dose 1-2-3 et d'un polymorphisme de restriction entre des souris de diverses souches. Ceci permet de tester le fragment cloné sur un panneau d'ADN de souris backcross recombinantes pour une série de marqueurs connus. La sonde peut également être testée sur des membranes contenant de l'ADN de souris congéniques *reeler*. Il est ainsi possible de situer la sonde par rapport à d'autres marqueurs de la région.

C. HYBRIDATION FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH).

I. Introduction.

Les techniques d'hybridation *in situ* permettent la détection de séquences d'acides nucléiques sur des chromosomes morphologiquement préservés, des cellules ou des coupes histologiques. Combinée à l'immunocytochimie, l'hybridation *in situ* est capable de mettre en relation une information topologique macroscopique avec une activité génétique au niveau de l'ADN ou de l'ARN.

La technique a été développée indépendamment par deux groupes (Pardue *et al.*, 1969 ; Johnet *al.* , 1969). A cette époque, les seuls marqueurs existants pour les acides nucléiques étaient les radio-isotopes et l'autoradiographie était le seul moyen de détecter des séquences hybrides. De plus, le clonage moléculaire n'étant pas encore d'application, l'hybridation *in situ* ne s'appliquait qu'aux séquences pouvant être purifiées et isolées par des méthodes biochimiques conventionnelles (comme par exemple, l'ADN satellite de souris, l'ADN viral ou des ARNs ribosomiques).

L'apparition du clonage moléculaire d'acides nucléiques et les améliorations des techniques de marquage radioactif ont changé cette image. Par exemple, des séquences d'ADN de quelques centaines de paires de base ont pu être détectées sur des chromosomes en métaphase par autoradiographie (Harper *et al.*, 1981 ; Jhanwag *et al.*, 1984 ; Rabin *et al.*, 1984 ; Schroeder *et al.*, 1984). La détection radioactive *in situ* de molécules d'ARNm dans des cellules individuelles fut également possible (Harper *et al.*, 1986).

En dépit de la grande sensibilité et des applications variées des techniques d'hybridation *in situ*, leur utilisation était limitée, surtout en raison des problèmes associés à la radioactivité.

Le marquage non radioactif résout les obstacles majeurs qui entravent l'application de l'hybridation *in situ*. De plus, il permet de combiner divers marqueurs en une seule expérience. Les possibilités multiples de conjugaisons d'anticorps dans les systèmes de détection augmentent encore plus la flexibilité de cette méthode.

II. Le FISH et ses utilisations.

Des protocoles existent pour de nombreux substrats, comme par exemple des embryons entiers de drosophile (Taut & Pfeiffle, 1989) des sections de tissus enrobés en paraffine (Hillan, 1990), des sections de tissus ultrafines (Fischer *et al.*, 1991) des cellules isolées (Zarda *et al.*, 1991), des chromosomes étalés (Lichter, 1990), des noyaux en interphase (Dauwerse *et al.*, 1992) ou encore en suspension (Dudin *et al.*, 1987). L'hybridation fluorescente *in situ* peut se faire aussi bien en utilisant des sondes d'ADN que d'ARN (Zarda *et al.*, 1991).

Ses applications comprennent la cartographie et l'étude de l'expression de gènes, la biologie du développement et des tumeurs, le "sorting" cellulaire, la cytogénétique clinique ou encore l'analyse de maladies infectieuses. Les diverses techniques utilisent la digoxigénine, la biotine ou la fluorescéine pour marquer de l'ADN, de l'ARN ou des oligonucléotides. Parmi les techniques de marquage, on retrouve les plus classiques, comme le "random primed labeling", la "nick translation" et l'"oligonucleotide tailing", ainsi que des méthodes plus récentes comme l'incorporation de dUTPs modifiés par la Taq polymérase (PCR). Il est également possible d'utiliser une approche nouvelle et très sensible dans laquelle la sonde est marquée après son hybridation à l'acide nucléique cible (méthode PRINS pour PRimed *IN Situ* labeling (Hingkaer *et al.*, 1991)).

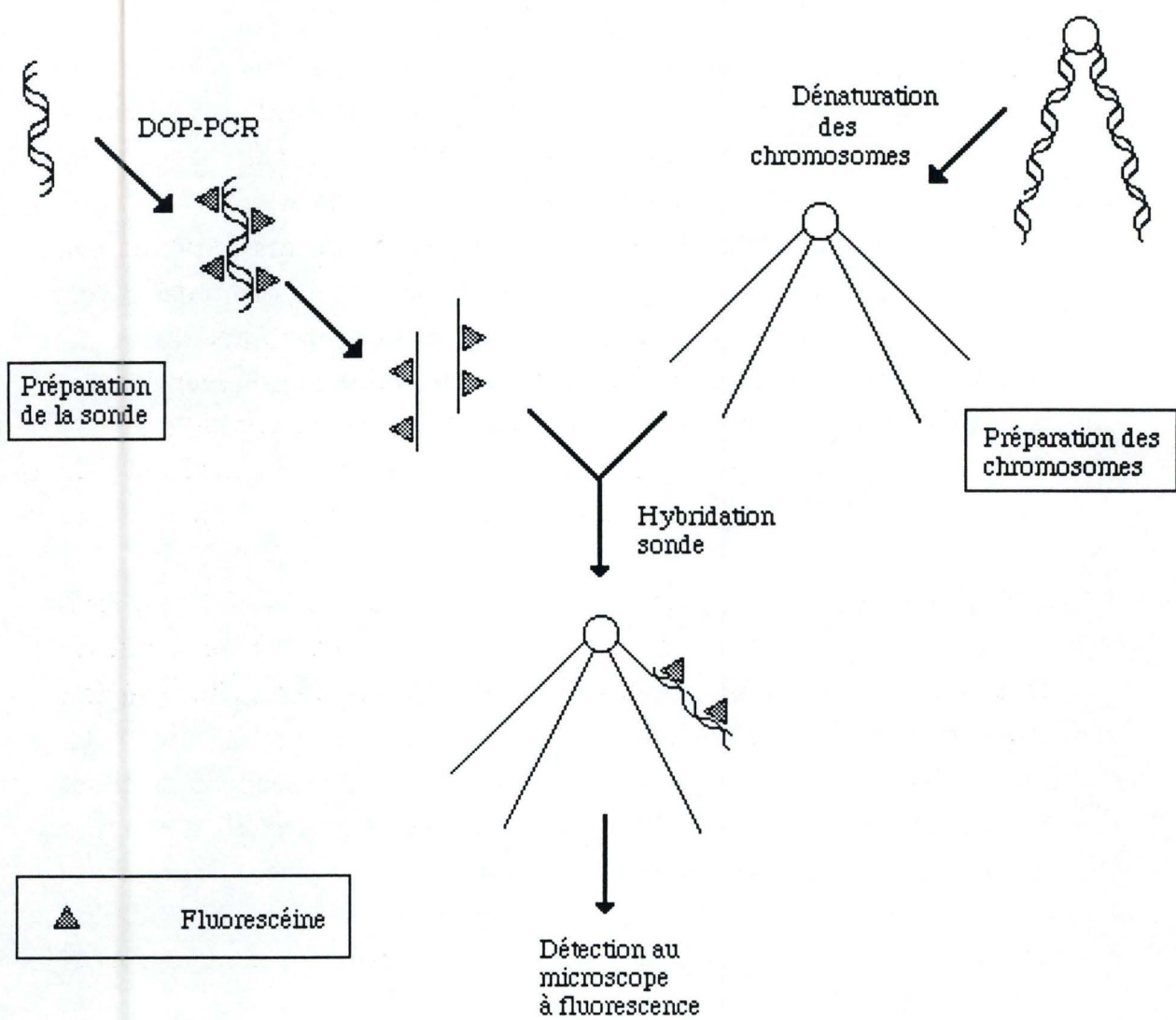


Figure 13 : méthode d'hybridation non radioactive directe.

III. Choix de la technique.

La microdissection de chromosomes est une technique directe et assez facile permettant de trouver de nouveaux marqueurs. Afin de vérifier l'origine des fragments microdisséqués, il est possible de les marquer (au ^{32}P) et de procéder à une hybridation sur de l'ADN fixé sur des membranes. Il est également possible de les marquer avec un nucléotide modifié (lié à la biotine, par exemple) et de procéder à une hybridation fluorescente *in situ* sur des étalements de chromosomes. Cette dernière méthode est plus rapide, plus directe et ne fait pas intervenir d'isotopes radioactifs. Nous avons donc entrepris de la tester sur des produits de microdissection.

Le FISH peut également servir à identifier l'origine de l'ADN exogène véhiculé par les chromosomes artificiels de levure. Ceci permet aussi de vérifier si les inserts contenus dans les YACs proviennent d'une région donnée ou s'ils sont chimériques.

IV. Méthodes directes et indirectes.

On distingue deux types de méthodes d'hybridation non radioactives :

- 1) les méthodes directes
- 2) les méthodes indirectes

IV. 1. Les méthodes directes.

Dans cette méthode (**figure 13**), la molécule détectable (également appelée rapporteur) est directement liée à la sonde nucléique, de sorte que les hybrides sont visualisables au microscope immédiatement après hybridation avec la séquence cible. Il est essentiel que la liaison du marqueur à la sonde résiste aux conditions d'hybridation et de lavage et que le marqueur n'interfère pas avec la réaction d'hybridation. La procédure de marquage de sondes d'ARN par des fluorochromes (Bauman *et al.*, 1980, 1984) et celle du marquage terminal enzymatique direct d'acides nucléiques (Renz & Kurz, 1984) répondent à ces critères.

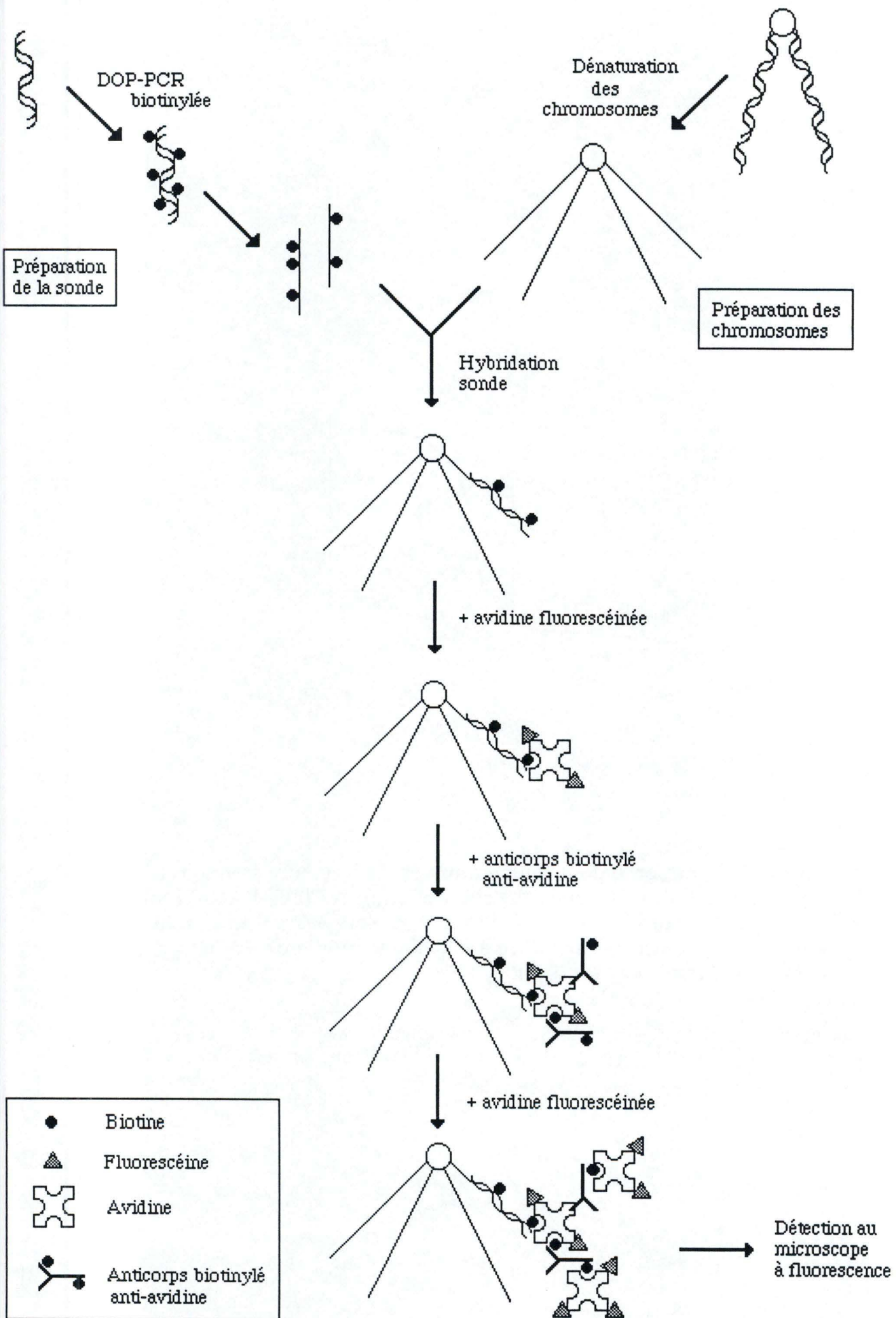


Figure 14 : mécanismes immunocytochimiques en jeu lors de la détection d'une hybridation *in situ* d'une sonde biotinylée sur un chromosome fixé et morphologiquement conservé (méthode indirecte).

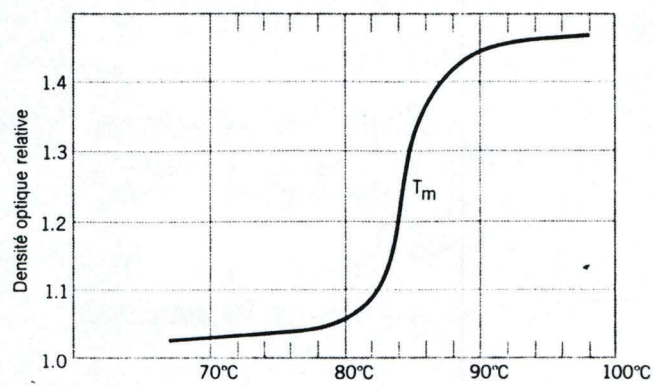


Figure 15 : influence de la température sur la structure secondaire de l'ADN (visualisée par la densité optique). A 70°C, l'ADN est sous forme de double hélice. A 90°C, il est sous forme de simple hélice. Le T_m est la température à laquelle la moitié de l'ADN est dénaturé (d'après Lewin, 1988).

IV. 2. Les méthodes indirectes.

Dans les procédures indirectes, il est nécessaire que la sonde contienne une molécule-rapporteur (introduite chimiquement ou enzymatiquement) qui la rende détectable par des processus cytochimiques (**figure 14**). De nouveau, la présence du marqueur ne doit pas interférer avec la réaction d'hybridation ou avec la stabilité de l'hybride formé. De plus, la molécule-rapporteur doit être accessible aux anticorps pour la détection immunocytochimique. Un grand nombre de ces molécules haptènes a été décrit, par exemple par Langer *et al.* (1981), Leary *et al.* (1983), ou Raap *et al.* (1989).

Lorsque les anticorps contre les rapporteurs existent, il est préférable d'utiliser l'une des méthodes indirectes parce qu'elles sont plus sensibles (Bauman *et al.*, 1981 ; Lansdorp *et al.*, 1984 ; Pinkel *et al.*, 1986).

V. Hybridation d'acides nucléiques - Aspects généraux.

(D'après : Wetmur & Davidson, 1968 ; Spiegelman *et al.*, 1973 ; Flavell *et al.*, 1975 ; Wetmur, 1975 ; Casey & Davidson, 1976 ; Cox *et al.*, 1984 ; Hames & Higgins, 1985 ; Raap *et al.*, 1986 ; Maniatis *et al.*, 1989)

L'hybridation dépend de la capacité de l'ADN dénaturé à se réassocier avec un brin complémentaire à une température inférieure à la température de fusion (T_m). Le T_m est la température à laquelle la moitié de l'ADN est présent sous la forme simple brin (**figure 15**). Le T_m est différent pour l'ADN génomique isolé de divers organismes (par ex, il est de 85°C pour *Pneumococcus* et de 94°C pour *Serratia*). Il peut être mesuré principalement par trois méthodes : la méthode optique (mesure de la diminution de la densité optique (D. O.) à 260 nm lors de la formation de la double hélice), par passage de l'ADN sur une colonne d'hydroxyapatite (qui ne fixe que les doubles hélices) ou par digestion par une nucléase (qui élimine l'ADN simple brin). La stabilité de l'ADN (et donc son T_m) est directement dépendante de sa composition en guanine et en cytosine. Plus grand est le rapport molaire des paires GC dans l'ADN, plus grand est le T_m .

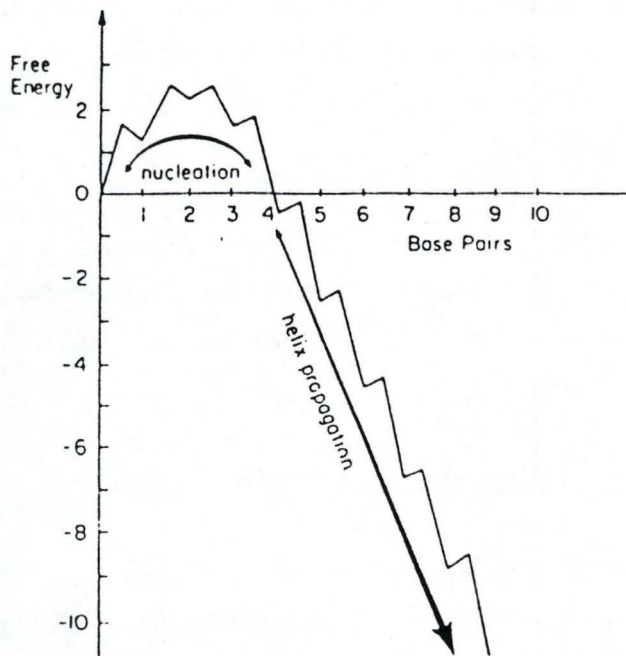


Figure 16 : profil énergétique de la réaction d'hybridation (étapes de nucléation et d'appariement "en tirette") (d'après Viscidi, 1988).

La vitesse d'hybridation dépend de deux étapes (**figure 16**) :

- la nucléation (de courtes séquences de bases complémentaires se joignent suite à des collisions au hasard),
- l'appariement (les bases adjacentes s'apparient rapidement par une réaction "en tirette").

V. 1. Facteurs majeurs influençant l'hybridation.

Le T_m et la renaturation de l'ADN sont influencés de manière primaire par 4 paramètres principalement :

- la température,
- le pH,
- la concentration en ions monovalents,
- la présence de solvants organiques.

a) La température.

La température est le facteur le plus important. A de basses températures, l'énergie des molécules est trop faible par rapport à l'énergie d'activation, de sorte que la vitesse de réassociation est faible ou nulle. Elle augmente presque de façon exponentielle avec la température (sauf à de très hautes températures lorsque les ponts hydrogènes ne peuvent plus se créer). En pratique, la vitesse augmente fortement si on diminue la température à partir du T_m , se stabilise vers $T_m-15^\circ\text{C}$ et atteint un optimum vers $T_m-25^\circ\text{C}$. A une température inférieure à $T_m-25^\circ\text{C}$, la vitesse diminue drastiquement.

b) Le pH.

Quand le pH est compris entre 5 et 9, le taux de renaturation est plus ou moins indépendant de celui-ci, mais si des conditions d'hybridation plus stringentes sont désirées, on peut augmenter le pH.

c) La force ionique.

A faible concentration, la vitesse de réassociation augmente en fonction de la force ionique au cube. Au delà, cette relation n'est plus conservée. Les cations monovalents interagissent de manière électrostatique avec les acides nucléiques (principalement avec les groupes phosphates) de telle sorte que la répulsion électrostatique entre les deux brins du duplex diminue avec une concentration croissante en sels, c'est-à-dire qu'une concentration croissante en sels augmente la stabilité de l'hybride. De faibles concentrations en sodium affectent drastiquement le T_m ainsi que le taux de renaturation. Des concentrations en sodium supérieures à 0,4 M n'affectent que peu le T_m et le taux de renaturation.

Il existe deux équations mettant en relation le T_m , le taux de GC et la concentration en sels :

Pour des concentrations en sels comprises entre 0,01 M et 0,2 M :

$$T_m = 16,6 \log M + 0,41 (G/C) + 81,5$$

Pour des concentration en sels supérieures à 0,4 M :

$$T_m = 81,5 + 0,41 (G/C)$$

avec M =concentration en sels

et G/C = pourcentage molaire de G et C

Des cations bivalents stabilisant fortement le duplex d'ADN, leur présence dans la mixture d'hybridation doit donc être contrecarrée, par des agents tels le citrate ou l'EDTA.

d) Le formamide.

L'ADN est dénaturé à 90-100°C dans des conditions de concentration en sels de 0,1 à 0,2 M. Pour l'hybridation *in situ*, ceci implique que des préparations microscopiques doivent subir des températures de 65-75°C pendant de longues périodes, ce qui pourrait entraîner une détérioration de leur morphologie. Les solvants organiques réduisent la stabilité thermique des polynucléotides doubles brins de sorte que l'hybridation peut s'effectuer à des températures plus basses. Le formamide est un solvant organique de choix : il réduit le T_m des duplex ADN:ADN de manière linéaire de 0,72°C par % de formamide. Ainsi, l'hybridation peut se faire à 30-45°C lorsque la mixture d'hybridation contient 50% de formamide.

Le T_m des hybrides en présence de formamide peut se calculer de la manière suivante :

Pour des concentrations en sodium comprises entre 0,01 et 0,2 M :

$$T_m = 16,6 \log M + 0,41 (G/C) + 81,5 - 0,72 (\% \text{ formamide})$$

Pour des concentrations en sodium supérieures à 0,4 M :

$$T_m = 81,5 + 0,41 (G/C) - 0,72 (\% \text{ formamide})$$

V. 2. Autres variables influençant l'hybridation.

D'autres variables doivent être prises en considération lorsqu'il s'agit de calculer les conditions optimales d'hybridation :

- la longueur de la sonde,
- la concentration de la sonde,
- la présence de dextran sulfate,
- le mismatch entre la sonde et la cible,
- les conditions de lavage,
- les réactions en compétition.

a) La longueur de la sonde.

Le taux de renaturation de l'ADN en solution est proportionnel à la racine carrée de la longueur du fragment (simple brin). On obtient donc des taux d'hybridation maximum avec des longues sondes. Néanmoins, l'hybridation *in situ* requiert de petites sondes parce qu'elles doivent diffuser dans les matrices cellulaires ou les chromosomes. Un compromis doit donc être trouvé.

b) La concentration de la sonde.

Elle affecte le taux avec lequel les premières paires de bases sont formées (réaction de nucléation). Les nucléotides adjacents s'apparient par la suite, s'il y a complémentarité de bases (réaction "en tirette"). La réaction de nucléation est limitante dans l'hybridation, donc plus la concentration de la sonde est élevée, plus le taux de renaturation est grand.

c) Le dextran sulfate.

Dans des solutions aqueuses, le dextran sulfate est fortement hydraté. Les macromolécules en solution ont donc moins accès à l'eau hydratante, avec comme conséquence une augmentation apparente de la concentration de la sonde et du taux d'hybridation.

d) Le mismatch.

Il engendre une diminution du taux d'hybridation et de la stabilité thermique des duplex formés. Afin de faire une discrimination maximale entre les séquences apparentées et identiques, il convient d'hybrider dans des conditions assez stringentes (par exemple à $T_m - 15^\circ\text{C}$).

e) Les lavages.

Lors de l'hybridation, il se forme des duplex entre des séquences parfaitement complémentaires, mais également entre des séquences similaires. Afin de diminuer le bruit de fond associé à l'hybridation non spécifique, il est possible de laver l'échantillon dans une solution stringente. Plus la concentration en sels est basse et plus la température est haute, plus les conditions sont stringentes. En général, des résultats plus spécifiques sont obtenus en hybridant dans des conditions stringentes et en lavant avec une stringence moindre ou égale, plutôt que d'hybrider dans des conditions peu stringentes et de laver en augmentant la stringence.

f) Les réactions en compétition.

Lorsque l'hybridation se fait avec une sonde double brin, trois réactions peuvent avoir lieu : le réappariement de la sonde, le réappariement de l'ADN cible et l'hybridation *in situ*. L'utilisation de sondes simple brin empêche le premier cas d'avoir lieu. Il convient de créer des conditions favorisant l'hybridation *in situ* entre la sonde et la cible.

V. 3. Séquences répétées.

L'ADN isolé de cellules eucaryotes contient souvent des séquences génomiques répétées, comme par exemple les séquences B1 chez la souris. L'hybridation *in situ* sur des chromosomes utilisant une sonde contenant des séquences répétées résulte souvent en un signal uniforme. Afin d'éliminer au maximum ce bruit de fond, il est possible de bloquer ces séquences répétées en préhybridant la sonde avec de l'ADN génomique

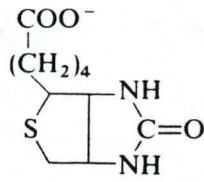


Figure 17 : formule structurale de la biotine.

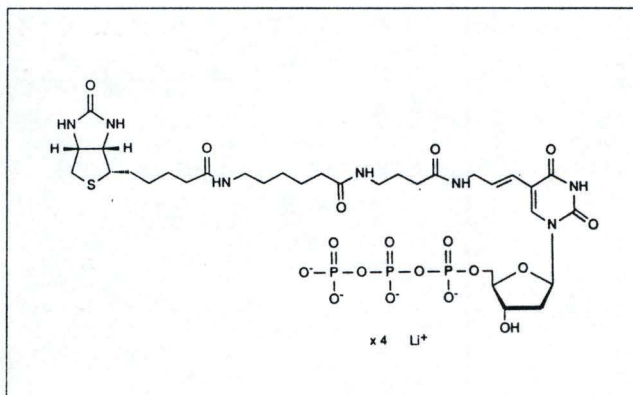


Figure 18 : formule structurale de la biotine-dUTP (d'après Boehringer Mannheim).

total. Cette approche a été décrite pour l'hybridation chromosomique *in situ* par Pinkel *et al.* (1988). Plus la complexité du génome est grande, plus le blocage par un ADN compétiteur est important (plasmide<phage<cosmide<banques de YACs<banques chromosomiques).

VI. Marquage d'acides nucléiques avec la biotine.

Le marquage enzymatique d'acides nucléiques avec la biotine (membre du complexe de la vitamine B et aussi appelée vitamine H) a été développé par D. Ward et ses collègues à l'université de Yale (Langer *et al.*, 1981). La biotine peut être détectée par des anticorps anti-biotine, mais le système le plus utilisé est celui de la reconnaissance par l'avidine ou la streptavidine à cause de leur forte capacité d'interaction (l'avidine a une constante de liaison avec la biotine de $10^{-15}/M$ à $25^{\circ}C$).

La biotine (figure 17) est liée à l'uridine en position 5 de la base pyrimidique via un bras de n atomes de carbone (figure 18). Dans nos expériences de biotinylation par PCR (dUTP biotinylé), $n=16$, alors que le dATP biotinylé utilisé dans la nick translation avait un $n=14$. Dans les tissus humains, la biotine est un cofacteur utilisé dans la carboxylation enzymatique de 4 substrats : le pyruvate, l'acétyl-CoA, le propionyl-CoA et le β -méthylcrotonyl-CoA. Elle joue donc un rôle important dans les métabolismes des hydrates de carbone et des lipides.

Le nucléotide modifié peut être incorporé enzymatiquement dans la sonde nucléique par des ADN polymérase comme l'ADN polymérase de *E. Coli*, la T4 ADN polymérase, la T7 ADN polymérase, la transcriptase inverse ou la Taq ADN polymérase pour les sondes à ADN, mais aussi par des ARN polymérase (comme la SP6/T7 ARN polymérase) ou des transférase terminales. Ceci veut dire que l'on peut biotinyler une sonde par "random primed labeling", par "nick translation" ou encore par amplification d'ADN *in vitro* (PCR).

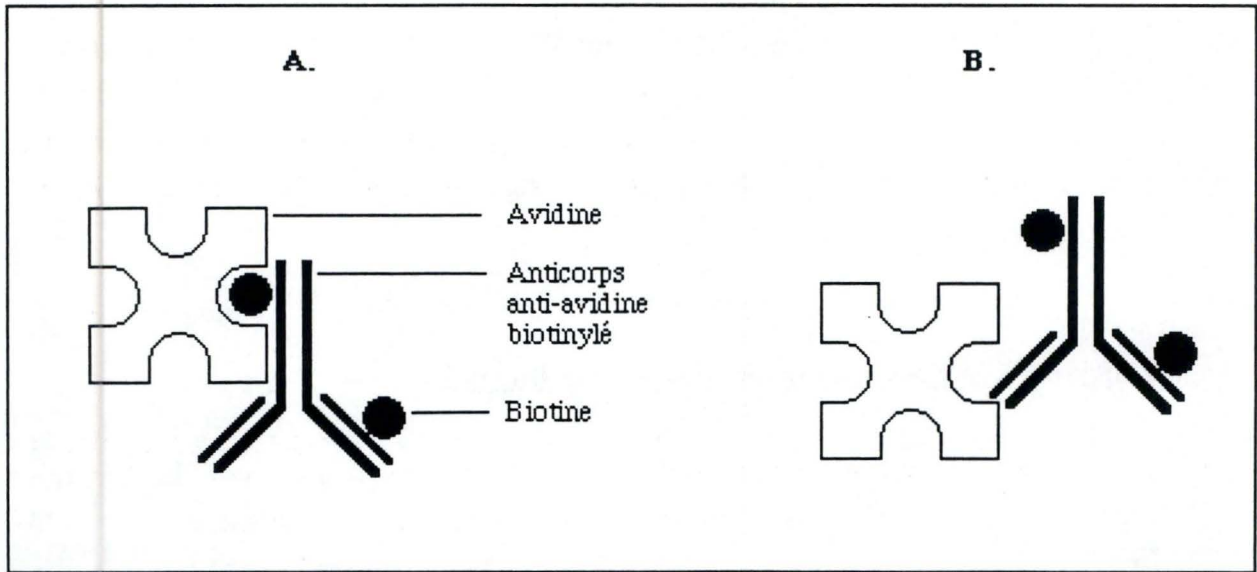


Figure 19 : mécanismes de reconnaissance de l'anticorps anti-avidine biotinylé. En A., reconnaissance entre la biotine fixée sur l'anticorps et l'avidine. En B., reconnaissance spécifique de l'avidine via un site combinant de l'anticorps.

VII. Mécanisme de détection de l'hybridation.

Le mécanisme immunocytochimique impliqué dans le type d'hybridation fluorescente *in situ* que nous avons utilisé est le suivant (figure 14) :

- 1) L'ADN est marqué grâce à des nucléotides biotinylés (par PCR ou par nick translation).
- 2) La biotine est reconnue par l'avidine couplée à un fluorochrome, la fluorescéine.
- 3) L'observation de l'hybridation peut déjà se faire à ce stade au microscope à fluorescence, mais il est souvent nécessaire d'amplifier le signal fluorescent.
- 4) Pour ce faire, une couche d'anticorps biotinylés anti-avidine est appliquée à la préparation, suivie d'une deuxième couche d'avidine fluorescéinée. Un lavage de la préparation a lieu entre chaque couche l'avidine et d'anti-avidine.

L'anticorps anti-avidine biotinylé est une molécule non usuelle. Elle est capable de se lier à l'avidine par deux mécanismes différents, soit via les sites de liaison à l'antigène des portions Fab de l'anticorps, soit via les multiples résidus biotine liés de manière covalente à la molécule (figure 19). Même si peu de choses sont connues quant au(x) mécanisme(s) de liaison entre l'avidine et l'anti-avidine biotinylée, ce système permet une amplification du signal fluorescent supérieure par rapport aux extenseurs biotinylés ou à l'anti-avidine seule (Vector Laboratories).

Matériel & méthodes

A. TAMPONS, ENZYMES ET SOLUTIONS STOCKS.

- **10 M acétate de sodium** : Dissoudre 770 g d'acétate de sodium dans 800 ml d'eau. Ajuster le volume à 1 litre avec de l'eau. Stériliser par filtration.
- **SCE (Sorbitol Citrate EDTA)** : Préparer dans de l'eau une solution 1 M de sorbitol, 0,1 M de citrate de sodium (pH 5,8), 10 mM d'EDTA (pH 7,5 ou 8) et 10 mM de DDT que l'on ajoute juste avant l'utilisation.
- **0,5 M EDTA pH 8** : Ajouter 186,1 g de disodium éthylènediaminetétra-acétate.2H₂O dans 800 ml d'eau. Agiter vigoureusement à l'aide d'une puce magnétique. Porter à pH 8 à l'aide de NaOH. Ajuster à 1 litre. Stériliser par autoclave. Conserver à température ambiante.
- **Bromure d'éthidium (10 mg/ml)** : Ajouter 1 g de bromure d'éthidium à 100 ml d'eau. Mélanger sur agitateur magnétique jusqu'à dissolution totale. Emballer dans de l'aluminium et conserver à 4°C.
- **CIAA** : Préparer une solution contenant 1 part d'alcool isoamylique pour 24 parts de chloroforme.
- **Gel-loading buffer (6x)** : 0,25% de bleu de bromophénol, 0,25% de xylène cyanol FF, 15% Ficoll (type 400, Pharmacia) dans de l'eau distillée. Conserver à température ambiante.

- **Milieu YPD** : Préparer une solution dans l'eau de 2% de dextrose, 2% de bactopeptone et 1% d'extraits de levure. Autoclaver.
- **1 M DTT (Dithiothreitol)** : Dissoudre 3,09 g de DTT dans 20 ml d'acétate de sodium 0,01 M (pH 5,2). Stériliser par filtration. Aliquoter par tubes de 1 ml. Maintenir à -20°C.
- **3 M NaAC** : Dissoudre 408,1 g d'acétate de sodium.3H₂O dans 800 ml d'eau distillée. Ajuster le pH à 5,2 avec de l'acide acétique glacial ou à 7 avec de l'acide acétique dilué. Porter à un litre avec de l'eau distillée et autoclaver.
- **5 M NaCl** : Dissoudre 292,2 g de NaCl dans 800 ml d'eau, porter à un litre et autoclaver.
- **Phénol saturé en TE** : Préparer une solution contenant 250 g de phénol, 0,3 g d'hydroxyquinoline, 62,5 ml d'eau distillée et 32 ml de Tris pH 8. Placer 1 à 2 minutes dans le four à micro-ondes jusqu'à dissolution complète, sans dépasser 65°C. Aliquoter et conserver à -20°C.
- **Protéinase K, 10 mg/ml** : Dissoudre l'enzyme jusqu'à obtention d'une concentration de 10 mg/ml dans de l'eau distillée stérile, aliquoter par 400 µl et conserver à -20°C.
- **SDS 10% (Sodium dodécyl sulfate)** : Dissoudre 10 g de SDS (electrophoresis grade) dans 90 ml d'eau distillée. Chauffer à 68°C pour dissolution et ajuster le pH à 7,2. Porter à 100 ml et conserver à température ambiante.
- **SSC 20 x** : Dissoudre 175,3 g de NaCl et 88,2 g de citrate de sodium dans 800 ml d'eau distillée (3 M NaCl, 0,3 M citrate). Ajuster à pH 7 et porter à 1 l avec de l'eau distillée. Autoclaver.
- **Tampon d'électrophorèse TBE (Tris-borate) 10 x** : Dissoudre 108 g de Tris, 55 g d'acide borique dans 800 ml d'eau distillée. Ajouter 40 ml d'EDTA 0,5 M, pH 8. Porter à un litre et autoclaver.

- **Tampon TE** : Préparer une solution 10 mM Tris-HCl (pH 7,4, 7,6 ou 8), 1 mM EDTA pH 8 dans de l'eau distillée et autoclaver.
- **Tris-HCl 1 M (tris hydroxyméthylaminométhane), pH 7,4 ou 7,6** : Dissoudre 121,1 g de Tris dans 800 ml d'eau distillée. Porter à pH désiré avec de l'HCl concentré. Porter à un litre et autoclaver.
- **Solution CHURCH** : 500 mM NaPi (pH 7,2), 7% SDS, 1% BSA (Albumine Bovine) et 1 mM EDTA. Dissoudre tous les composants dans de l'eau distillée stérile et chauffer à 65°C si nécessaire.
- **1 M NaPi** : dissoudre 71 g de Na_2HPO_4 et 3,5 ml de H_3PO_4 dans un litre d'eau distillée stérile.
- **IPTG 1 M (Isopropylthio- β -D-galactoside)** : Dissoudre 2 g d'IPTG dans 8 ml d'eau distillée. Porter ensuite à 10 ml avec de l'eau distillée et stériliser par passage sur filtre millipore 0,22 micron. Répartir en aliquots de 1 ml et conserver à -20°C.
- **X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)** : Préparer une solution à 20 mg/ml dans du diméthylformamide. Aliquoter dans des tubes en propylène et emballer ceux-ci dans de l'aluminium. Conserver à -20°C.

Solutions utilisées :

- **Dulbecco's MEM avec Glutamax-1** (L-alanyl-L-glutamine) (DMEM) :
Contenant 25mM HEPES ; Sans pyruvate de sodium (GIBCO BRL).
- **Foetal Calf Serum (FCS)** : Criblé pour les mycoplasma et les virus
(GIBCO BRL).
- **Gentamicine** : 10 mg/ml préparée dans de l'eau (GIBCO BRL).
- **Trypsine** : 0,25% ; Préparée dans la solution A de GIBCO BRL.
- **Colcémide** : Agent antimitotique ; 10 µg/ml ; Préparée dans une
solution saline équilibrée de Hanks ; A utiliser à raison de 0,6 µg/ml
de milieu de culture (GIBCO BRL).
- **Milieu de culture** : 500 µl de Gentamicine ; 5 ml de FCS ; 45 ml
DMEM.
- Boîtes de culture Falcon de 175 cm² (Becton-Dickinson).

B. CULTURE CELLULAIRE.

Souche de cellules :

Fibroblastes de souris possédant la translocation T31H.

Protocole :

(Tout le travail se déroule de manière stérile sous une hotte à flux laminaire)

1. Les cellules sont maintenues dans une étuve à 37°C jusqu'à ce qu'elles arrivent à confluence.
2. Sous la hotte, le milieu est éliminé et remplacé par du DMEM.
3. Après avoir enlevé le DMEM, 5 ml de trypsine sont versés dans la boîte.
4. On laisse agir l'enzyme 2 minutes à température ambiante.
5. Après avoir retiré le surplus de trypsine, on place la boîte à 37°C pendant 5 minutes.
6. 2 ml de milieu de culture sont ajoutés et les agrégats sont défaites par passage à travers une pipette stérile de 2 ml.
7. 0,2 ml de cellules en solution est transféré dans une autre boîte avec 20 ml de milieu de culture (le nombre exact de cellules transférées ayant peu d'importance, le volume du transfert peut varier).
8. La boîte est placée à l'étuve à 37°C (concentration de CO₂ : 5%).
9. Lors du prélèvement de cellules pour la réalisation de lames pour la microdissection ou pour l'hybridation *in situ*, 0,6 µg de colcémide par ml de milieu de culture est ajouté stérilement dans la boîte.
10. Après un minimum de 5 heures, la boîte est rincée avec du DMEM, trypsinisée (comme décrit précédemment), les cellules sont mélangées à du DMEM et récoltées dans un tube en verre stérile de 15 ml.

Matériel utilisé :

- **Solution hypotonique en KCl (0,56%)** ; La solution est amenée à une température de 37°C.
- **Solution fixante** ; Un volume d'acide acétique glacial est mélangé à trois volumes de méthanol ; La solution est maintenue dans de la glace.
- **Lames :**
 - Vel 24x60 mm (code 1155046) pour la microdissection
 - Vel 26x76 mm biseautés, bord dépoli, lavées et dégraissées (code 1169466) pour le FISH

Solution utilisée :

- Une solution de **Giemsa 10%** filtrée à travers un Sterile Acrodisc (Gelman Sciences) dont les pores sont d'un diamètre de 0,2 µm.

C. PREPARATION DE LAMES (pour la microdissection et le FISH).

I. Préparation de caryotypes (étalements chromosomiques).

Protocole :

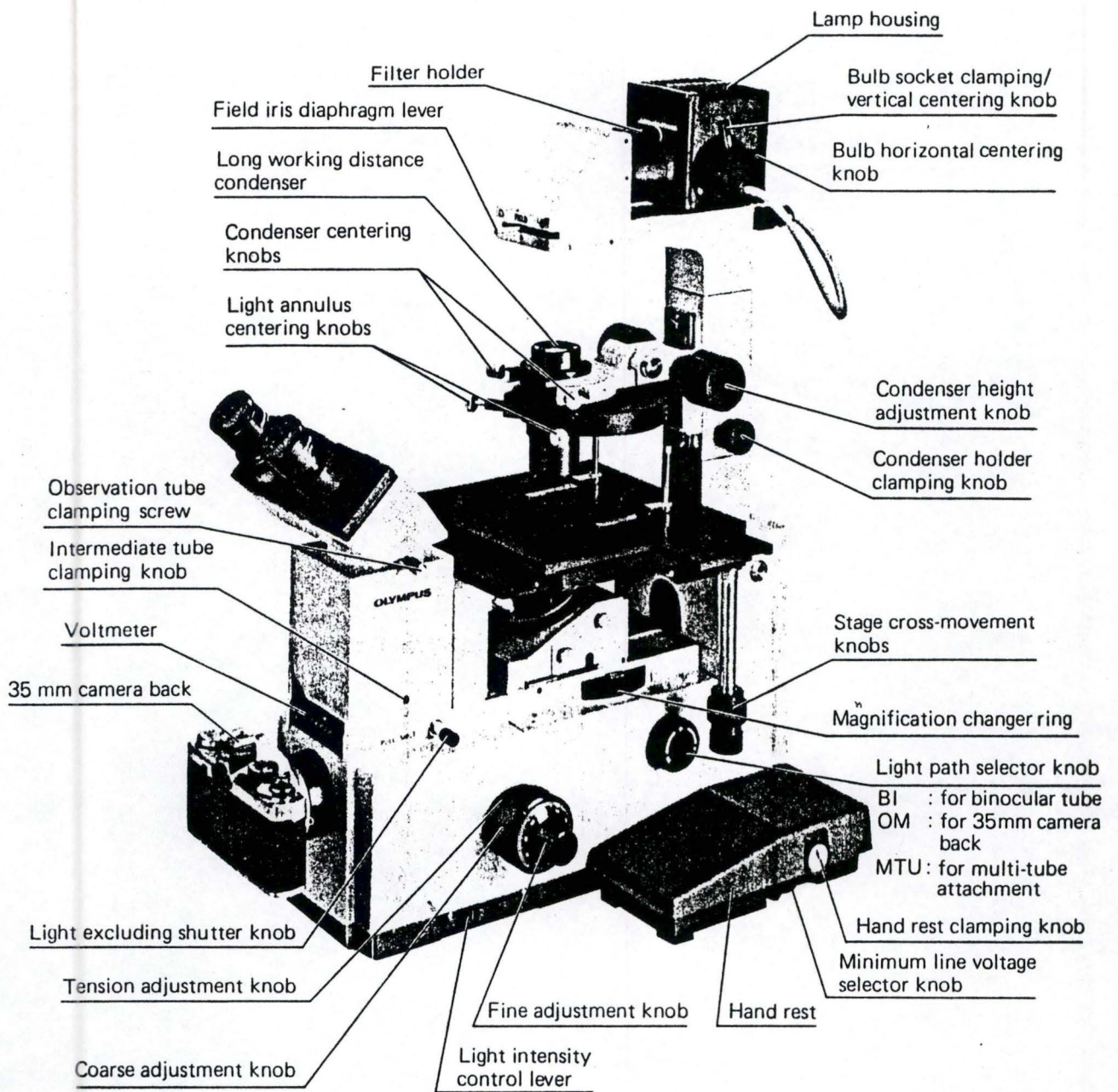
1. Les cellules récoltées sont centrifugées pendant 10 minutes à 1000 rpm.
2. Le surnageant est enlevé, remplacé par la solution de KCl et les cellules sont resuspendues délicatement grâce à une pipette Pasteur stérile.
3. Le tube est placé 20 minutes à 37°C puis centrifugé pendant 10 minutes à 1000 rpm.
4. Directement après la centrifugation, le KCl est enlevé (en ayant soin de ne pas toucher au culot) et est tout de suite remplacé par un même volume de solution fixante, en éliminant tout le KCl.
5. Le liquide est immédiatement retiré du tube et remplacé par 1 ml de solution fixante fraîche.
6. Après 3 à 4 minutes, le fixant est remplacé et le culot resuspendu.
7. La solution est laissée 10 minutes au repos, puis est à nouveau centrifugée 10 minutes à 1000 rpm.
8. Le surnageant est éliminé.
9. 1 à 2 ml (selon l'importance du culot) de fixant sont ajoutés dans le tube et le culot est resuspendu.

Pour les lames de microdissection :

10. La solution fixante contenant les noyaux cellulaires est aspirée dans une pipette Pasteur stérile.
11. On laisse tomber d'une hauteur supérieure à 50 cm 2 à 3 gouttes sur une lame de verre froide et inclinée (les lames propres sont conservées dans de l'eau stérile à 4°C).

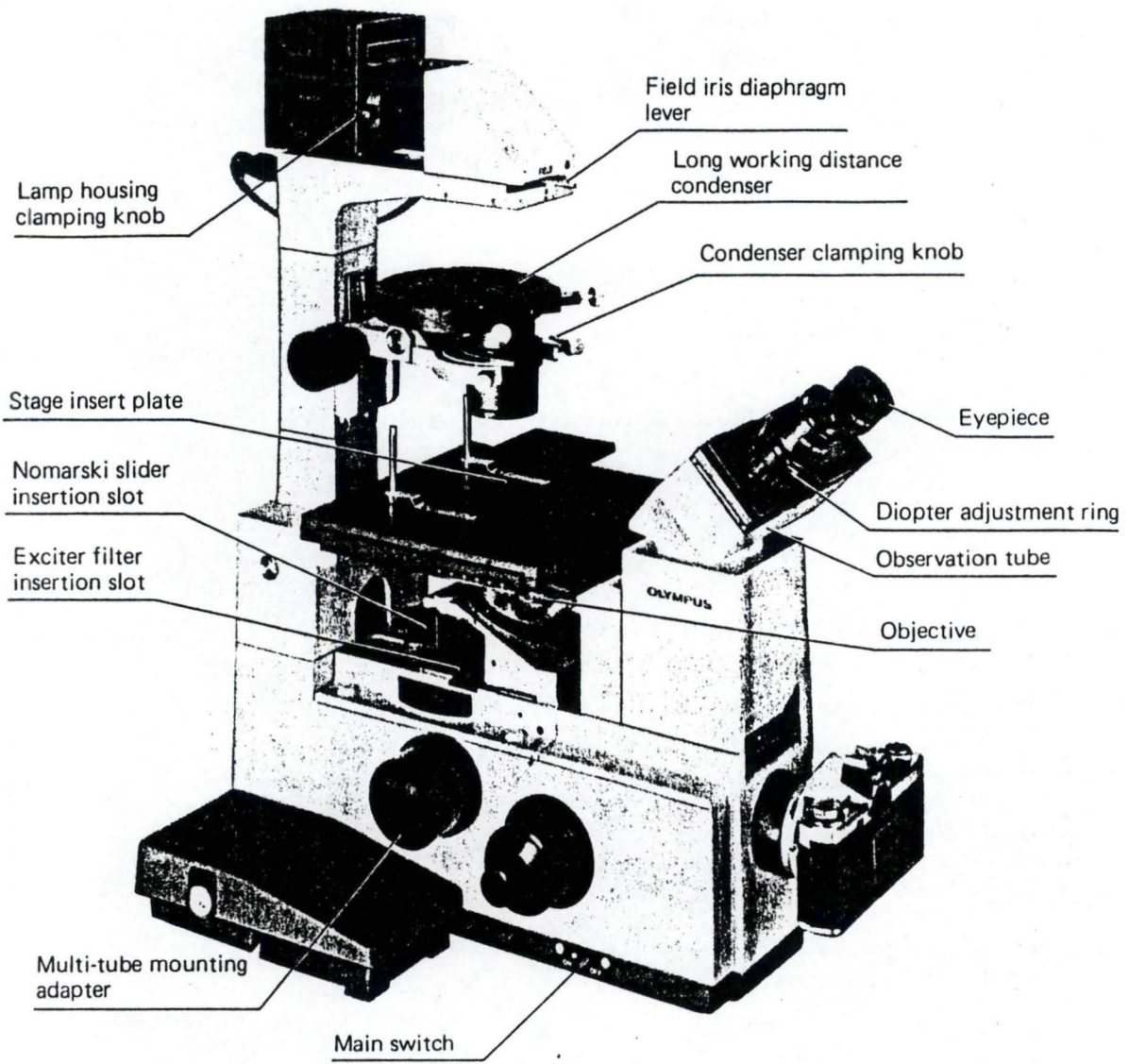
Matériel :

- Microscope inversé et à plateau tournant (Olympus IMT-2-12) (**figure 20**) équipé d'un micromanipulateur (Eppendorf 5171) (**figure 21**).
- Façonneur d'aiguilles (Narishige PB-7 Micropipette Puller) (**figure 22**).
- Aiguilles siliconées et stérilisées (par passage sous des U. V. pendant 15 minutes).
- Huile d'immersion.
- Gouttelette de collection (10 mM Tris-HCl ; 10 mM NaCl ; 250 $\mu\text{g/ml}$ protéinase K) maintenue dans la glace pour éviter une évaporation du liquide.

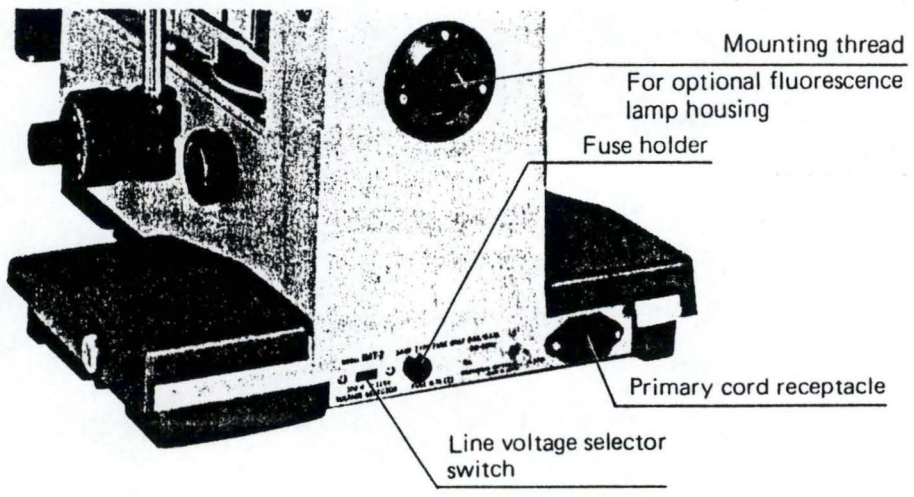


(IMT-2-12 shown)

Figure 20 : microscope inversé équipé d'un plateau tournant Olympus IMT-2-12.



(IMT-2-12 shown)



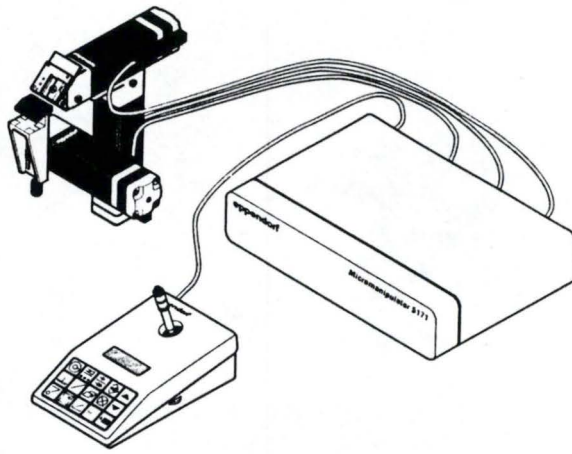


Figure 21 : micromanipulateur Eppendorf 5171.

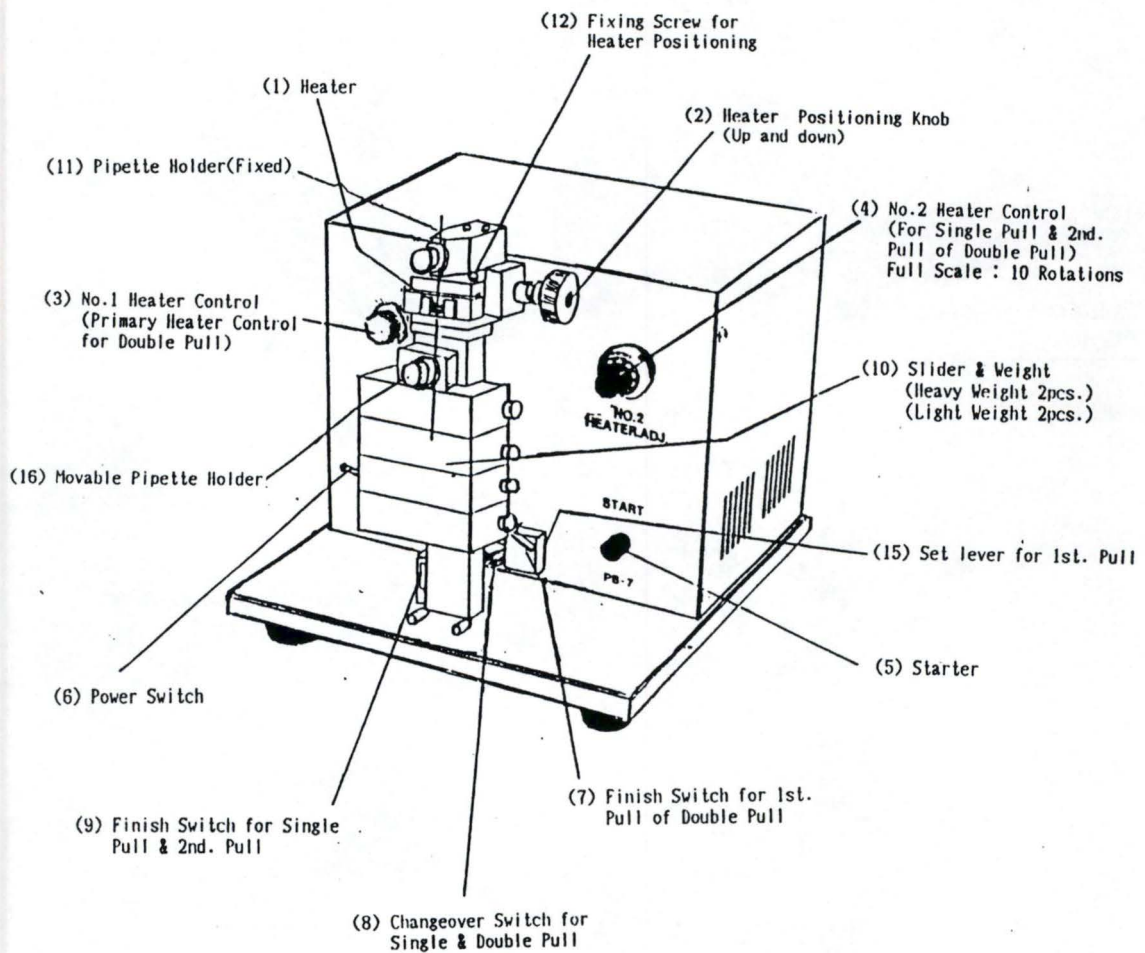


Figure 22 : façonneur d'aiguilles Narishige PB-7 Micropipette Puller.

12. Les lames sont mises à sécher sur du papier pendant minimum 5 minutes pour ensuite être placées à -20°C dans un récipient contenant de l'alcool à 70%.
13. Elles peuvent ainsi être conservées pendant quelques semaines.

Pour les lames de fluorescence *in situ* :

Le procédé est le même, si ce n'est que les lames sont plus épaisses, qu'elles sont lavées au préalable dans une solution d'éther:chloroforme (V:V) et qu'elles sont égouttées et séchées au freezer.

II. Coloration des lames (pour la microdissection).

Protocole :

1. Après avoir été sorties de l'alcool à 70% (ou directement après leur préparation), les lames sont recouvertes de 1 ml de Giemsa 10%.
2. Après 3 à 4 minutes, elles sont rincées à l'eau stérile et séchées à l'air durant 5 à 10 minutes et sont ainsi prêtes à l'utilisation.

D. MICRODISSECTION.

D'après Senger *et al*, 1990.

Protocole :

1. Les lames sont collées (côté métaphases vers le haut) - grâce à un peu d'huile d'immersion - à un support en plastique possédant une ouverture de même forme que la lame mais de dimensions moindres.

2. Le dessous de la lame est recouvert d'une mince couche d'huile, ainsi que l'objectif à immersion du microscope.
3. Un premier repérage de métaphases se déroule à un grossissement de 100 x.
4. Dès qu'une métaphase dont les chromosomes sont assez éparpillés est dans le champ de vision, on change d'objectif et utilise celui à immersion (1000 x).
5. Une fois le chromosome recherché trouvé, on tourne la lame sur son plateau afin de le placer dans l'angle voulu pour la microdissection.
6. On passe au grossissement minimal du microscope (40x).
7. Une aiguille est montée sur une tige adéquate et fixée au micromanipulateur, grâce auquel on peut la déplacer sur la lame.
8. En diminuant la vitesse de progression (de 750 à 5 $\mu\text{m}/\text{sec}$) et en dirigeant l'aiguille ainsi qu'en augmentant le grossissement, on arrive au moment où l'aiguille se situe près du chromosome à microdisséquer, sans toute fois le toucher, ni toucher aucun autre chromosome ou noyau.
9. Délicatement, l'aiguille est dirigée perpendiculairement ou obliquement au chromosome, et dans son avance, elle coupe à travers celui-ci.
10. Une fois la partie voulue disséquée, il faut manipuler latéralement (ou d'avant en arrière, au choix) l'aiguille en la soulevant légèrement (de quelques microns) sur le morceau de chromosome disséqué jusqu'à ce qu'il adhère à l'aiguille.
11. Le micromanipulateur est pourvu d'un programme permettant de dégager l'aiguille de la lame rapidement.
12. Le bout de l'aiguille (auquel adhère l'ADN) est cassé dans le tube eppendorf contenant la gouttelette de collection.
13. Ce schéma se répète jusqu'à l'obtention du nombre voulu de fragments.

Solutions utilisées :

PN Buffer : 0,1 M NaH₂PO₄
0,1 M Na₂HPO₄
0,1% Nonidet P-40 (détergent)
pH 8

PNM Buffer : PN Buffer
5% lait écrémé en poudre
0,02% azide de sodium

Solution d'avidine : 25 µl d'avidine fluorescénée DN à 1 µg/µl
(Vector Laboratories)
5 ml de PNM
concentration finale de l'avidine : 5µg/ml

Solution d'antiavidine : 50 µl d'anticorps antiavidine biotinylée D
à 0,5 µg/µl (Vector Laboratories)
5 ml de PNM
concentration finale d'antiavidine : 5µg/ml

Solution antifade : 10 mg/ml de phénylendiamine dihydrochloride
90% de glycérol
0,2 µg/ml de iodure de propyidium
pH 8

Solution pour dénaturer les métaphases : 70% de formamide
SSC 2x
Eau distillée
pH 7

Tampon d'hybridation : 50% de formamide
10% de dextran sulfate
SSC 2x
0,5 mM Tris-HCl pH 7,6
0,1 mM EDTA
0,1 mg/ml d'ADN soniqué de sperme de
saumon
Eau distillée stérile

Liquide de lavage après hybridation : 50% de formamide
SSC 2x
Eau distillée stérile

Solutions de lavage pour YACs : SSC 4x
SSC 4x/0,1% Triton X-100 (détergent)

E. HYBRIDATION FLUORESCENTE *IN SITU*.

D'après Pinkel *et al.*, 1988 et Selleri *et al.*, 1991.

Protocole :

a) Pour les produits de microdissection.

1. Mesurer la concentration en ADN de la PCR biotinylée.
2. 200 ng d'ADN doivent être prélevés par sonde que l'on veut faire hybrider.
3. Précipiter les sondes (dans un tube eppendorf) :

Par sonde : - 200 ng d'ADN
- 100 à 1000 fois plus d'ADN soniqué de souris
- n μ l d'acétate d'ammonium 4 M (concentration finale de 2,5 M)
- 2 volumes d'éthanol absolu

Laisser minimum 30 minutes dans de la carboglace ou minimum une heure à -70°C .

b) Pour les YACs.

Les YACS sont biotinylés par nick translation. L'ADN génomique total est marqué, et 1 μ g biotinylé servira à faire une sonde, parce que le YAC n'est qu'un des seize chromosomes de levure (donc 1/16ème de μ g).

Matériel :

- Microscope à épifluorescence (lampe U.V. de 100 Watts)
- Objectif Planapo 64x
- Appareil photo
- Film Fujichrome DX 400
- Huile d'immersion

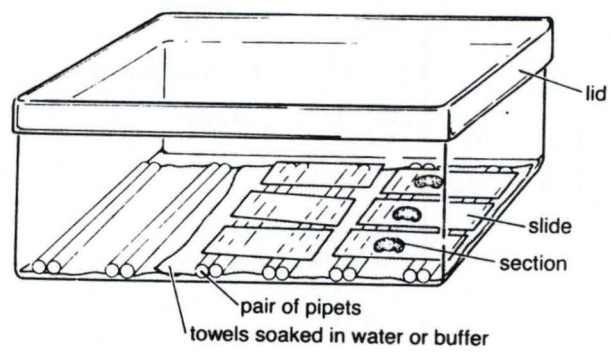


Figure 23 : chambre humide.

La précipitation de la sonde devient :

- 1µg d'ADN total de levure
- 100 à 1000 fois plus d'ADN soniqué de souris
- 1000 fois plus d'ADN de sperme de saumon
- n µl d'acétate d'ammonium 4 M (concentration finale de 2,5 M)
- 2 volumes d'éthanol absolu

Laisser au minimum 30 minutes à -70°C.

c) Pour les produits de microdissection et les YACs.

4. Centrifuger 15 minutes à 12000 rpm.
5. Enlever le surnageant et sécher 10 minutes au Speedvac.
6. Resuspendre le culot dans n fois 15 µl de tampon d'hybridation (n étant le nombre de sondes) et bien mélanger.
7. Dénaturer les sondes à 65°C pendant 10 minutes puis les refroidir dans la glace (5 minutes) et placer à 37°C pendant 2 à 4 heures.
8. Pendant ce temps, sortir de l'alcool 70% les lames préparées pour l'hybridation et les placer dans une boîte carrée de 1 cm de hauteur et possédant un couvercle.
9. Faire chauffer du liquide pour dénaturer les chromosomes à 65°C.
10. Placer les lames à 65°C et les recouvrir de liquide pour dénaturer les métaphases pendant 2 minutes.
11. Etancher directement les lames 5 minutes dans de l'alcool à 70% froid, puis les déshydrater 5 minutes dans une série d'alcool à 85 et 100%.
12. Sécher les lames à l'air sur une plaque chauffante (37°C) pendant 5 à 10 minutes.
13. Après le temps de préhybridation des sondes, placer 15 µl de la préparation au centre de chaque lame et les recouvrir d'une lame couvre-objet.
14. Placer la boîte (sans couvercle) contenant les lames dans une chambre humide (**figure 23**) à 42°C pendant minimum 16 heures.
15. Enlever les lames couvre-objet.

16. Laver les lames 3 fois 3 minutes dans du liquide de lavage après hybridation (préalablement chauffé) à 42°C en agitant les lames légèrement.
17. Laver les lames 3 minutes dans du SSC 2x à température ambiante
18. Laver les lames (en agitant) 15 minutes à 42°C dans du PN Buffer chauffé.
19. Laver les lames 2 minutes à température ambiante dans du PN Buffer.
20. Pour les YACs, laver ensuite les lames 20 minutes à 65°C avec du SSC 0,1x.
21. Placer de 0,5 à 1 ml de solution d'avidine fluorescéinée sur chaque lame et laisser incuber 20 minutes à température ambiante.
22. Rincer 2 fois 2 minutes à température ambiante avec du PN
23. Pour les YACs, remplacer ces lavages par 3 bains de 3 minutes dans du SSC 4x, du SSC 4x/Triton X-100 0,1% et du PN respectivement.
24. Placer de 0,5 à 1 ml de solution d'anti-avidine biotinylée sur chaque lame et laisser incuber 20 minutes à température ambiante.
25. Rincer 2 fois 2 minutes à température ambiante avec du PN.
26. Pour les YACs, remplacer ces lavages par 3 bains de 3 minutes dans du SSC 4x, du SSC 4x/Triton X-100 0,1% et du PN respectivement.
27. Place de 0,5 à 1 ml de solution d'avidine fluorescéinée sur chaque lame et laisser incuber 20 minutes à température ambiante.
28. Rincer 2 fois 2 minutes à température ambiante avec du PN.
29. Pour les YACs, remplacer ces lavages par 3 bains de 3 minutes dans du SSC 4x, du SSC 4x/Triton X-100 0,1% et du PN respectivement.
30. Laisser sécher les lames à l'air pendant 10 minutes.
31. Placer 3 µl de solution "antifade" sur chaque lame et les recouvrir d'une lame couvre-objet.
32. Visualiser au microscope à fluorescence les résultats.

Kit de nick translation:

Mélange de dNTP (10x) : 0,2 mM dCTP, dGTP, dTTP
0,1 mM dATP
0,1 mM biotine-14-dATP
500 mM Tris-HCl (pH 7,8)
50 mM MgCl₂
100 mM β-mercaptoéthanol
100 µg/ml nuclease-free BSA (Albumine de
sérum bovin)

Mélange d'enzymes (10x) : 0,5 unités/µl ADN polymérase I
0,0075 unités/µl DNase I
50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
5 mM acétate de Magnésium
1 mM β-mercaptoéthanol
0,1 mM phénylméthylsulfonyle fluoride
50% (V/V) glycérol
100 µg/ml nuclease-free BSA

ADN contrôle : 5µg pBR322 dans 10 mM Tris-HCl (pH 8) ; 1 mM
EDTA

Tampon d'arrêt : 300 mM EDTA

F. NICK TRANSLATION.

Le système de marquage BioNick (GIBCO-BRL) est adapté afin de générer de petites (50 à 500 pb) sondes d'ADN marquées avec de la biotine par nick translation (via le nucléotide Biotine- 14-dUTP) (**figure 24**). De petites sondes sont importantes pour réaliser une bonne hybridation fluorescente *in situ* et peuvent aider à diminuer le bruit de fond sur des hybridations sur filtre. Nous avons utilisé cette technique afin de biotinyler les YACs, à partir d'ADN génomique total de levures contenant un YAC.

Protocole :

1. Pipetter les quantités suivantes de composants dans un tube eppendorf de 1,5 ml (sur de la glace) :
 - 5µl du mélange de dNTP (10x)
 - 1µg d'ADN
 - Eau distillée pour arriver à 45 µl
 - 5µl de mélange d'enzymes (10x)

2. Mélanger et centrifuger brièvement (15000g pendant 5 secondes).
3. Incuber 1 heure à 16°C.
4. Ajouter 5 µl de tampon d'arrêt.
5. Les nucléotides non incorporés peuvent être séparés de la sonde marquée par la méthode suivante (précipitations répétées à l'éthanol) :
 - Ajouter au tube 1/10ème de volume d'acétate de sodium 3 M et deux volumes d'éthanol pur (ou à 95%) froid. Mélanger.
 - Placer à -70°C pendant 15 minutes ou à -20°C pendant 2 heures.
 - Centrifuger à 15000 g pendant 10 minutes.
 - Enlever le surnageant et sécher le culot.
 - Resuspendre la sonde dans 50 µl d'eau et reprécipiter comme précédemment.
 - Reprendre l'ADN dans 20µl d'eau.

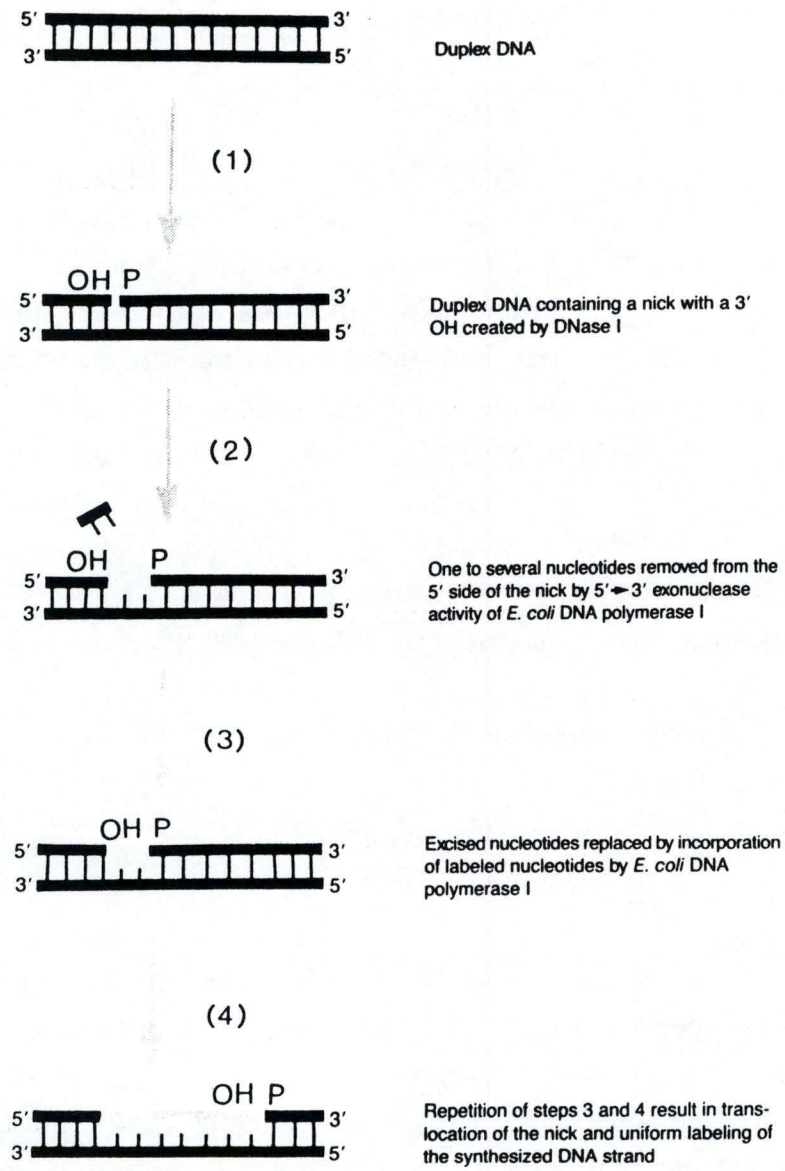


Figure 24 : réaction de nick translation (d'après Current Protocols-3.5.4.).

6. L'ADN peut alors être précipité avec les ADN compétiteurs.
7. Les sondes biotinylées sont très stables et peuvent être gardées à -20°C dans du tampon TE pendant au moins un an.

G. PREPARATION D'ADN GENOMIQUE DE LEVURE.

Protocole modifié d'après Johnston, J., 1989.

Protocole :

1. Faire une culture de levure contenant le YAC (souche AB1380) voulu dans 350 ml de milieu YPD à 30°C jusqu'à saturation.
2. Centrifuger à 3000 rpm pendant 10 minutes.
3. Jeter le surnageant et resuspendre les cellules dans 10 ml de SCE.
4. Centrifuger à 3000 rpm pendant 10 minutes.
5. Eliminer le surnageant et resuspendre les cellules dans 30 ml de SCE, 30 mg de Novozyme et 0.3 ml de DTT. Incuber 2 heures à 37°C .
6. Centrifuger 10 minutes à 3000 rpm. Jeter le surnageant.

Pour vérifier si la paroi des levures a été correctement digérée par le Novozyme, prélever quelques gouttes de sphéropastes, les déposer sur une lame de verre, recouvrir avec une lame couvre-objet et tester la dissolution des membranes (sous microscope) après adjonction d'une solution 0,1% SDS sous le couvre-objet (D. Lafontaine, comm. pers.)

7. Reprendre le culot dans 1 ml de TE, 100 μg de protéinase K 10 mg/ml et 0,1 ml de SDS 10% et incuber 3 heures à 37°C .
8. Faire chauffer le lysat à 65°C pendant 30 minutes et laisser refroidir jusqu'à température ambiante.
9. Ajouter un volume d'une solution de phénol/CIAA (1:1) et mélanger.
10. Centrifuger 10 minutes à 12000 rpm et transférer la phase supérieure (aqueuse) dans un tube propre.
11. Répéter les stades 9 et 10 une fois avec du CIAA seul.

12. Ajouter à la phase aqueuse deux volumes d'alcool absolu froid (-20°C) et placer le tube pendant la nuit à -20°C.
13. Enrouler le précipité autour d'une tige en verre et le dissoudre dans 1 ml de SSC 1/10 plus 100 µl de SSC 10x. Pipetter l'ADN afin de le rendre plus soluble. Laisser reposer quelques heures.
14. Ajouter 50 µl de RNase A (préalablement bouillie) à 10 mg/ml et laisser incuber une heure à 37°C.
15. Répéter les stades 9 à 12.
16. Enrouler l'ADN à l'aide d'une tige en verre et le dissoudre dans 1 ml de TE. Garder à 4°C.
17. Estimer la pureté et la concentration de l'ADN par le rapport entre l'absorbance à 260 nm et l'absorbance à 280 nm.

H. PURIFICATION D'ACIDES NUCLEIQUES :
EXTRACTION PAR PHENOL-CHLOROFORME.

Principe :

Cette technique permet d'éliminer les protéines d'une solution d'ADN. Le phénol est mélangé avec la préparation à purifier dans des conditions qui favorisent la dissociation des protéines de l'ADN. Après centrifugation, on obtient 2 phases : une phase aqueuse contenant les acides nucléiques et une phase organique contenant les protéines. Le chloroforme aide également à la dénaturation des protéines, facilite la séparation des 2 phases et permet l'élimination des traces de phénol. Le phénol doit être équilibré à pH 8, l'ADN passant dans la phase organique à pH acide. L'ADN est ensuite récupéré par précipitation à l'éthanol en présence d'ions monovalents.

Protocole :

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

I. DIGESTIONS ENZYMATIQUES.

Les endonucléases de restriction sont des enzymes qui reconnaissent et clivent des séquences spécifiques (en général de 4 ou 6 bp) au niveau de l'ADN bicaténaire. Les fragments générés possèdent une extrémité 5' phosphate et une extrémité 3' hydroxyle. D'un point de vue pratique, on peut classer ces enzymes en 2 groupes :

- celles hydrolysant les liens phosphodiester de manière à produire des bouts francs (blunt ends).
- celles hydrolysant les liens phosphodiester de manière à produire des extrémités cohésives, soit 3' protrudantes, soit 5' protrudantes.

Protocole:

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

1. Placer l'ADN à digérer dans un tube eppendorf stérile.
2. Ajouter 2 μ l du tampon de digestion adéquat.
3. Ajouter une unité d'enzyme par μ g d'ADN à digérer.
4. Porter à 20 μ l avec de l'eau stérile.
5. Incuber de 1 à 3 heures à température adéquate.
6. Arrêter la réaction par ajout d'EDTA à concentration finale de 10 mM.

Si l'ADN doit être déposé directement sur gel, arrêter la réaction par ajout de 4 μ l de bleu (gel loading buffer).

J. ELECTROPHORESE EN GEL D'AGAROSE.

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

Principe :

A un pH proche de la neutralité, les molécules d'ADN sont chargées négativement. Ces molécules placées dans un champ électrophorétique migrent donc vers l'anode. Le rapport entre la charge et la masse des molécules étant identique quelle que soit la taille des fragments, la séparation des molécules selon leur taille résulte :

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

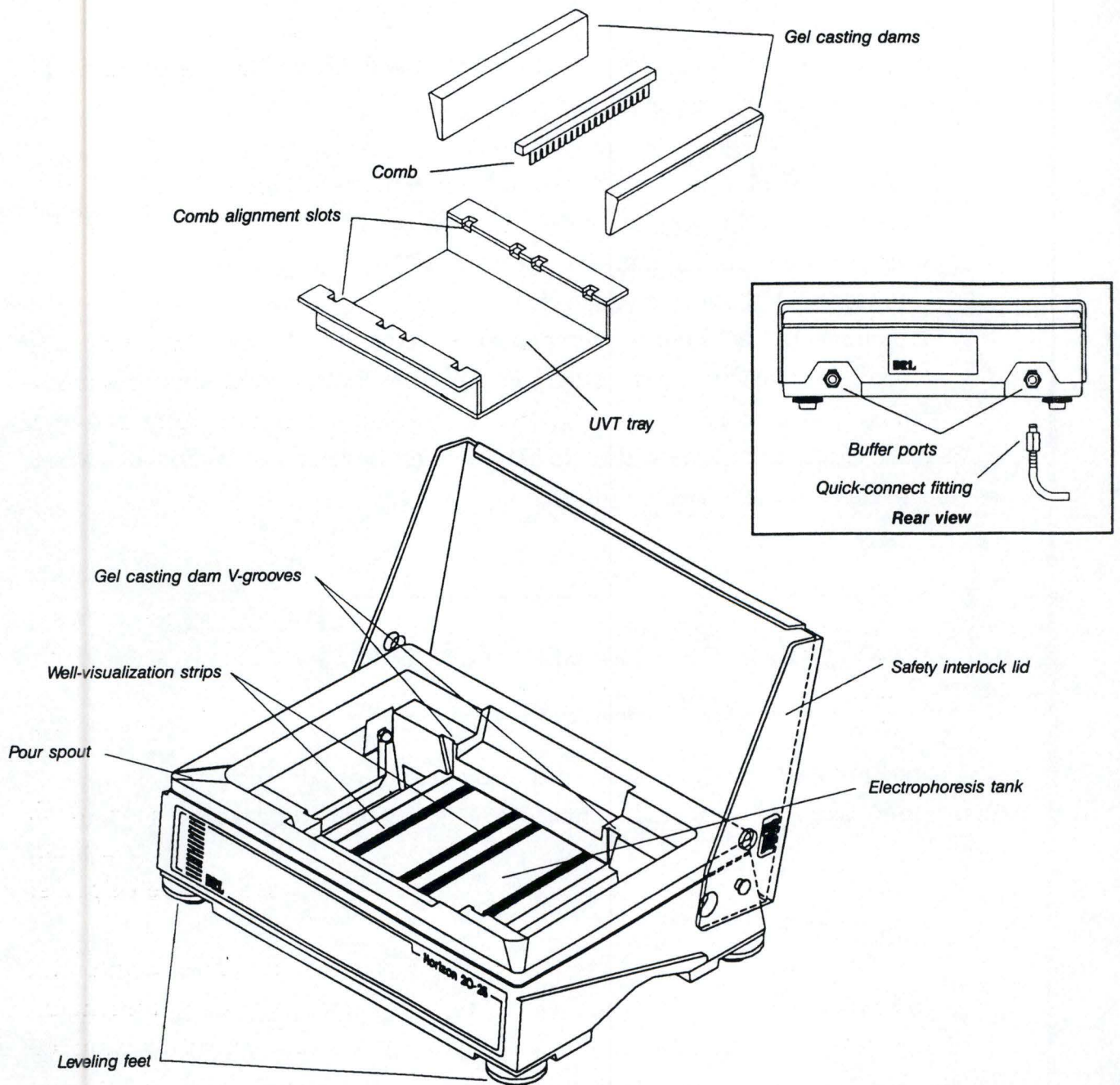


Figure 25 : montage d'un appareil d'électrophorèse sur gel d'agarose (Horizon™).

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

Les molécules bicaténares et linéaires d'ADN migrent à une vitesse qui est inversement proportionnelle au logarithme de leur poids moléculaire.

Visualisation de l'ADN: on utilise un colorant fluorescent, le bromure d'éthidium, qui s'intercale entre les bases de l'ADN. Une fois associé à l'ADN, celui-ci possède une fluorescence accrue qui peut être mise en évidence par illumination sous U.V. (302 nm).

Protocole :

1. Dissoudre l'agarose (0,8%, 1%, ou autre selon la taille des fragments à séparer) dans un volume adéquat de tampon d'électrophorèse (TBE ou TAE) par chauffage au four à micro-ondes.
2. Monter l'appareil d'électrophorèse (Horizon™ 58 BRL) comme représenté ci-contre (figure 25).
3. Lorsque la température du gel est revenue aux environs de 55°C, ajouter le bromure d'éthidium à concentration finale de 0.3 µg/ml, mélanger et couler le gel sur le support en plexiglas. Placer le peigne et laisser solidifier le gel.
4. Pendant ce temps, préparer les échantillons: pour cela, ajouter un sixième de volume de gel loading buffer. Cette solution contient un colorant (bleu de bromophénol) permettant de suivre le front de migration, et un alourdisseur (Ficoll) augmentant le densité des échantillons et entraînant ceux-ci au fond des puits.
5. Enlever le peigne du gel de manière à créer les puits, déposer les échantillons dans les puits et couvrir le tout de tampon d'électrophorèse.
6. Connecter l'appareil à la source de tension et choisir le voltage désiré. Laisser migrer un laps de temps adéquat, en général 2 heures pour un minigel (10 cm de long).

K. SOUTHERN BLOTTING ALCALIN.

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

I. Séparation des fragments de restriction d'ADN génomique par électrophorèse sur gel d'agarose.

1. Digérer une quantité appropriée d'ADN génomique. Pour 2 minigels, 10 μg d'ADN sont suffisants. Utiliser l'enzyme à une concentration de 1 U/ μg d'ADN et digérer environ 2 heures à température adéquate (en général 37°C). On s'arrange pour que le volume de la digestion soit de 20 μl .
2. Après digestion, ajouter 4 μl de bleu et déposer 12 μl du produit de digestion par puits de 15 μl , sur un gel d'agarose 0,8% contenant du bromure d'éthidium (0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) TBE 1 x. Ne pas oublier de déposer un marqueur de taille, par exemple Lambda coupé par *HindIII*.
3. Laisser migrer 2 heures à 80 V.
4. Lorsque l'électrophorèse est terminée, photographier le gel si nécessaire.

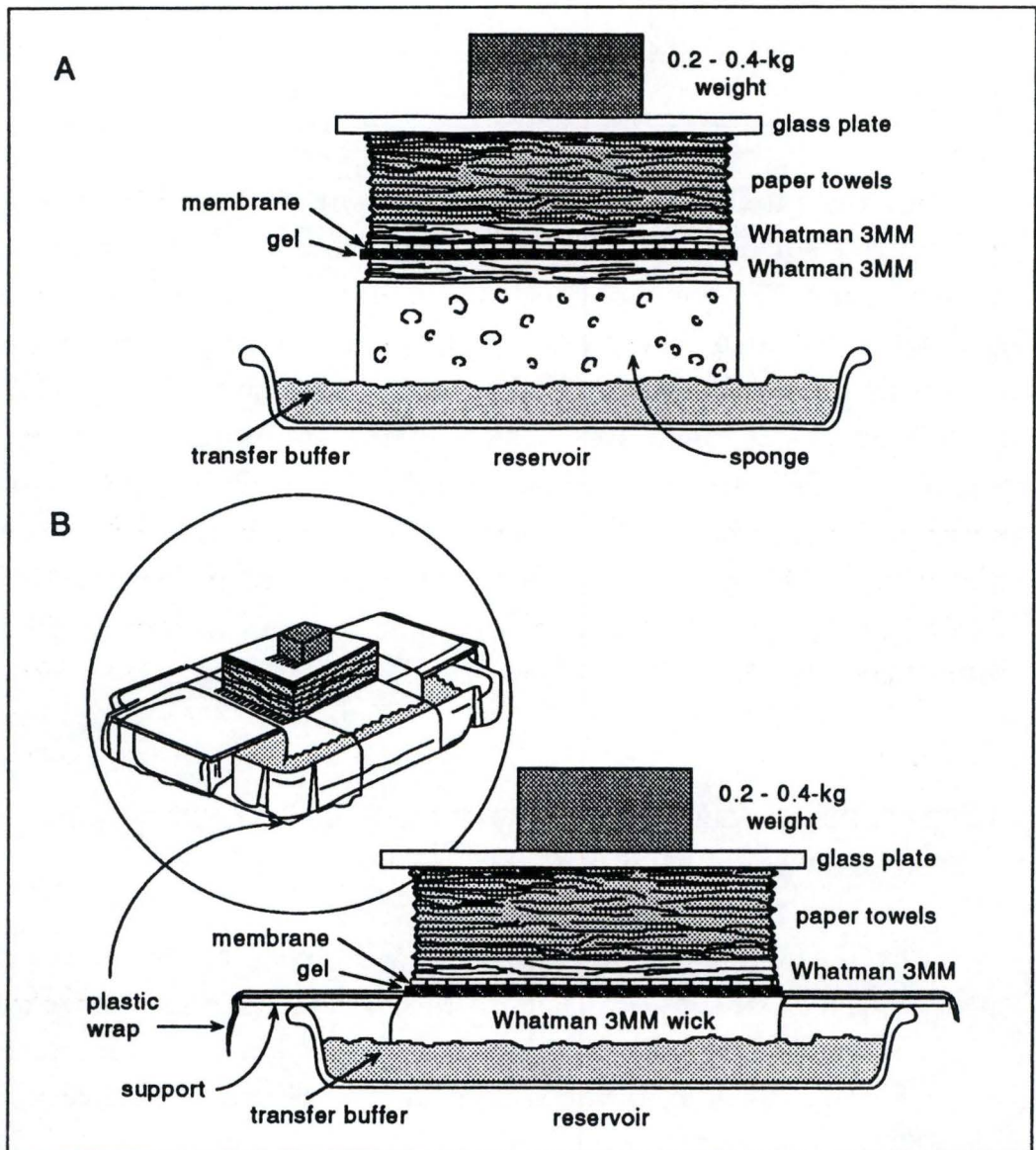


Figure 2.9.1 Two alternative transfer pyramid setups for Southern blotting via upward capillary transfer. (A) Sponge method. (B) Whatman 3MM filter paper wick method.

Figure 26 : montage d'un transfert d'ADN par Southern blotting alcalin (d'après Current Protocols - 2.9.1.).

II. Transfert de l'ADN sur membrane de nylon : Southern blotting alcalin.

Principe :

Il s'agit d'un transfert par capillarité, les fragments d'ADN étant transportés depuis le gel jusqu'à la membrane par un flux de liquide. Ce phénomène de capillarité est assuré par le dépôt, sur le gel, d'un montage de papiers secs.

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

Protocole :

1. Découper la zone intéressante du gel, couper un coin pour l'orientation ultérieure du gel, et mesurer le gel.
2. Découper 10 papiers Whatman 3MM aux dimensions du gel.
3. Découper 3 papiers Whatman de même largeur que le gel, mais plus longs, pour faire le pont lors du transfert.
4. Découper une membrane de nylon (Hybond-N+, Amersham) de même dimension que le gel, avec le repère.
5. Traiter le gel avec 2 ou 3 volumes de HCl 0,25 N, pendant environ 10 minutes, jusqu'à ce que le bleu devienne jaune.
6. Mettre en place la boîte de transfert comme représenté ci-contre (**figure 26**). Placer les papiers Whatman longs et bien saturer le tout en NaOH 0,4 N. Chasser toutes les bulles.
7. Placer le gel sur le papier Whatman en évitant les bulles. Le couvrir largement de NaOH 0,4 N.

8. Saturer la membrane avec le NaOH 0,4 N, la placer sur le gel en chassant les bulles .
9. Placer 2 papiers Whatman aux dimensions du gel, saturés en NaOH 0,4 N, sur le gel, toujours en évitant les bulles.
10. Placer les 8 autres papiers secs sur le tout.
11. Mettre un paquet complet de Kleenex coupés aux dimensions du gel sur le montage, en vérifiant qu'aucun papier ne touche la solution de NaOH. Il faut absolument éviter qu'un court-circuit ne se crée entre la solution de transfert et les papiers.
12. Mettre un couvercle et un poids de 100 g sur le montage pour faciliter le contact du gel avec la membrane.
13. Le transfert est généralement complet après 2 heures. Par sécurité, vérifier aux UV que le gel ne contient plus d'ADN.
14. Rincer la membrane dans de l'eau stérile, puis du SSC 2x.
15. Sécher la membrane à l'étuve entre 2 feuilles de papier Whatman et la stocker ensuite à 4°C, entre le papier Whatman, dans un sac multigrip.

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

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

Principe :

Les filtres sont hybridés avec une sonde radioactive. L'excès de sonde, ainsi que les sondes mal appariées, sont éliminés par lavage des membranes dans des conditions appropriées. Les membranes sont alors autoradiographiées afin de mettre en évidence les résultats du marquage.

Aspects théoriques :

Toutes les méthodes d'hybridation font appel à la capacité de l'ADN dénaturé de se réassocier à une séquence complémentaire, lorsque les conditions de température sont telles que l'on se trouve en dessous de la valeur de T_m . Les réactions d'hybridation peuvent se réaliser en solution ou sur filtre. Les expériences réalisées ici font appel aux techniques d'hybridation sur filtre.

Cette technique met en jeu de l'ADN fixé et dénaturé sur une membrane (Southern), et une sonde simple brin marquée radioactivement. Au cours de l'hybridation de la sonde avec l'ADN fixé sur la membrane, différents types de réaction peuvent se produire :

1. hybridation correcte de la sonde avec la séquence cible fixée sur la membrane,
2. mauvais appariement (mismatch) de la sonde avec des séquences proches de la séquence cible,
3. fixation non spécifique de la sonde sur la membrane de nylon donnant lieu à du bruit de fond (background).

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

Connaissant les facteurs influençant la stabilité des hybrides formés, on peut alors déterminer des conditions expérimentales telles que seuls les hybrides sonde-séquence d'ADN cible subsistent, les autres hybrides étant dissociés. En pratique, on réalise l'hybridation dans des conditions de stringence assez douces. Ces conditions de stringence sont alors modifiées au cours des lavages réalisés après l'hybridation. Au cours de chaque lavage successif, des conditions de stringence de plus en plus fortes sont appliquées, soit en diminuant la concentration saline entre chaque étape, soit en modifiant la température.

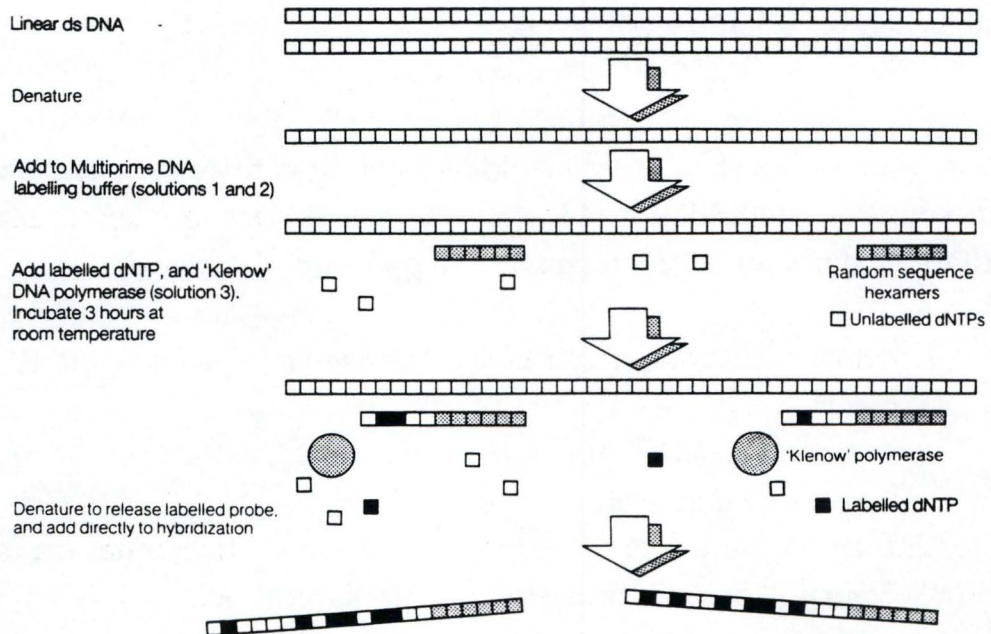


Figure 27 : marquage radioactif d'ADN par MultiPrimed DNA Labelling (Amersham).

I. Marquage radioactif d'une sonde.

Le système Multi-primed DNA labelling system (RPN. 1601 Amersham) permet de marquer in vitro de l'ADN avec des isotopes tels que le ^{32}P , le ^{35}S ou le ^3H . Les activités spécifiques obtenues sont importantes. Un hexanucléotide, dont la séquence est définie au hasard, s'accroche en de nombreux endroits le long de la sonde dénaturée. Le fragment klenow de l'ADN polymérase I incorpore de 5' en 3' les nucléotides présents dans le milieu. Un des nucléotides est porteur de l'isotope.

La longueur des sondes obtenues au cours de la réaction de marquage varie en fonction de :

- la concentration en dNTPs,
- la concentration de la sonde,
- l'isotope utilisé.

Un brin complémentaire est synthétisé par le fragment klenow de l'ADN polymérase d'*E. Coli*, à partir de l'extrémité 3'OH libre des amorces hybridées à une séquence complémentaire du template (**figure 27**). Cette synthèse est réalisée en utilisant un dNTP marqué α -[P-32] dCTP et les 3 autres dNTPs non marqués.

Technique :

1. Dans un tube eppendorf de 1,5 ml, placé dans la glace, ajouter les réactifs dans l'ordre suivant :
 - de 20 à 60 ng d'ADN en solution dans du TE, dénaturé en chauffant à 100°C pendant 3 minutes et placé immédiatement dans la glace afin d'empêcher la renaturation
 - 3 μl de mélange de dATP, dGTP, dTTP à 0,5 mM chacun (BRL)
 - 2 μl de amorce 10x (hexanucléotides, Boehringer)
 - eau distillée de telle sorte que le volume final soit de 20 μl
 - 1 μl d'enzyme (fragment klenow, Boehringer)
 - 4 μl de $^{32}\text{dCTP}$ (3000 Ci/mmol, Amersham)

2. Mélanger le tube, centrifuger quelques secondes (éviter les agitations brutales qui entraînent une réduction sévère de l'activité enzymatique).
3. Laisser incuber la réaction de trois à cinq heures à température ambiante.
4. Eliminer les nucléotides non incorporés par passage sur colonne (A 54, IBF n° 230181) avant d'utiliser la sonde. Cette étape est importante pour éliminer le bruit de fond.
5. Ajouter à la sonde (25 à 500 ng d'ADN dans 50 μ l) 5 μ l d'ADN concentré de souris (50 μ g), 25 μ l de SSC 20x, 10 μ l d'eau et 10 μ l de SDS 1%. Bien mélanger.
6. Dénaturer le mélange à 100°C pendant 5 minutes.
7. Transférer le tube dans un bain à 65°C et laisser incuber au moins 30 minutes.
8. Laisser la sonde et la membrane s'hybrider dans le tampon Church pendant 12 heures à 65°C. La membrane doit avoir été au préalable bloquée au moins 1 heure dans un grand volume de solution Church.

II. Préhybridation des membranes.

Cette étape a pour but d'éviter l'absorption non spécifique de la sonde sur la membrane. Pour cela, la membrane est bloquée, c'est à dire qu'elle est saturée de manière à empêcher la fixation de l'ADN sur les sites d'adhésion non spécifiques.

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

III. Lavage des membranes.

Cette étape permet d'éliminer l'excès de sonde ainsi que les sondes appariées de manière incorrecte. Le degré de stringence appliqué au cours des lavages est déterminé par l'expérimentateur. Les conditions de stringence doivent par exemple être plus douces si l'on réalise des marquages hétérologues (par exemple marquer de l'ADN de souris avec une sonde de hamster). En suivant l'évolution de la radioactivité au cours des lavages, et en fonction du comportement plus ou moins attendu en théorie, on peut décider d'arrêter un lavage à un degré de stringence donné.

Préincuber les solutions à 65 °C avant leur utilisation.

1. Aspirer la solution d'hybridation couvrant les membranes .
2. Recouvrir la membrane de NaPi 40 mM/SDS 0,1% et incuber 30 minutes à 22°C sous agitation.
3. Après 30 minutes, éliminer la solution de lavage.
4. Contrôler la radioactivité au compteur Geiger.
5. Couvrir de la solution de lavage et incuber à nouveau 15 minutes à 65°C.
6. Recommencer les opérations précédentes jusqu'à obtention d'une radioactivité voulue.

IV. Autoradiographie des membranes.

1. Après lavage, essorer (sans les sécher) les membranes entre 2 feuilles de papier Whatman 3MM.
2. Placer dans une cassette pour autoradiographie une feuille de papier saran.
3. Placer la membrane sur le papier saran et replier celui-ci de manière à recouvrir entièrement la membrane.
4. Placer un film (Kodak X-Omat AR) sur la membrane.
5. Placer la cassette à - 70°C un nombre d'heures adéquat (par exemple 2 jours pour un Southern) jusqu'au développement.

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

Recouvrir la membrane d'une solution bouillante de SDS 0,5%. Laisser refroidir, rincer dans de l'eau distillée stérile, puis dans une solution de SSC 2x. Sécher la membrane entre 2 feuilles de papier Whatman 3MM, et la placer dans une étuve à 50°C. Lorsque la membrane est bien sèche, la stocker à 4°C dans un sac multigrip, entre 2 feuilles de Whatman.

M. TECHNIQUE DE PCR.

ADN polymérase :

L'introduction d'une ADN polymérase thermostable, la Taq polymérase, isolée à partir de la souche bactérienne thermophile *Thermus aquaticus* a grandement facilité l'utilisation de la PCR, permettant le développement de cycleurs automatiques. Cette enzyme possède un optimum de température se situant aux environs de 75°C. Ceci a permis de réaliser les étapes d'hybridation et d'élongation à des températures plus élevées, augmentant ainsi la spécificité des réactions et résolvant les problèmes de structure secondaire. De plus, le rendement est supérieur à celui de la klenow utilisée pour les premières PCR, et les fragments amplifiés peuvent être de taille plus importante (jusqu'à 10 Kb).

L'enzyme nécessite la présence d'ions magnésium dans le milieu, et peut être inhibée par des concentrations trop élevées en DMSO (10%) (diméthyl sulfonate) ou en SDS (0.01%). L'urée et l'éthanol semblent avoir un effet activateur. La fidélité de l'enzyme a largement été étudiée, celle-ci ne possédant pas d'activité "proof-reading" 3'-5' exonucléase. Les derniers résultats donnent un taux de mutation moyen de $5 \cdot 10^{-6}$ nucléotides mal incorporés par cycle (environ une mutation pour 15 000 nucléotides, en considérant 30 cycles). Ce taux d'erreur ne pose cependant aucun problème pour la plupart des applications.

Lors de réactions d'amplification de séquences complexes, telles que de l'ADN génomique, la concentration en enzyme est en général de 2,5 U/100 μ l de réaction. Augmenter la concentration au delà de cette valeur conduirait non pas à une augmentation du rendement, mais à une accumulation plus importante de produits non spécifiques.

Choix des amorces :

Il n'existe aucune règle permettant de choisir des amorces qui seront efficaces à coup sûr. Pourtant, ce sont les amorces, plus que tout autre élément, qui déterminent le succès ou l'échec d'une PCR. Les amorces typiques ont de 15 à 30 nucléotides de longueur, et une composition de 50 à 60% en G+C.

Quelques règles peuvent cependant être observées lors du choix d'une amorce :

1. Eviter les séquences contenant des régions de polypurines ou polypyrimidines.
2. Eviter les séquences donnant lieu à des structures secondaires, surtout à l'extrémité 3' de l'amorce.
3. Vérifier que les 2 amorces choisies ne soient pas complémentaires l'une de l'autre au niveau de leur extrémité 3'. Ceci conduirait à la synthèse d'artéfacts (dimères d'amorces), diminuant gravement le rendement du produit cible.

La température d'hybridation d'un couple d'amorces donné est à adapter en fonction de la composition en bases. On peut prendre comme point de départ la règle suivante : additionner 2°C par base A ou T et 4°C par base G ou C. En général, les concentrations en amorces utilisées lors d'une réaction de PCR varient de 0,05 μ M à 1 μ M.

Top View
(1.5 ML Block Shown)

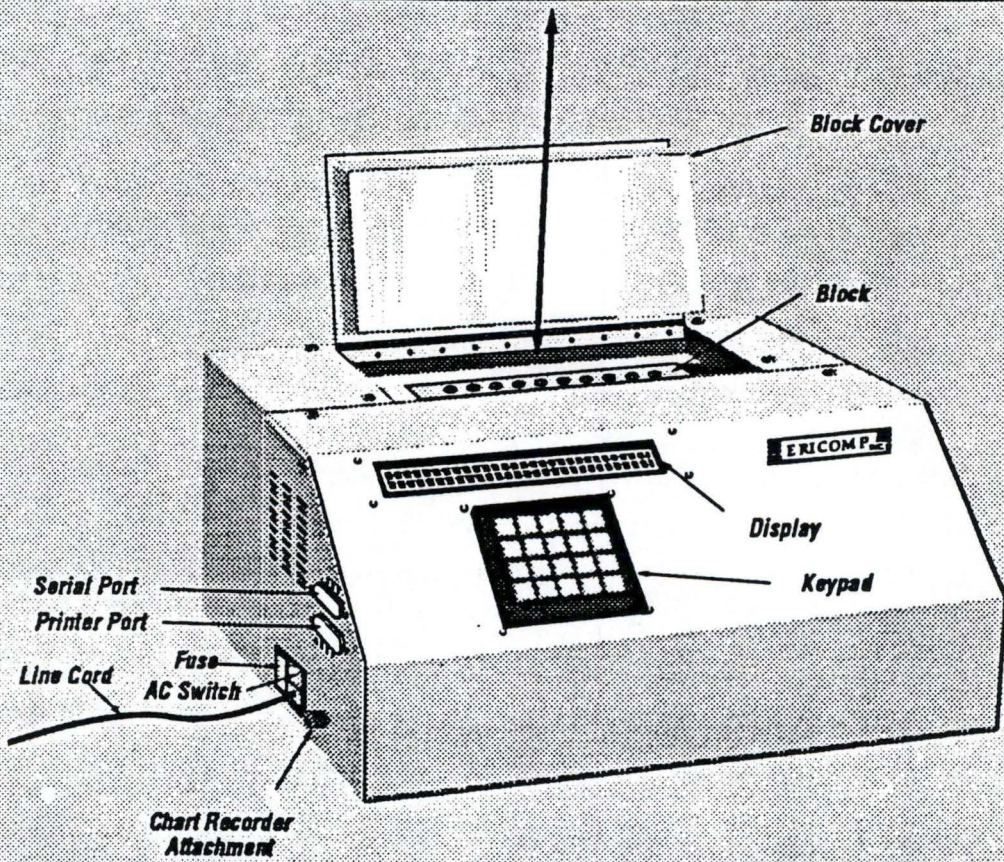
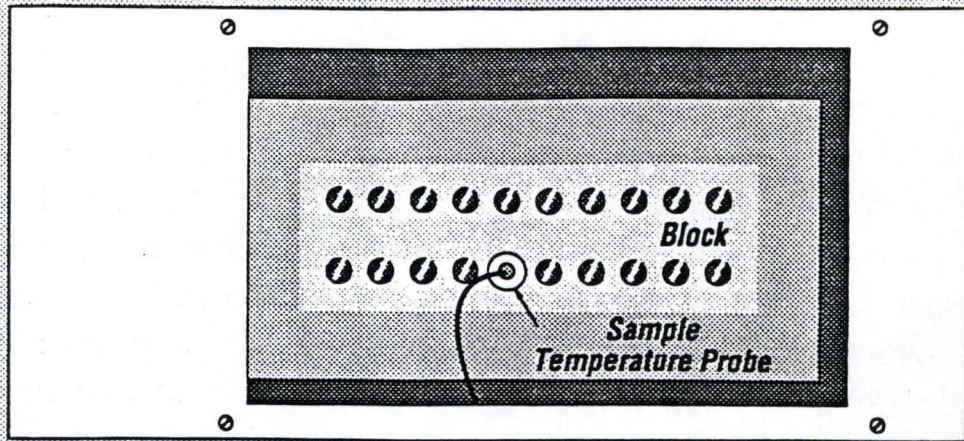


Figure 28: cycleur automatique.

Le tampon de PCR :

La concentration en magnésium a un effet important sur la spécificité et le rendement de la réaction. Des concentrations de 1,5 mM sont en général adéquates pour une concentration en dNTPs de 200 μ M. Un excès de magnésium conduit à une accumulation de produits non spécifiques, alors qu'une concentration trop faible diminue le rendement de la réaction. Il faut éviter d'utiliser une concentration en dNTPs supérieure à 200 μ M. Cette concentration est suffisante pour synthétiser 12,5 μ g d'ADN avec incorporation de 50 % des dNTPs. Une concentration trop importante risquerait d'augmenter le taux d'erreur de l'enzyme. De plus, les dNTPs captent les ions magnésium, diminuant ainsi la quantité de Mg^{2+} réellement disponible pour l'enzyme. Les 4 dNTPs doivent être utilisés à concentration égale pour éviter les erreurs d'incorporation. De plus, il semble que des concentrations faibles en dNTPs diminuent le risque de mismatch entre les amorces et les séquences cibles, et diminuent le risque d'élongation à partir d'un nucléotide mal incorporé.

Les conditions du cycle :

La PCR est réalisée en soumettant les échantillons à 3 températures successives différentes correspondant aux 3 étapes du cycle : dénaturation, hybridation et extension. Les réactions sont réalisées dans un cycleur automatique (Ericomp) (figure 28).

- a) **Dénaturation** : Il est très important qu'une séparation complète des 2 brins soit réalisée au cours de cette étape. Pour cela, une incubation d'une minute à 95°C est suffisante. On peut également commencer la réaction de PCR par incubation 5 à 10 minutes à 95°C pour assurer que tout le matériel soit parfaitement dénaturé pour l'étape d'hybridation des amorces.
- b) **Hybridation (annealing)** : Il est important que les amorces s'hybrident de manière stable à la cible. La température d'hybridation doit donc être déterminée en fonction de la composition en base des amorces.

En général, 55°C est une bonne température pour un amorce de 20 bases, avec 50% de G+C. Des températures plus basses peuvent être nécessaires, avec alors le risque de voir s'accumuler des produits non spécifiques. Les amorces étant ajoutées en très large excès, l'hybridation se fait de manière quasi instantanée. Ceci veut dire que 30 à 60 secondes sont largement suffisantes pour l'étape d'hybridation.

- c) **Extension** : L'extension se fait à une température de 72°C, proche de l'optimum de température la Taq ADN polymérase. Le temps d'extension dépend principalement de la longueur de la séquence cible. On compte en général 1 minute pour 2000 pb, ce laps de temps étant largement suffisant. Pour des séquences très longues, on peut augmenter le temps d'élongation jusqu'à 15 minutes. Au cours des derniers cycles de PCR, la quantité de Taq ADN polymérase peut devenir limitante. Il est donc conseillé de terminer une réaction de PCR par une incubation supplémentaire de 10 minutes à 72°C de manière à assurer la terminaison de toutes les séquences commencées.

Le nombre de cycles :

Le nombre de cycles dépend de la concentration initiale de la séquence à amplifier. Il faut remarquer qu'un nombre de cycles trop important ne conduit qu'à une accumulation supplémentaire de produits non spécifiques. En fonction de la quantité de séquences cibles, on pourra appliquer le nombre de cycles suivant :

3 10 ⁶ molécules cibles	25 à 30 cycles.
1,5 10 ⁴ "	30 à 35 cycles.
10 ³ "	35 à 40 cycles.
50 "	40 à 45 cycles.

A titre d'indication, 1 µg d'ADN génomique contient environ 3 10⁵ molécules d'une séquence cible unique.

Facteurs affectant la spécificité :

Des températures d'hybridation et d'extension élevées, ainsi que des concentrations plus faibles en dNTPs, semblent diminuer le nombre d'amorces mal appariées ainsi que l'extension de ces mismatches. On peut aussi réduire les temps d'hybridation et d'extension, limitant ainsi la formation de mismatches et leur extension. La réduction des concentrations d'amorces et d'enzyme limite également le risque de formation de produits non spécifiques.

Protocole standard d'une PCR :

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

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

Matériel :

La Taq ADN polymérase (Proméga) est fournie dans un tampon contenant des agents stabilisants pour les hautes températures (solution de stockage : 50 % glycérol, 50 mM Tris-HCl pH8, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1,0 % Triton X-100). La firme fournit également le tampon 10 x (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9, 1 % Triton X-100), et le MgCl₂ (25 mM). Les dNTPs (Boehringer), sont dilués à une concentration stocks de 10mM.

L'ADN, ainsi que les amorces, ont été préparés ou synthétisés au laboratoire. Différents protocoles peuvent être utilisés. Ils sont mentionnés dans les chapitres voulus dans les Résultats et discussions. Le procédé de PCR est maintenant automatisé et les durées des cycles et les températures des échantillons peuvent faire l'objet de programmes.

Programme 1 :

1 cycle de 4 minutes à 93°C
 8 cycles de 1 minute à 94°C
 1 minute à 30°C
 3 minutes à 72°C
 28 cycles de 1 minute à 94°C
 1 minute à 56°C
 3 minutes à 72°C
 1 cycle de 10 minutes à 72°C

Programme 2 :

1 cycle de 4 minutes à 94°C
 25 cycles de 1 minute à 94°C
 1 minute à 56°C
 1 minute à 72°C
 1 cycle de 10 minutes à 72°C

Programme 3 :

1 cycle de 4 minutes à 94°C
 35 cycles de 1 minute à 94°C
 2 minutes à 55°C
 3 minutes à 72°C
 1 cycle de 10 minutes à 72°C

Après réaction, conserver les échantillons à 4°C jusqu'à analyse. Pour vérifier les résultats de la PCR, déposer un dixième de la réaction sur un gel d'agarose 1 %, avec marqueur de poids moléculaire Lambda coupé par *HindIII*.

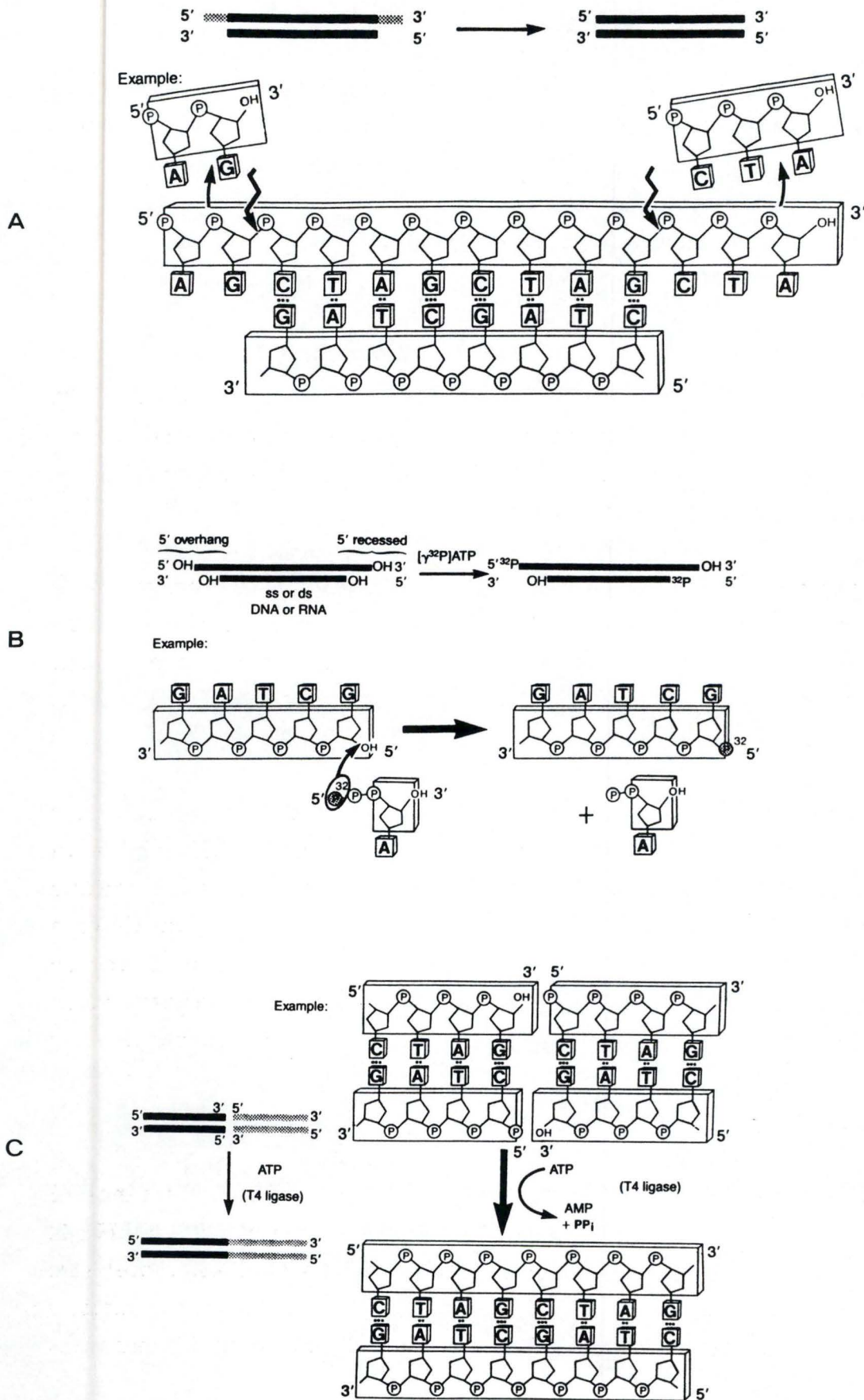


Figure 29 : méthode klenow-kinase-ligase. En A., activité exonucléasique de la klenow. En B., phosphorylation par la kinase. En C., ligation par la ligase (d'après Current Protocols - 3.10.2 3.11.1. et 3.14.2).

N. KLENOW-KINASE-LIGASE.

D'après Lorens, 1991.

Principe :

Il est fréquent de vouloir cloner les produits de PCR, surtout quand ils caractérisent un produit de population hétérogène. Afin de réaliser un tel clonage, des sites de restriction sont souvent inclus dans la partie 5' des primers, ceci permettant un clonage direct.

Néanmoins, ce type de technique présente de faibles fréquences de clonage, peut-être à cause d'une digestion enzymatique incomplète, ou d'un "carryover" de la Taq polymérase. Des stratégies de clonage faisant intervenir des adaptateurs ou des lieurs sont envisageables, mais elles font intervenir de nombreuses étapes de purification.

Le protocole que nous avons utilisé permet un clonage efficace (10^6 transformants/ μg de vecteur). La ligation de produits de PCR génère un substrat nucléique multimérique pour une restriction enzymatique complète. L'incubation commune de la klenow, de la T4 polynucléotide kinase et de la T4 ADN ligase crée un substrat nucléique sous forme de concatémère en éliminant les bouts protrudents, en phosphorylant et en liant les extrémités des produits de PCR en une seule étape (**figure 29**).

Protocole :

1. Faire un phénol-chloroforme et une précipitation à l'éthanol (2 volumes) et à l'acétate de sodium 0,3 M (concentration finale), pH 5,2, sur les produits de la PCR de microdissection (si l'ADN doit être phosphorylé ou "tailed", il convient d'éviter de précipiter à l'acétate d'ammonium parce que les ions ammonium inhibent les enzymes nécessaires à ces processus).

2. Dissoudre le précipité dans de l'eau distillée. Ajouter 2 μ l de tampon ligase 10 x (300 mM Tris-HCl pH 7,8, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP).
3. Ajouter les dNTPs de telle sorte qu'ils soient à une concentration de 0,2 mM, 5 U (unités) de klenow, 4 U de T4 polynucléotide kinase et 2 U de T4 ADN ligase dans un volume final de 25 μ l.
4. Incuber à 25°C pendant 1 à 2 heures.
5. Inactiver les enzymes à 70°C pendant 10 minutes. Diluer la solution dans un double volume de tampon de restriction et faire une restriction avec 40 U d'enzyme pendant 2 heures à la température recommandée pour l'enzyme utilisée.
6. Purifier par phénol/chloroforme. Précipiter l'ADN par l'éthanol et l'acétate d'ammonium 2,5 M, liguer au vecteur et transformer la cellule-hôte (ici: *Escherichia coli*).

O. RECUPERATION DES INSERTS CLONES.

D'après Telenius *et al.*, 1992.

Principe :

Le site de restriction contenu dans l'amorce que nous avons utilisée est celui de l'enzyme *XhoI*. Après avoir lié les fragments de microdissection amplifiés par PCR, nous avons digéré le concatémère avec *XhoI* et le vecteur Bluescript par *SalI*. Les sites *XhoI* et *SalI* possèdent 4 nucléotides en commun, de sorte que deux fragments coupés par ces deux enzymes peuvent être liés ensemble. Néanmoins, aucun des deux sites n'est totalement restitué, c'est pourquoi, pour sortir les inserts des plasmides, il nous a fallu synthétiser des amorces flanquant l'insert et procéder à une PCR.

Rem. : Après la ligation, si les deux sites *SalI* et *XhoI* ne sont pas reconstitués, au centre du site hybride se trouve la séquence TCGA qui est le site de restriction de l'enzyme *TaqI*. Si cette séquence n'était pas si fréquente dans l'ADN, nous aurions pu sortir les inserts par digestion par cette enzyme.

Les amorces ont été nommées BSSalL et BSSalR (pour Bluescript *SalI* Left et Right respectivement) et ont la séquence suivante :

BSSalL : 5' CGATATCAAGCTTATCGATACC 3'

BSSalR : 5' GGGTACCGGGCCCCCCTCGAG 3'

Protocole :

Rem. : Ce protocole est une variante de celui décrit dans Current Protocols in Molecular Biology (Boiling miniprep).

1. Dans un tube eppendorf de 1,5 ml, mettre 1 ml de milieu LB, 2 µl de tétracycline et une colonie blanche prise au hasard.
2. Incuber 6 heures à 37°C sous agitation.
3. Centrifuger 20 secondes.
4. Resuspendre le culot dans 100 µl de TE pendant 5 minutes à température ambiante.
5. Centrifuger 20 secondes.
6. Resuspendre le culot dans 65,5 µl d'eau distillée et faire bouillir pendant 2 minutes.
7. Centrifuger 20 minutes à 4°C à 15 000 rpm.
8. Reprendre le surnageant (contenant les plasmides) pour faire une PCR dans 100 µl. Le programme de PCR utilisé dans ce cas est le **programme 3**.

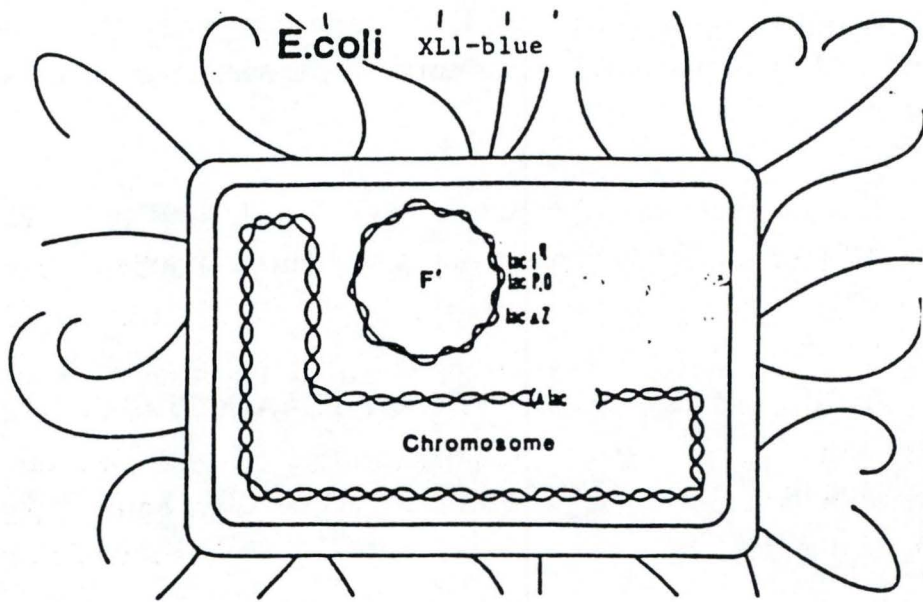


Figure 30 : souche bactérienne XL1 Blue (*E. Coli*).

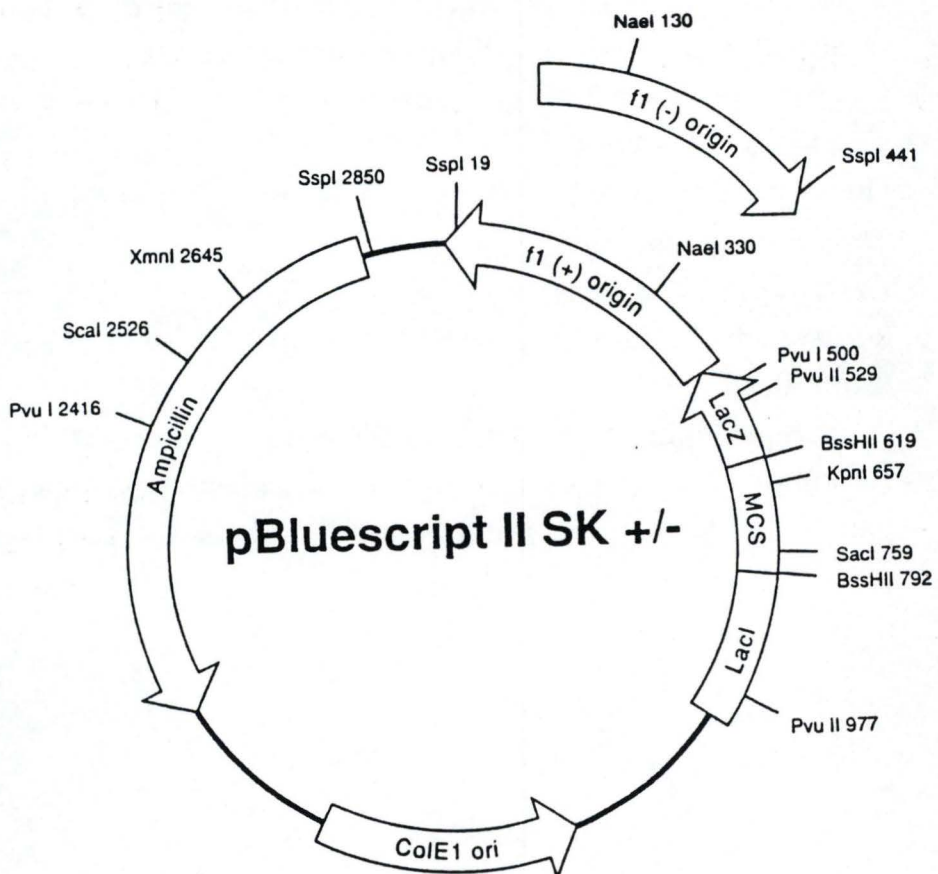


Figure 31 : plasmide pBluescript SK^{-/+}.

P. TECHNIQUES D'ADN RECOMBINANT.

I. Souche bactérienne.

La souche bactérienne utilisée est XL1 Blue d'*E.Coli* (figure 30). Cette souche est rec A1, end A1, gyr A96, thi, hsd R17, rk⁻, mk⁺, sup E44, rel A1, l⁻, lac⁻. Elle possède l'épisome F' qui est pro AB, lac I^qZ DM15, Tn10 (tetR), et une délétion au niveau de l'opéron lactose (région lacZ), permettant la sélection blanc-bleu (voir ci-dessous). Rec A1 réduit le taux de recombinaison entre l'ADN endogène et l'ADN introduit. End A1 diminue le taux d'endonucléase, préservant l'ADN préparé à partir de cette souche.

L'épisome F' est responsable de la formation de pili sexuels chez la bactérie. Il porte un marqueur de résistance à la tétracycline, permettant la sélection des bactéries portant l'épisome. Il porte une partie du gène lac Z (ZDM15) délété sur le chromosome bactérien (l'extrémité COOH de la β -galactosidase, promoteur et opérateur). L'autre partie devra être fournie par de l'ADN exogène. L'épisome F' possède également le gène lac I^q produisant 10 fois plus de répresseur que le gène normal, empêchant la transcription de lac Z, et évitant ainsi les risques de production de protéines de fusion toxiques lac Z-insert. (La répression peut s'exercer aussi bien sur F' que sur pSK⁻).

II. Le plasmide bactérien.

Le vecteur utilisé est pBluescript SK⁻ (Stratagene) (figure 31). Ce plasmide de 2960 bp possède une origine de réplication pour *E. Coli*, un site multiple de clonage contenant 21 sites uniques, et un gène de résistance à l'ampicilline, permettant la sélection des bactéries ayant incorporé le plasmide.

alpha-complementation

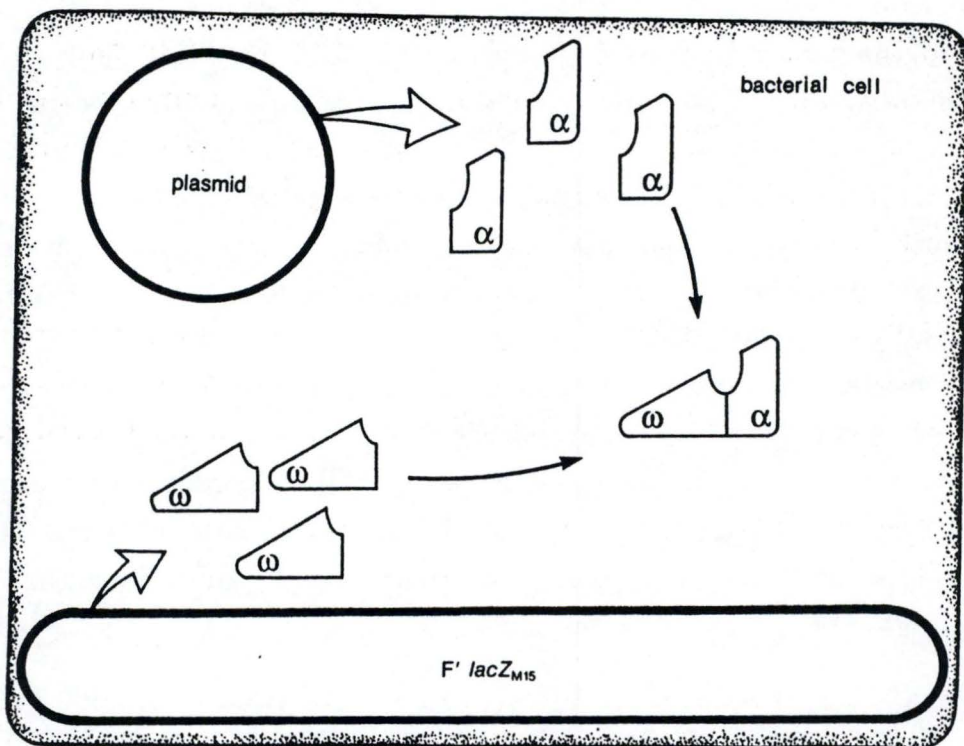
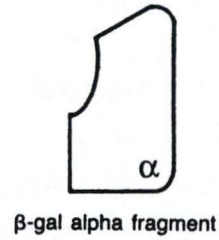
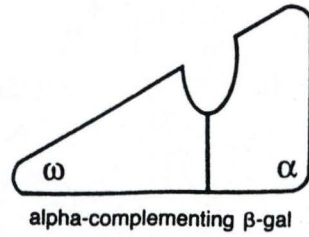
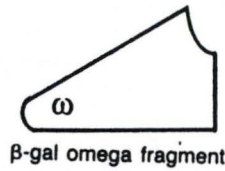
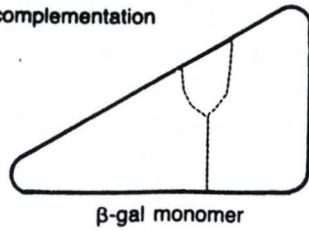


Figure 32 : test blanc/bleu (d'après Current Protocols -1.4.4.).

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

III. Principe du test blanc-bleu.

Ce test permet la sélection de bactéries ayant incorporé un plasmide recombinant (figure 32). L'opéron lactose est constitué de 3 gènes (lac Z, lac Y et lac A) intervenant dans le métabolisme du lactose. Le gène lac Z code pour une β-galactosidase (enzyme qui transforme le lactose en glucose + galactose). Cette β-galactosidase est composée de 4 sous-unités peptidiques identiques, associées par interactions faibles pour donner la forme active. Lorsque la cellule croît dans un milieu riche en glucose ou en l'absence de lactose, la transcription de l'opéron est bloquée par une protéine répresseur codée par le gène lac I^q.

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

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

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

L'association des fragments α et ω permet la reconstitution d'une β -galactosidase active (α -complémentation, correspondant à une complémentation au sein d'un même gène). L'activité de la β -galactosidase est mise en évidence par un test coloré. Pour cela, la culture des bactéries est réalisée en présence des composés X-Gal et IPTG. L'X-Gal est décomposé par l'enzyme en galactose + un chromophore bleu. On obtient donc des colonies bleues si aucun insert n'a été incorporé dans le plasmide.

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

IV. Réaction de ligation.

Principe :

Cette réaction permet de réassocier 2 fragments d'ADN, par exemple un vecteur linéarisé et un insert. L'enzyme utilisée est la T4 ADN ligase, catalysant la formation d'un lien phosphodiester entre le groupement 5'-phosphate et 3'-OH de 2 fragments adjacents d'ADN bicaténaire. La réaction de ligation peut être réalisée aussi bien sur des extrémités cohésives que sur des molécules à bouts francs. L'enzyme nécessite la présence d'ATP ou de magnésium pour être active. Seules des réactions mettant en jeu des fragments d'ADN à bouts francs ont été réalisées ici.

Protocole :

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

Solutions utilisées :

Milieu LB : 950 ml d'eau distillée
10 g de bactotryptone
5 g de yeast extract
5,5 g de NaCl.

Attendre que la solution soit revenue à une température d'environ 50°C avant d'ajouter des substances thermolabiles telles que des antibiotiques (ampicilline : 50 µg/ml ; tétracycline : 10 µg/ml).

Milieu SOC : 0,5% d'extraits de levure
2% de tryptone
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM glucose

Boîtes LB :

Préparer du LB liquide comme ci-dessus. Ajouter 15 g de bacto-agar avant d'autoclaver. Après stérilisation, agiter le milieu de manière à bien répartir l'agar liquéfié et laisser refroidir jusqu'à environ 50°C avant d'ajouter des composés thermolabiles au milieu. Couler ensuite la solution dans des boîtes de pétri de format adéquat, en évitant de former des bulles et laisser sécher les boîtes 2 à 3 heures sous la hotte à flux laminaire. Entourer les boîtes de parafilm et les conserver, inversées, à 4°C.

Boîtes agar contenant une solution d'X-Gal + IPTG :

A réaliser 30 minutes avant l'étalement de la culture. Sur des boîtes fraîches, étendre 40 µL d'IPTG (100 mM), bien faire pénétrer, puis étendre 100µl d'X-Gal (2%). Laisser sécher sous la hotte à flux laminaire. Attention, ne pas mélanger l'X-Gal et l'IPTG (risques de précipitation).

Ampicilline 2000X :

Préparer une solution à 100 mg/ml dans de l'eau distillée. Stériliser par passage sur filtre millipore de 0,22 µm de diamètre. Aliquoter par 500 µl et conserver à -20°C.

Tétracycline 500X :

Préparer une solution à 5 mg/ml dans de l'éthanol 70 %. Aliquoter par 1 ml et stériliser par passage sur millipore 0,22 µm de diamètre. Conserver à -20°C.

1. Préparer le mélange de ligation suivant :
 - 100 ng de vecteur linéarisé.
 - x ng d'insert pour obtenir un rapport insert : vecteur de 2:1.
 - 2 µl de tampon de ligation 5x (250 mM Tris-HCl pH 7,6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT, 25 % polyéthylène glycol-8000).
 - 2 U de T4 ADN ligase (BRL).
 - eau distillée stérile jusqu'à 10 µl.
2. Incuber une nuit à 4°C ou 2-3 heures à température ambiante.

V. Réaction de transformation (par électroporation).

Principe :

L'électroporation par un haut voltage est actuellement la technique la plus efficace pour transformer *E. Coli* avec un plasmide. L'électroporation peut se faire en utilisant des cellules fraîchement préparées ou préalablement congelées. Avec des cellules fraîchement cultivées, cette technique engendre plus de 10⁹ bactéries transformantes par microgramme de plasmide utilisé.

Protocole :

1. Inoculer 5 ml de milieu LB avec des cellules d'une colonie d'*E. Coli*. Laisser pousser 5 heures minimum à 37°C sous agitation modérée.
2. Inoculer 2,5 ml de cette culture dans 500 ml de milieu LB dans un erlen stérile de 2 l. Laisser pousser à 37°C sous forte agitation jusqu'à obtenir une D. O. de 0,5 à 0,7.
3. Refroidir les cellules dans un bain d'eau glacée pendant 10 à 15 minutes et transférer dans une bouteille de centrifugation stérile de 1 litre (froide).
Rem. : les cellules doivent être gardées à 2°C lors des étapes suivantes.
4. Centrifuger les cellules 20 minutes à 4200 rpm.
5. Jeter le surnageant et resuspendre le culot dans 5 ml d'eau glacée. Ajouter 500 ml d'eau glacée et mélanger. Centrifuger les cellules comme lors de l'étape n°4.

6. Jeter immédiatement le surnageant et resuspendre les cellules dans le liquide restant.
7. Ajouter 500 ml d'eau glacée, mélanger et répéter l'étape n°4.
- 8a. Si l'électroporation se fait avec des cellules fraîches, les placer dans un tube de polypropylène de 50 ml (froid) et centrifuger 10 minutes à 4200 rpm à 2°C. Estimer le volume du culot et ajouter un volume égal d'eau glacée afin de resuspendre les cellules (sur de la glace). Aliquoter de 50 à 300 µl de cellules dans des tubes de 1,5 ml (froids).
- 8b. Si les cellules doivent être congelées, ajouter 40 ml de glycérol 10% aux cellules et mélanger. Centrifuger les cellules comme au n°8a. Estimer le volume du culot et ajouter un volume égal de glycérol 10% glacé. Aliquoter de 50 à 300 µl de cellules dans des cryotubes froids et conserver à -80°C.
9. Fixer l'appareil d'électroporation sur 2,5 kV, 25 µF et le contrôle des pulsations sur 200 ou 400 ohms.
10. Ajouter de 1 µl (de 5 pg à 0,5 µg) de plasmides aux tubes contenant les cellules (conservées dans de la glace). Mélanger.
11. Transférer l'ADN et les cellules dans une cuvette d'électroporation refroidie et essuyer les parois de la cuvette.
12. Placer la cuvette dans l'appareil à électroporation et appliquer le courant.
13. Retirer la cuvette et ajouter immédiatement 1 ml de SOC. Transférer la solution dans un tube stérile et laisser incuber de 30 à 60 minutes à 37°C sous agitation modérée.
14. Etaler les aliquots sur des boîtes de cultures LB contenant des antibiotiques.

Contrôles :

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

Résultats & discussion

A. MICRODISSECTION.

I. Introduction.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons entrepris de prélever, par microdissection, des fragments d'ADN de la région proximale du chromosome 5 de souris. Cet ADN a par la suite servi à mettre au point la technique de FISH (permettant de visualiser la provenance de l'ADN étudié) mais également à isoler de nouvelles sondes proches du gène *reeler*.

Le chromosome d'intérêt pour la microdissection doit être reconnaissable. Lorsque le travail se fait sur du matériel génétique humain, un banding au Giemsa des chromosomes permet de les différencier. Par contre, chez la souris, le banding donne de mauvais résultats. De plus, les chromosomes murins sont très semblables et tous acrocentriques, ce qui rend leur identification malaisée. Il est possible de procéder à un banding (par FISH) en utilisant comme sonde de l'ADN reconnaissant les séquences répétées L1md et B2. En effet, Boyle *et al.* (1992) ont montré que les longues séquences répétées L1md de souris sont localisées dans les bandes positives au Giemsa, alors que les courtes séquences répétées B2 se trouvent dans les bandes négatives au Giemsa. Néanmoins, même si les motifs de banding obtenus avec L1md sont de grande qualité et utilisables pour une analyse du



Figure 33 : caryotype de la lignée transloquée T31H. 1 = chromosome 5¹². 2 = chromosome 12⁵.

caryotype, il ne nous était pas possible d'utiliser cette technique pour repérer le chromosome 5. En effet, elle implique une analyse par FISH préalablement à la microdissection, ce qui pose de nombreux problèmes de détérioration et de contamination du matériel génétique.

La solution au problème d'identification du chromosome 5 a été la mise en culture d'une lignée de cellules embryonnaires de souris porteuses d'une translocation réciproque affectant les chromosomes 5 et 12. Cette translocation conduit à la formation des chromosomes 5¹² (contenant environ le dixième proximal du chromosome 5 et une petite région distale du chromosome 12) et 12⁵ (contenant la quasi totalité proximale du chromosome 12 et le reste du chromosome 5) (figure 33). Le chromosome 5¹² est aisément identifiable et contient la région proximale du chromosome 5 sur laquelle est localisé le gène *reeler*. En microdisséquant cette zone du chromosome 5¹², en clonant l'ADN et moyennant une sélection des inserts, il devient possible de trouver des marqueurs spécifiques de la région centromérique du chromosome 5. Une sélection des inserts doit avoir lieu afin de séparer ceux provenant de la partie du chromosome 12 présents dans le chromosome 5¹² de ceux de la partie du chromosome 5. En effet, aucune marque physique ne permet de distinguer la limite entre l'ADN du chromosome 5 et celui du chromosome 12 sur le chromosome 5¹². La petite taille de ce chromosome fait que la microdissection a lieu dans un zone chevauchant les deux ADNs de provenances différentes.

II. Microdissection du chromosome 5¹².

II. 1. Introduction.

Le succès du processus de microdissection dépend de nombreux facteurs, tels que le nombre d'amas chromosomiques présents sur chaque lame, leur état de condensation, la localisation du chromosome 5¹² au sein des amas, la manipulation de l'aiguille, la récupération de l'ADN,... La préparation des étalements chromosomiques est importante car c'est d'elle que dépend en grande partie la vitesse et la facilité de la microdissection.

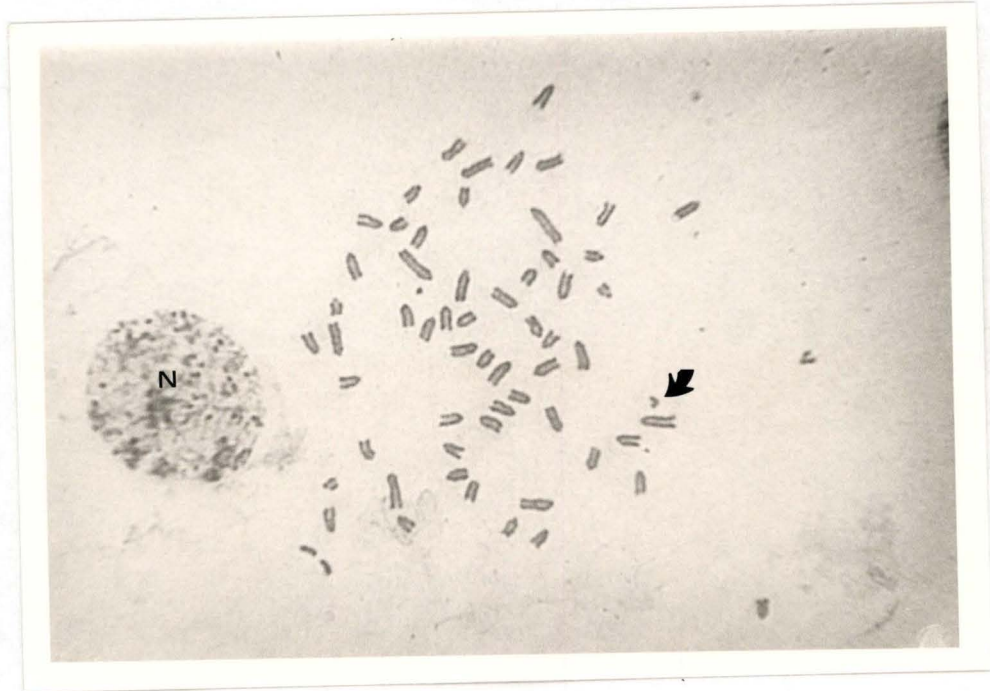


Figure 34 : photo d'un étalement chromosomique préparé à partir d'une culture de fibroblastes T31 (grossissement 1000x). Le chromosome 5¹² est indiqué par une flèche. Un noyau en interphase est marqué d'un N.

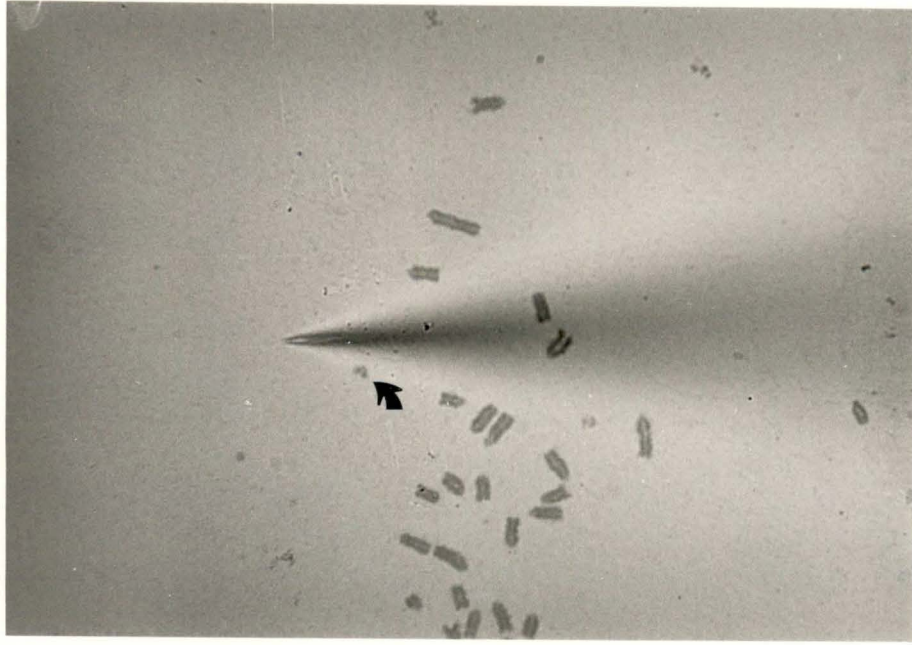


Figure 35 : étalement chromosomique (grossissement 1000x) photographié avant la microdissection du chromosome 5¹² (indiqué par une flèche).

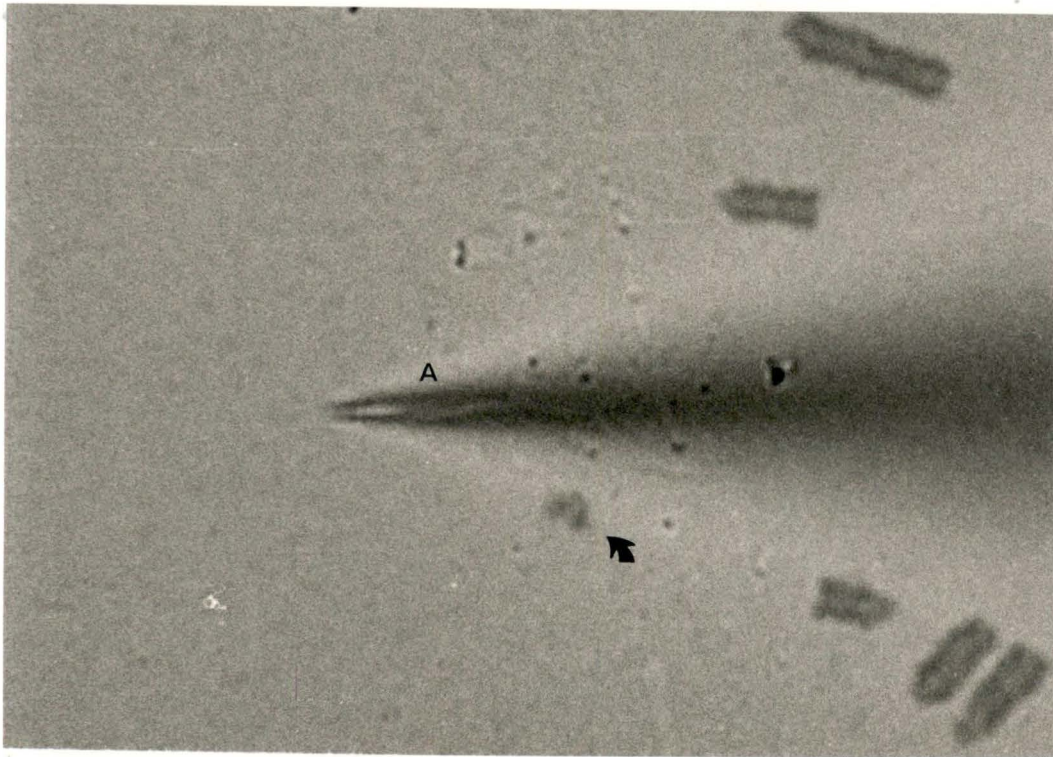


Figure 36 : agrandissement (11x) de la région d'intérêt de la photo 35. Le chromosome 5¹² et l'aiguille sont indiqués par une flèche et un A respectivement.



Figure 37 : étalement chromosomique (grossissement 1000x) photographié après la microdissection du chromosome 5¹² (indiqué par une flèche).

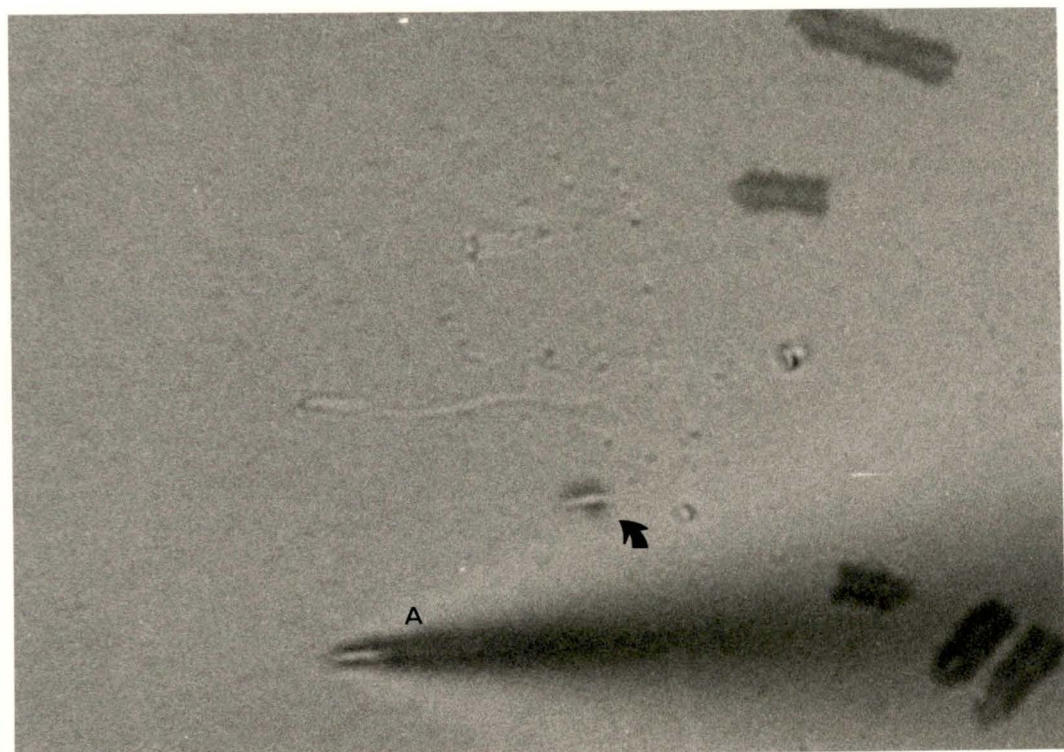


Figure 38 : agrandissement (11x) de la région d'intérêt de la photo 37. Le chromosome 5¹² et l'aiguille sont indiqués par une flèche et un A respectivement.

En effet, plus le nombre des métaphases est grand et plus les chromosomes sont dispersés, plus rapide en est le processus de localisation du chromosome 5¹² et plus facile en devient sa microdissection. Le chromosome 5¹² doit idéalement se présenter en périphérie de l'amas chromosomique (**figure 34**) et séparé d'autres chromosomes pour que la manipulation de l'aiguille et le prélèvement du fragment se fassent sans le moindre contact avec tout autre matériel génétique. Le microscope inversé que nous avons utilisé est équipé d'une plaque tournante sur laquelle est déposée la lame. Le bras du micromanipulateur étant à un angle fixe, afin de disposer le chromosome 5¹² dans un angle optimal pour la microdissection (les chromatides doivent être perpendiculaires ou légèrement obliques par rapport à l'aiguille), il est possible de tourner la lame sur la plaque tournante.

II. 2. Résultats.

Les **figures 35** et **36** montrent les chromosomes étalés (grossissement 1000x). Le chromosome 5¹² est indiqué par une flèche. Il est situé obliquement par rapport à l'angle de progression de l'aiguille (A). L'extrémité de l'aiguille a un diamètre de 1 µm, et, en la comparant au chromosome 5¹², il devient possible de comprendre les difficultés à microdisséquer avec une grande précision la région proximale du chromosome 5¹². Néanmoins, comme on peut l'observer sur les **figures 37** et **38**, une partie d'une des deux chromatides a été découpée de manière assez précise. Le fragment d'ADN n'est pas indiqué sur la photo, car il se trouve en dessous de l'aiguille. En effet, le prélèvement de d'ADN se fait grâce à son adhésion sous l'aiguille.

Les **figures 36** et **38** sont des agrandissements (11x) de la région d'intérêt. Elles montrent plus clairement les résultats de la microdissection.

Pour que le matériel génétique soit amplifiable par PCR, le protocole suivi (Meltzer *et al.*, 1992) indique que 25 à 50 fragments doivent être récoltés. Pour le clonage ultérieur de l'ADN de la région proximale du chromosome 5, 43 fragments ont été repris.

Pour la mise au point de l'analyse en FISH, entre 40 et 50 fragments ont été disséqués au départ mais, par la suite, nous avons mis au point une variante du protocole de Meltzer qui nous a permis de ne microdissequer que 8 fragments (voir A. III. 2.).

L'ADN a été repris dans une gouttelette de collection de 20 μ l (pour le clonage) et de 10 μ l (pour le FISH), incubé en présence d'une concentration finale de 500 μ g/ml de protéinase K (une heure à 37 °C), puis chauffé 10 minutes à 90 °C (pour inactiver la protéinase K).

III. Amplification de l'ADN microdisséqué par DOP-PCR.

III. 1. Introduction.

La PCR étant un moyen d'amplification très sensible, toutes les précautions nécessaires doivent être prises pour éviter une contamination éventuelle. La préparation des lames, la microdissection et les prétraitements se font donc d'une manière parfaitement stérile. La gouttelette de collection est préparée directement avant de commencer la microdissection. 20 μ l (ou 10 μ l suivant le nombre de fragments collectés) de ce tampon sont utilisés pour récolter l'ADN et une quantité égale de cette même solution est stockée afin de servir lors d'une PCR contrôle.

Afin de vérifier que les conditions utilisées pour la PCR sont optimales pour amplifier de très petites quantités d'ADN avec nos amorces dégénérées, nous avons également procédé à une PCR contrôle sur 5 ng d'ADN génomique de souris. Ainsi, si les concentrations en produits, et les conditions thermiques et temporelles des cycles auxquelles ont été soumis les échantillons sont adéquates, cela sera visualisé par une électrophorèse sur gel d'agarose d'une partie des produits de PCR.

III. 2. Résultats.

Les protocoles suivis sont différents selon que les produits de microdissection sont destinés à être clonés ou à être analysés en FISH.

Pour le clonage (43 fragments récoltés - volume final de la réaction : 50 μ l) :

	Microdissection	Contrôle neg.	ADN génomique
Eau	12,5	12,5	32
ADN/Goutt. coll.	20	20 (goutt. coll.)	0,5 (5 ng)
dNTPs	8	8	8
Tampon 10x	5	5	5
MgCl ₂	3	3	3
Amorce	1	1	1
Taq ADN pol.	0,5	0,5	0,5
Huile	50	50	50

Rem. : toutes les quantités sont exprimées en μ l. Le programme utilisé est le **programme 1**.

Pour le FISH (8 fragments récoltés - volume final : 25 μ l) :

	Microdissection	Contrôle neg.	ADN génomique
Eau	6	6	15,5
ADN/Goutt. coll.	10	10 (goutt. coll.)	0,5 (5 ng)
dNTPs	4	4	4
Tampon 10x	2,5	2,5	2,5
MgCl ₂	1,5	1,5	1,5
Amorce	0,5	0,5	0,5
Taq ADN pol.	0,5	0,5	0,5
Huile	50	50	50

Rem. : toutes les quantités sont exprimées en μ l. Le programme utilisé est le **programme 1**.

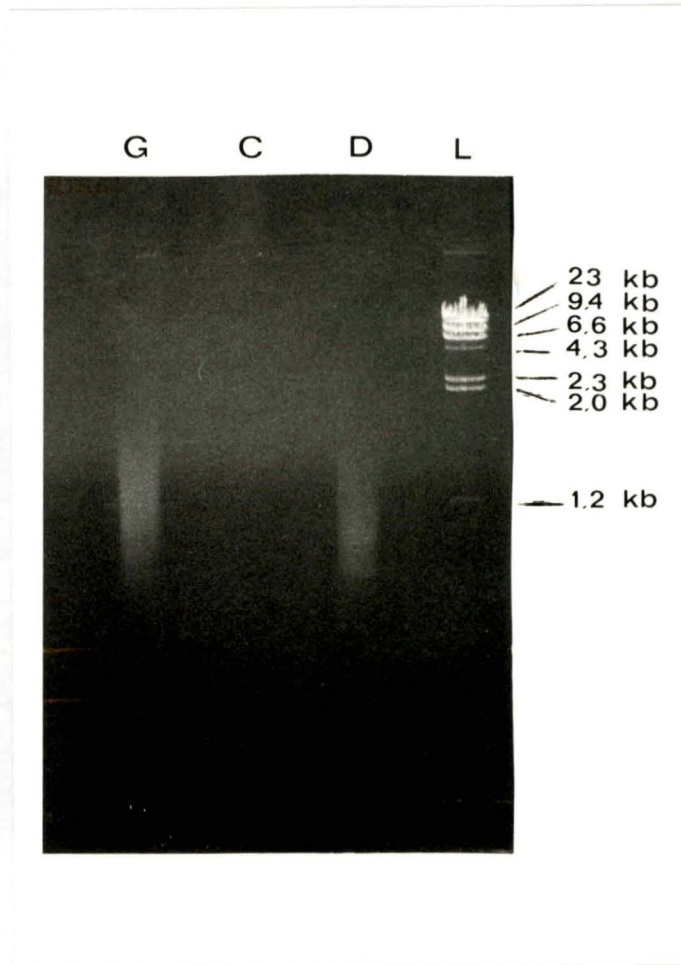


figure 39 : gel d'électrophorèse montrant l'amplification de l'ADN microdisséqué par DOP-PCR. G = ADN génomique, C = contrôle négatif, D = ADN microdisséqué et L = marqueur de taille Lambda digéré par *Hind III*.

Le matériel destiné à l'analyse en FISH est ensuite réamplifié afin d'obtenir une quantité suffisante d'ADN pour permettre son marquage avec un nucléotide lié à la biotine. 15 µl de la première PCR sont repris et réamplifiés selon un programme différent (**programme 2**).

Réamplification (volume final : 50 µl) :

	Microdissection	Contrôle neg.	ADN génomique
Eau	17,5	32,5	32
ADN 1° PCR	15	-	0,5 (5 ng)
dNTPs	8	8	8
Tampon 10x	5	5	5
MgCl ₂	3	3	3
Amorce	1	1	1
Taq ADN pol.	0,5	0,5	0,5
Huile	50	50	50

Rem. : toutes les quantités sont exprimées en µl.

Afin de vérifier la réussite d'une PCR, 10 µl de chaque réaction sont analysés sur gel d'agarose 0,8%. Pour connaître la taille des fragments d'ADN, un marqueur de taille (ici l'ADN du phage Lambda digéré par *Hind* III) est déposé sur le même gel.

Dans les trois cas, le profil que l'on doit observer est celui de la **figure 39**. Les pistes "G" et "D" (représentant respectivement l'ADN génomique et l'ADN microdisséqué) doivent montrer une bande étalée (smear), alors qu'aucun ADN ne doit être visible dans la piste "C" (contrôle négatif). L'amplification par amorces dégénérées d'ADN génomique ou microdisséqué engendre une bande étalée ; en effet, les amorces dégénérées s'hybrident à l'ADN cible de manière aléatoire, et provoquent ainsi l'amplification de segments d'ADN de tailles différentes, contrairement à l'utilisation d'amorces spécifiques de séquences amplifiant une séquence d'ADN de taille donnée.

Sur la **figure 39**, nous observons donc que :

- la piste "contrôle négatif" (C) ne montre pas d'ADN. Aucune solution utilisée n'était donc contaminée ;
- la piste "ADN génomique" (G) indique que les conditions que nous avons utilisées permettent l'amplification d'une quantité d'ADN de 5 ng ;
- la piste "ADN microdisséqué" (D) montre que l'ADN récolté a été amplifié (si ce n'est pas le fruit d'une contamination autre que des solutions).

Etant donnée la grande sensibilité de la PCR, il convient de tester la provenance murine de l'ADN amplifié par hybridation des produits de PCR marqués radioactivement sur des Southern contenant divers ADN contrôles.

IV. Hybridation des produits de microdissection.

Même si les contrôles négatifs des PCR ne montrent pas de contamination dans les solutions utilisées, il se peut qu'elle ait eu lieu lors de la microdissection, de la récolte ou des prétraitements des fragments. Pour vérifier que l'ADN que nous avons amplifié avait comme origine la souris, nous l'avons marqué avec un nucléotide radioactif (dCT³²P) par PCR et hybridé avec différents ADN (voir point A. IV. 2.).

Le protocole de la PCR radioactive (**programme 2**) est le suivant :

	Microdissection (μl)	Contrôle négatif (μl)
Eau	19,5	24,5
dNTPs	8	8
Tampon 10x	5	5
MgCl ₂	3	3
Amorce	1	1
ADN (PCR)	5	-
Taq ADN pol.	0,5	0,5
dCT ³² P	8	8
Huile	50	50

IV. 1. Préparation de la sonde radioactive.

Des tubes "D" et "C", 10 μ l sont prélevés et déposés sur un gel d'agarose 0,8%. Les résultats des PCR sont visualisés aux U. V. ; ils sont comparables à ceux obtenus sur la **figure 39**. Les 40 μ l restants du tube "D" sont précipités (à l'alcool/acétate d'ammonium) afin de séparer l'ADN des autres constituants :

- 40 μ l de PCR,
- 0,5 μ l d'ADN carrier (10 mg/ml),
- 1/3 de volume d'acétate d'ammonium 7,5 M (concentration finale de 2,5 M),
- 2 volumes d'éthanol absolu.

Le tube est placé 1 heure à -70°C puis centrifugé à 10 000 rpm. Le surnageant est éliminé et l'ADN redissout dans 15 μ l d'eau.

IV. 2. Préparation des membranes.

Nous avons testé les produits de microdissection sur des membranes contenant de l'ADN génomique de deux souches de souris (B6 et C), de l'ADN extrait de la lignée cellulaire hybride BM3C3 (contenant le chromosome 5 de souris sur un fond de hamster) et de l'ADN génomique de hamster.

Ces ADNs ont été restreints par l'enzyme *MspI* (Proméga, 10 U/ μ l) pendant une heure à 37°C dans les conditions suivantes (pour la préparation de deux membranes) :

	B6 (μ l)	C (μ l)	BM3C3 (μ l)	Hamster (μ l)
ADN	10 (10 μ g)	10 (10 μ g)	20 (40 μ g)	20 (20 μ g)
<i>MspI</i>	1	1	4	2
Tampon 10x	2	2	4	4
Eau	7	7	12	14

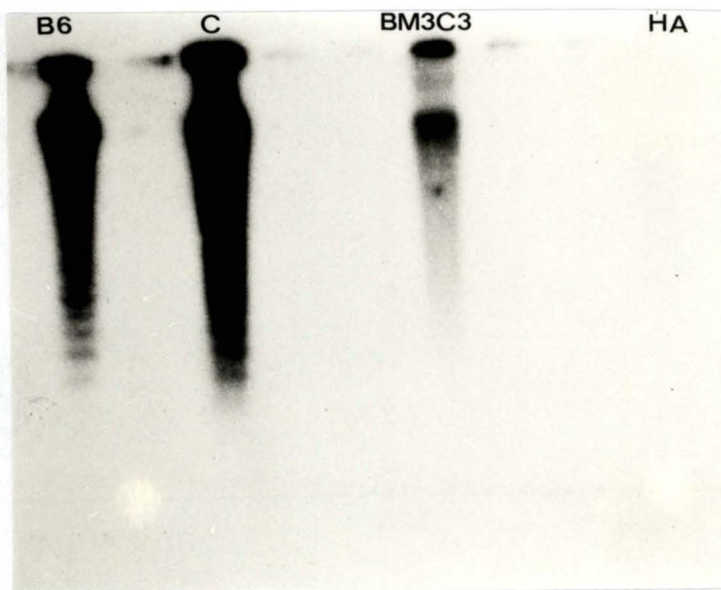


Figure 40 : analyse en Southern d'ADN de souris B6 et C, de BM3C3 et de hamster (HA) digérés par *Msp* I et hybridés aux produits de microdissections marqués au ^{32}P par DOP-PCR.

Les digestions par *Msp*I sont arrêtés par ajout de 4 µl de bleu (gel loading buffer). La moitié des volumes totaux des 4 échantillons, ainsi que le marqueur de taille Lambda/*Hind*III sont chargés sur un midigel d'agarose 0,8%. La digestion est visualisée aux U. V. L'ADN est ensuite transféré sur une membrane de nylon Hybond N⁺ par (Southern blotting alcalin).

IV. 3. Résultats.

Les produits de microdissection amplifiés, marqués et précipités (contenus dans 15 µl d'eau, voir *Préparation de la sonde*) sont dénaturés et préhybridés avec un excès d'ADN de souris soniqué non marqué. Cette incubation permet le blocage des séquences répétées présentes dans la sonde.

Le résultat obtenu avec nos produits de microdissection est représenté sur la **figure 40**. On remarque que l'ADN marqué s'hybride avec l'ADN des deux souches de souris, peu avec BM3C3 et pas avec l'ADN de hamster. Ces résultats indiquent que l'ADN que nous avons amplifié provient bien de la souris et qu'il est originaire du chromosome 5. En effet, il s'hybride avec l'ADN de BM3C3 (chromosome 5 de souris sur fond de hamster) mais non avec l'ADN de hamster.

V. Conclusions et discussion.

La technique de microdissection est fréquemment utilisée de nos jours, principalement en génétique humaine où elle donne d'excellents résultats. Le prélèvement d'ADN spécifique d'une bande chromosomique (après coloration au Giemsa, par exemple) peut être réalisé (Senger *et al.*, 1990). Chez la souris, comme nous l'avons vu, le banding est difficilement applicable et il faut alors dépendre d'autres moyens permettant l'identification des chromosomes.

La construction d'une lignée cellulaire de souris contenant le chromosome 5¹² sur lequel est localisé le gène *reeler* nous a permis de contourner le problème de reconnaissance des chromosomes. Néanmoins, le chromosome 5¹² est de très petite taille, ce qui rend la microdissection assez difficile à réaliser avec une extrême précision.

Les figures 34 à 38 montrent que le chromosome 5¹² est facilement identifiable au sein d'un amas chromosomique et qu'il est possible d'en prélever un fragment situé dans sa région proximale.

Par analyse d'hybridations de nos produits de microdissection avec divers ADNs, nous avons pu montrer qu'ils avaient comme origine le chromosome 5 de souris. La présence d'ADN provenant de la région 12 du chromosome 5¹² n'a pu être mise en évidence par ce type d'analyse. Il est néanmoins possible de montrer (par FISH) si les produits de microdissection contiennent de l'ADN du chromosome 12 (voir chapitre B.).

La microdissection, suivie d'une amplification par PCR dégénérée semble donc être un outil direct et fiable permettant de prélever de l'ADN d'une région chromosomique donnée, pour autant qu'elle ne soit pas trop petite.

B. HYBRIDATION FLUORESCENTE *IN SITU*.

I. Introduction.

Les résultats obtenus par l'hybridation des produits de microdissection avec de l'ADN de souris, de BM3C3 et de hamster ont donc montré qu'ils provenaient du chromosome 5 de souris. Néanmoins, il se peut qu'en microdisséquant le chromosome 5¹², de l'ADN de la partie distale du chromosome 12 présent sur le 5¹² ait été prélevé et amplifié. Il ne s'hybride pas avec l'ADN de BM3C3, mais son mélange avec de l'ADN originaire du chromosome 5 en masque la présence dans ce type d'hybridation. Pour pallier à cet inconvénient, nous avons analysé par FISH nos produits de microdissection. Ceci nous a également permis de visualiser de manière directe la provenance de l'ADN testé et de montrer la fiabilité de la technique de microdissection.

L'analyse des chromosomes au microscope à fluorescence se fait en utilisant deux filtres différents. Un filtre permet la visualisation du signal émis par l'iodure de propyldium (molécule à forte affinité pour l'ADN et contenue dans la solution "antifade" recouvrant les lames ; émission d'une lumière rouge), et un autre pour la fluorescéine (émission d'une lumière vert-jaune). Il est ainsi possible de repérer les amas chromosomiques par la fluorescence de l'iodure de propyldium, et, lorsqu'ils sont bien disposés et que le chromosome 5¹² est localisé, le filtre est changé au profit de celui qui convient à la visualisation de la fluorescence due à la fluorescéine.

La durée du signal fluorescent diminue rapidement lorsque la molécule est soumise à une excitation de longueur d'onde adéquate. La recherche de chromosomes possédant un signal non équivoque peut durer longtemps. Ce système de doubles filtres permet donc de diminuer le temps d'excitation de la fluorescéine et prolonge ainsi la durée de vie du signal.

II. Amplification par DOP-PCR biotinylée.

Pour la mise au point de la technique FISH, nous avons procédé à une série de microdissections de 40 à 50 fragments. Chaque ensemble de fragments a été amplifié, au départ, dans une réaction de PCR dans un volume final de 50 μl , comme décrit précédemment dans le cas d'un clonage des fragments. Par la suite, nous avons modifié ce protocole afin de ne devoir microdisséquer qu'une dizaine de fragments que nous avons amplifiés dans 25 μl puis réamplifiés dans un volume final de 50 μl . Cette amélioration a engendré un gain considérable de temps et de précision lors de la microdissection.

L'ADN ainsi réamplifié a été marqué (lors d'une réaction de DOP-PCR) par l'incorporation d'un nucléotide modifié lié, via un bras de 16 carbones, à une molécule de biotine (Biotine-16-dUTP). Les concentrations finales des nucléotides dATP, dGTP, dCTP restent les mêmes (200 μM) que dans les DOP-PCR d'amplifications précédentes, alors que celle du dTTP devient de 100 μM (ce mélange de nucléotides est nommé dNTPs FISH), tout comme celle de la Biotine-16-dUTP. Les conditions de la PCR sont les suivantes (volume final de 50 μl) :

	Microdissection (μl)	Contrôle négatif (μl)
Eau	22,5	32,5
dNTPs FISH	8	8 (voir remarque)
Biotine-16-dUTP	5	-
Tampon 10x	5	5
ADN amplifié	5	-
MgCl ₂	3	3
Amorce	1	1
Taq ADN polymérase	0,5	0,5
Huile	50	50

Rem. : les dNTPs utilisés dans la réaction contrôle sont tous à une concentration finale de 200 μM . Le programme utilisé est le **programme 2**.



Figure 41 : gel d'électrophorèse montrant l'amplification de l'ADN microdisséqué par DOP-PCR biotynylée. D = ADN microdisséqué, C = contrôle négatif et L = Lambda /*Hind* III.

Comme précédemment, le résultat de la PCR est visualisé par électrophorèse sur gel d'agarose (figure 41). On observe sur cette photo la réussite de la PCR biotinylée et l'absence d'ADN dans la piste correspondant au contrôle négatif (la bande étalée dans la piste "D" n'est donc pas le fruit d'une contamination).

L'ADN biotinylé est maintenant utilisable comme sonde pour une analyse d'hybridation fluorescente *in situ*.

III. Analyse en FISH.

III. 1. Préparation de la sonde.

200 ng d'ADN biotinylé sont nécessaires pour chaque réaction de FISH. Afin de prélever la quantité adéquate d'ADN, il faut donc mesurer sa concentration. Pour cela, 2 μ l d'une dilution 10x de la solution résultant de la DOP-PCR biotinylée sont mélangés à 2 μ l de Bromure d'éthidium (dilution 1/10 000) et l'intensité du signal est comparée, aux U. V., à des signaux émis par des quantités d'ADN de concentrations connues. La précipitation de la sonde et l'hybridation fluorescente *in situ* se déroulent comme décrit à la page 35.

III. 2. Résultats.

Les premières expériences de FISH que nous avons faites utilisaient des sondes provenant de récoltes de 40 à 50 fragments. Elles montrent un signal fluorescent sur tous les centromères. Ceci rend l'analyse des signaux recherchés difficile, surtout au niveau des chromosomes 5 et 5¹².

Nous avons tenté de bloquer les séquences centromériques (qui sont des séquences répétées) en préhybridant nos sondes en présence d'une quantité 1000 fois supérieure d'ADN soniqué de souris, mais les résultats n'ont pas été concluants.

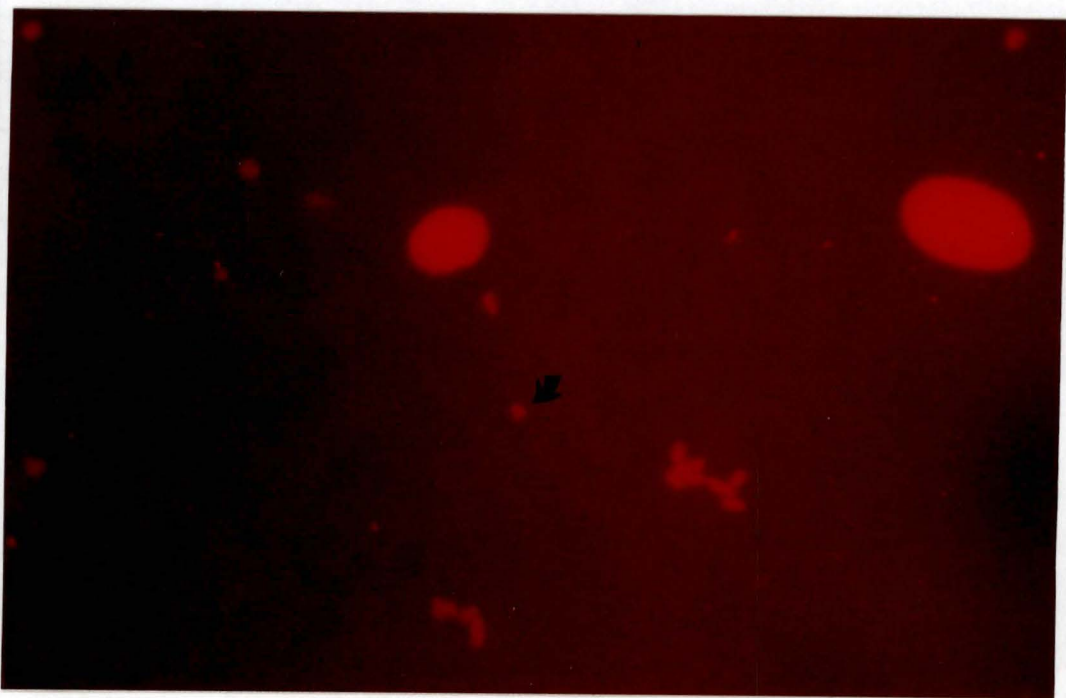


Figure 42a : photo du chromosome 5¹² après analyse en FISH utilisant comme sonde l'ADN microdisséqué et marqué par DOP-PCR biotinylée. Emission de fluorescence par l'iodure de propyidium.

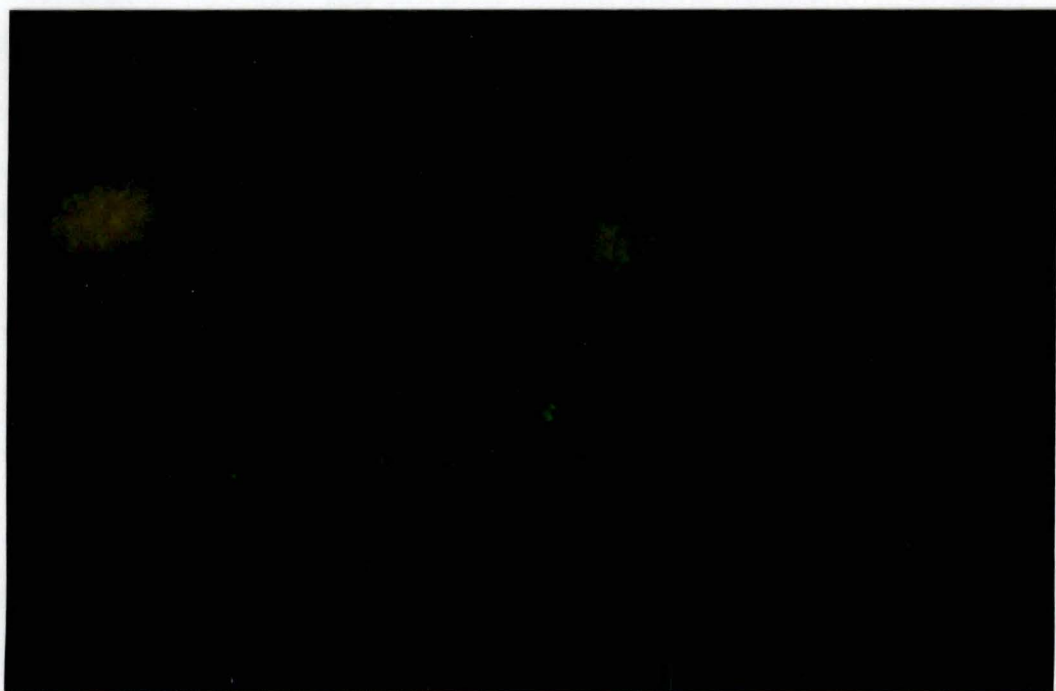


Figure 42b : photo du chromosome 5¹² après analyse en FISH utilisant comme sonde l'ADN microdisséqué et marqué par DOP-PCR biotinylée. Emission de fluorescence par la fluorescéine.

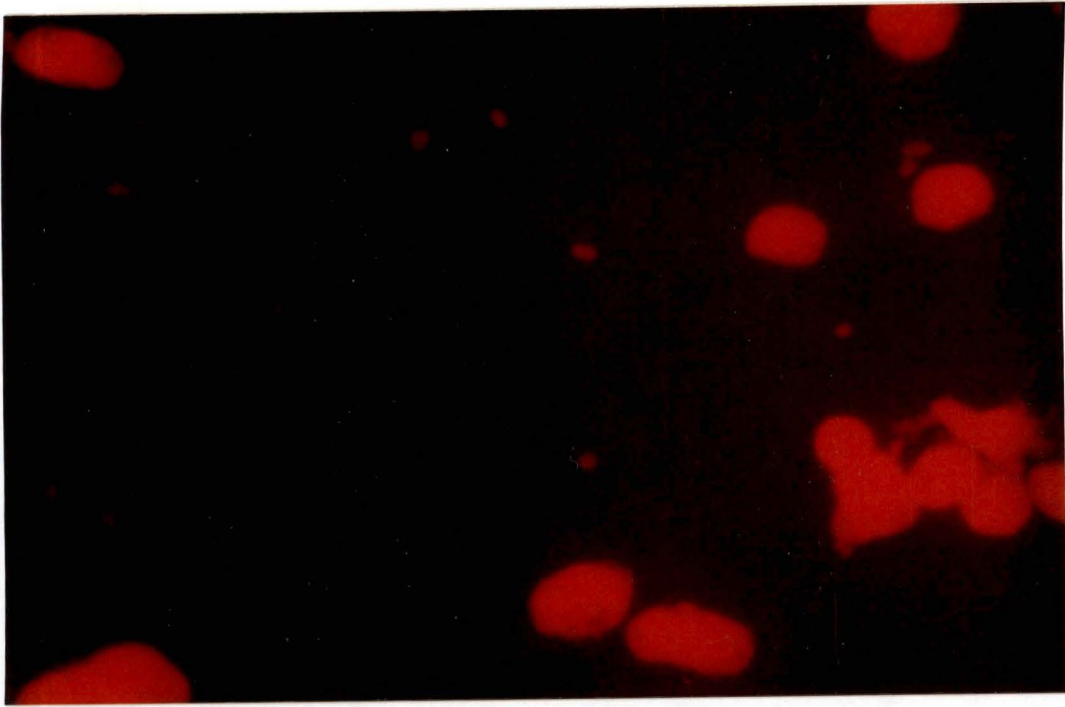


Figure 43a : photo du chromosome 5 après analyse en FISH utilisant comme sonde l'ADN microdisséqué et marqué par DOP-PCR biotinylée. Emission de fluorescence par l'iodure de propyidium.

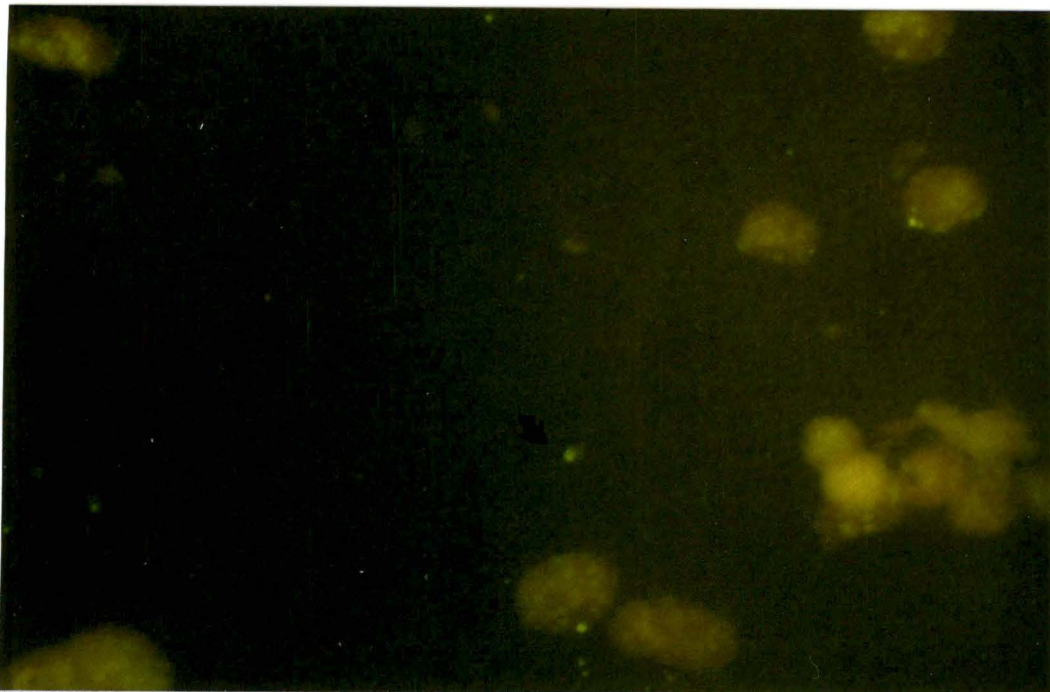


Figure 43b : photo du chromosome 5 après analyse en FISH utilisant comme sonde l'ADN microdisséqué et marqué par DOP-PCR biotinylée. Emission de fluorescence par la fluorescéine.

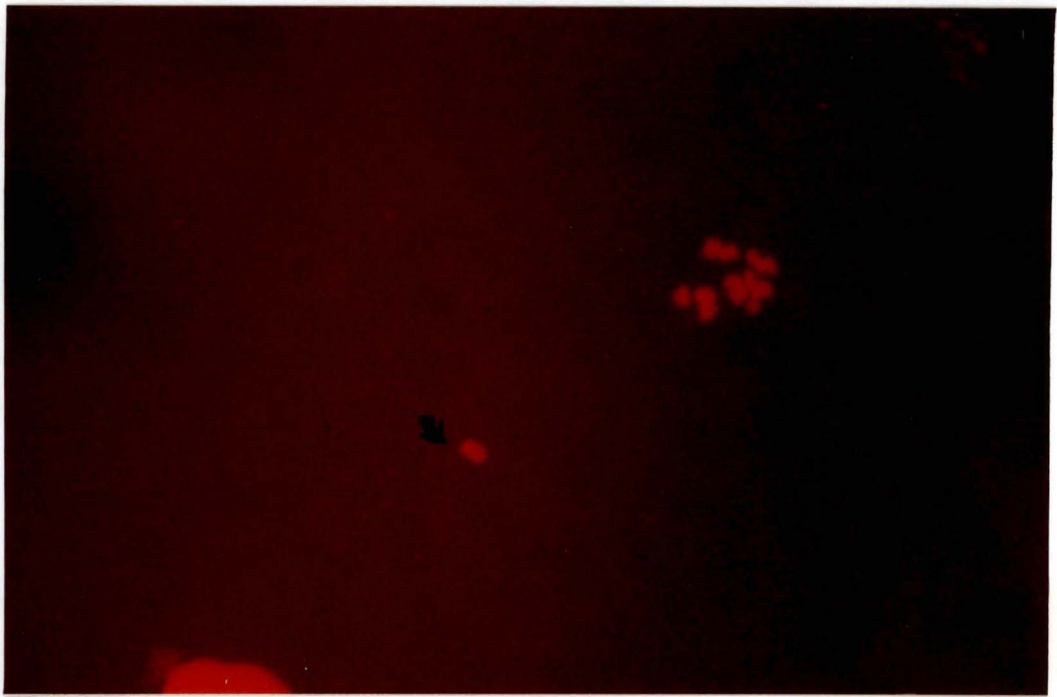


Figure 44a : photo du chromosome 12 après analyse en FISH utilisant comme sonde l'ADN microdisséqué et marqué par DOP-PCR biotinylée. Emission de fluorescence par l'iodure de propydidium.



Figure 44b : photo du chromosome 12 après analyse en FISH utilisant comme sonde l'ADN microdisséqué et marqué par DOP-PCR biotinylée. Emission de fluorescence par la fluorescéine.

Nous avons donc décidé de ne collecter que les fragments dont la provenance non-centromérique était certaine. Ceci a entraîné une difficulté plus grande pendant la microdissection. Le prélèvement de 50 fragments d'ADN non-centromérique mais néanmoins proximal est un exercice lent et délicat. Dès lors, afin de faciliter le travail, nous avons mis au point une variante du protocole de PCR utilisé auparavant, ne nécessitant plus que la récolte d'une dizaine de fragments (voir A.III. 2.).

Les analyses en FISH ont été faites sur les métaphases préparées à partir de la lignée T31. Dans le cas de l'hybridation sur ces lames d'un produit de microdissection biotinylé, nous attendons la présence d'un signal fluorescent sur :

- la quasi totalité du chromosome 5¹²,
- la partie proximale du chromosome 5,
- la partie distale du chromosome 12.

A la **figure 42a** (émission du signal dû à l'iodure de propyidium), le chromosome 5¹² est indiqué par une flèche. Sur la **figure 42b**, on peut observer un signal (dû à la fluorescéine) sur la quasi totalité du chromosome.

A la **figure 43a** (émission du signal dû à l'iodure de propyidium), le chromosome indiqué par la flèche est le 5. Le signal de la fluorescéine (visible sur la **figure 43b**) est localisé dans sa région proximale.

A la **figure 44a** (émission du signal dû à l'iodure de propyidium), la flèche indique le chromosome 12. Sur la **figure 44b** est visible un signal sur la région distale des deux chromatides.

Par conséquent, ces photos montrent donc que la provenance de l'ADN microdisséqué, amplifié et marqué est donc bien le chromosome 5¹².

IV. Conclusions et discussion.

Le FISH est un moyen rapide (2 jours sont suffisants pour le réaliser) et sensible permettant de visualiser l'origine chromosomique de l'ADN testé. De plus, ce type d'hybridation ne fait pas appel à des atomes radioactifs, éliminant ainsi les problèmes de sécurité et de demi-vie des isotopes.

La réalisation du FISH ne nécessite pas de matériel particulier. Seule l'étape de visualisation des signaux au microscope dépend énormément du type d'appareillage utilisé. Les meilleurs résultats sont obtenus avec des microscopes confocaux et après un traitement informatique ultérieur des données. Ne possédant pas ce matériel, nous avons utilisé un microscope à épifluorescence. Nos photos de FISH ne sont donc pas d'excellente qualité, mais les signaux se distinguent néanmoins assez clairement. Une fois la technique mise au point, elle s'avère être un moyen rapide et sensible qui nous a permis de démontrer la fiabilité de la microdissection.

Le FISH peut également être utilisé afin de démontrer l'origine de l'ADN exogène cloné sous forme de chromosomes artificiels de levures (YACs). Environ 40 à 60% des YACs possèdent de l'ADN provenant d'origines différentes (ils sont alors dits "chimériques"), rendant la construction de contigs difficile (la marche sur le chromosome peut alors s'orienter dans une mauvaise direction).

La préparation de sondes biotinylées à partir des YACs peut se faire de différentes façons. Nous avons essayé d'isoler des YACs par électrophorèse en gel pulsé, de les purifier par agarose/phénol:chlorforme et de les marquer à la biotine par PCR, mais les résultats obtenus n'ont pas été concluants. Nous avons ensuite suivi un protocole dans lequel le YAC testé était marqué par une réaction de nick translation à partir d'une préparation d'ADN génomique total de la levure contenant ce YAC (voir page 39) et d'analyser la provenance de son ADN exogène par FISH. Le YAC que nous avons utilisé (FAT F4) ne semblait pas contenir d'ADN exogène de différentes origines. En effet, les métaphases révélées montraient trois signaux fluorescents (dont un sur le chromosome 5¹²), mais ceux-ci étaient diffus et difficilement analysables.

Nous n'avons malheureusement pas pu améliorer notre méthode d'analyse en FISH de l'ADN des YACs, c'est pourquoi nous ne mentionnons que très brièvement nos résultats qui sont préliminaires. Les difficultés rencontrées sont au niveau pratique, car d'autres laboratoires ont montré que, lorsque cette technique est au point, elle est un moyen rapide, direct et relativement facile de déterminer le chimérisme des YACs testés, et est donc d'une grande utilité dans la construction de contigs.

C. CLONAGE DE L'ADN MICRODISSEQUE.

I. Introduction.

L'ADN microdisséqué utilisé pour l'analyse en FISH et pour le clonage ne provient pas de la même récolte, ces deux techniques ayant été employées à des moments différents.

Le clonage de fragments microdisséqués est une méthode fréquemment employée, en particulier en génétique humaine, pour isoler des marqueurs spécifiques d'une région. La DOP-PCR permet une amplification générale de l'ADN récolté, et la présence d'un site de restriction dans les amorces dégénérées en facilite le clonage.

Dans le cadre de la cartographie de la région centromérique du chromosome 5 de souris en vue de localiser le gène *reeler*, cette approche de recherche de nouveaux marqueurs trouvait donc sa place.

II. Traitements de l'ADN avant le clonage.

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe A.III.2., 43 fragments provenant du chromosome 5¹² ont été prélevés et amplifiés par DOP-PCR. Le site de restriction de l'enzyme *XhoI* étant présent dans les séquences des amorces utilisées, nous aurions pu digérer directement les produits de PCR par cette enzyme en vue de les cloner, mais cette approche est connue pour ne pas donner de résultats satisfaisants. Peut-être est-ce dû à la présence des sites de restriction aux extrémités des brins d'ADN, l'enzyme ayant alors plus de difficulté à agir sur ces sites.

Nous avons donc prétraité la totalité de l'ADN (amplifié puis purifié et précipité) avant de le cloner selon le protocole de Lorens (1991). Cette méthode fait appel à l'action successive de trois enzymes (**figure 29**) :

- la klenow agit en tant qu'exonucléase et élimine les extrémités protrudentes de l'ADN,
- le kinase les phosphoryle,
- la ligase lie les différents fragments d'ADN et crée des concatémères.

La digestion par *XhoI* sur les concatémères est plus efficace que sur les fragments possédant le site de restriction à leurs extrémités, mais elle n'est pas toujours totale. Il se peut que des inserts clonés contiennent encore un site *XhoI*.

III. Clonage de l'ADN microdisséqué.

III. 1. Introduction.

L'ADN sous forme de concatémères est précipité, restreint par *XhoI* et cloné dans le vecteur Bluescript pSK⁻ digéré par *SalI*, les sites de restriction de ces deux enzymes étant compatibles. La récupération des inserts clonés ne pouvant plus se faire par digestion enzymatique au site de clonage, nous avons synthétisé au laboratoire des amorces flanquant l'insert dans le vecteur (BSSalL et BSSalR).

III. 2. Transformation des bactéries et sélection des clones transformants.

Une fois les produits de PCR clonés dans Bluescript pSK⁻, nous avons transformé des cellules bactériennes (*E. Coli*), avec ces plasmides. Les bactéries ont été étalées sur un milieu solide LB contenant deux antibiotiques (l'ampicilline et la tétracycline) et de l'X-Gal, ces molécules permettant une sélection des bactéries ayant incorporé un plasmide porteur d'un insert : le gène conférant la résistance à l'ampicilline est disrupté dans le génome des cellules hôtes, mais présent dans l'ADN plasmidique ; les bactéries sont, elles, résistantes à la tétracycline. Dès lors, seules les bactéries ayant été transformées pousseront sur le milieu LB plus ampicilline et tétracycline. Le test blanc-bleu, lui, permet une sélection des colonies bactériennes ayant incorporé un plasmide possédant un insert, par rapport à celles ne véhiculant qu'un vecteur lié sur lui-même. Les colonies bactériennes transformées par un plasmide contenant un insert sont blanches.

Nous avons prélevé de manière aléatoire une vingtaine de colonies blanches que nous avons transférées sur une deuxième boîte identique à la première. Ce test de croissance permet une deuxième sélection des bactéries selon le même principe que précédemment. En effet, une certaine proportion des colonies qui apparaissent blanches lors du premier étalement sont dites "fausses positives".

Certaines colonies peuvent apparaître bleuâtres. Le plasmide véhiculé contient néanmoins un insert, mais de petite taille. En effet, une disruption du gène de la β -galactosidase par des inserts atteignant 200 pb ne réduit pas totalement l'activité de cette enzyme, d'où la couleur bleuâtre des colonies (Lüdecke *et al.*, 1990). Les colonies restantes sont numérotées, leurs plasmides sont prélevés et les inserts récupérés.



Figure 45 : gel d'électrophorèse montrant 4 inserts récupérés par PCR utilisant les amorces BSSalL et BSSalR. 1 = insert 161, 2 = insert 121, 3 = insert 45, 4 = inserts 2 et L = Lambda/*Hind* III.

IV. Récupération des inserts clonés.

Chaque clone isolé a été utilisé (afin d'en récupérer l'insert) dans une réaction de PCR utilisant les amorces BSSalL et BSSalR dans les conditions suivantes :

	Quantités (μ l)
Plasmides	65,5
Master Mix	32
BSSalL	1
BSSalR	1
Taq ADN polymérase	0,5
Huile	50

Rem. : le Master Mix contient le tampon 10x, les dNTPs et le $MgCl_2$ en quantités telles que leurs concentrations finales dans les 100 μ l de PCR sont de 1x, 200 μ M et 1,5 mM respectivement. Les amorces BSSalL et BSSalR sont en concentrations finales de 1,64 μ M et 1,60 μ M respectivement. Le programme utilisé est le **programme 3**.

Les résultats des PCR sont visualisés par électrophorèses sur des gels d'agarose comme décrit précédemment. La **figure 45** montre les profils des PCR effectuées sur les plasmides des colonies 161, 121, 45 et 2. Nous observons des bandes uniques correspondant aux divers inserts amplifiés.

Les tailles des inserts visibles sur cette photo sont de :

- 150 pb pour l'insert 161,
- 200 pb pour l'insert 121,
- 250 pb pour l'insert 45 et
- 250 pb pour l'insert 2.

Ces inserts, comme les quinze autres amplifiés, ont été récupérés sur des membranes de DEAE, purifiés par phénol/chloroforme, précipités à l'alcool/acétate d'ammonium et stockés à $-20^{\circ}C$ dans du tampon TE.

V. Sélection des inserts.

V. 1. Introduction.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre B., la microdissection du chromosome 5¹² de souris peut entraîner le prélèvement de fragments d'ADN originaires de la région centromérique du 5, mais également de la région distale du 12. L'analyse en FISH a montré la présence de ces ADN d'origines chromosomiques différentes dans une même récolte. Il est donc probable qu'il en soit de même pour l'ADN que nous avons cloné. Or, seuls les inserts provenant de la région centromérique du chromosome 5 sont recherchés. Une sélection doit donc avoir lieu afin de ne garder que ces derniers. Pour cela, deux tests d'hybridations sur des membranes contenant de l'ADN de souris, de hamster et de la lignée hybride BM3C3 et sur des dots blots (dosage génique) ont été faits.

V. 2. Marquage des inserts.

Le marquage des inserts se fait selon la méthode de MultiPrimed DNA Labelling utilisant de la déoxycytidine triphosphate radioactive comme précurseur.

L'ADN marqué est ensuite séparé des nucléotides par passage sur une spin colonne. La sonde est ensuite incubée en présence d'un excès d'ADN soniqué de souris afin de bloquer les séquences répétées :

	Quantités (µl)
Sonde	40
Eau	10
SDS 1%	10
ADN (10mg/ml)	5
SSC 20x	25

Cette solution est chauffée à 100°C pendant 10 minutes, préhybridée pendant 30 minutes à 65°C et ajoutée aux membranes (elles-mêmes bloquées pendant deux heures).

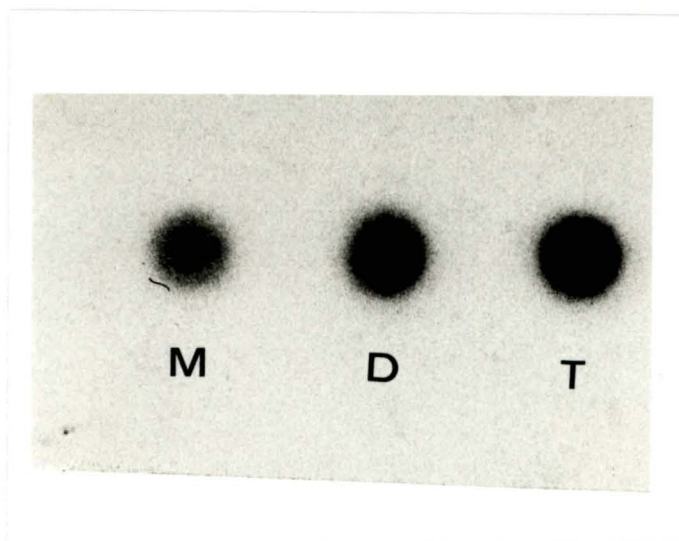


Figure 46 : effet de dose de l'insert 121. M = ADN monosomique, D = ADN disomique, T = ADN trisomique pour la partie proximale du chromosome 5 et la partie distale du chromosome 12.

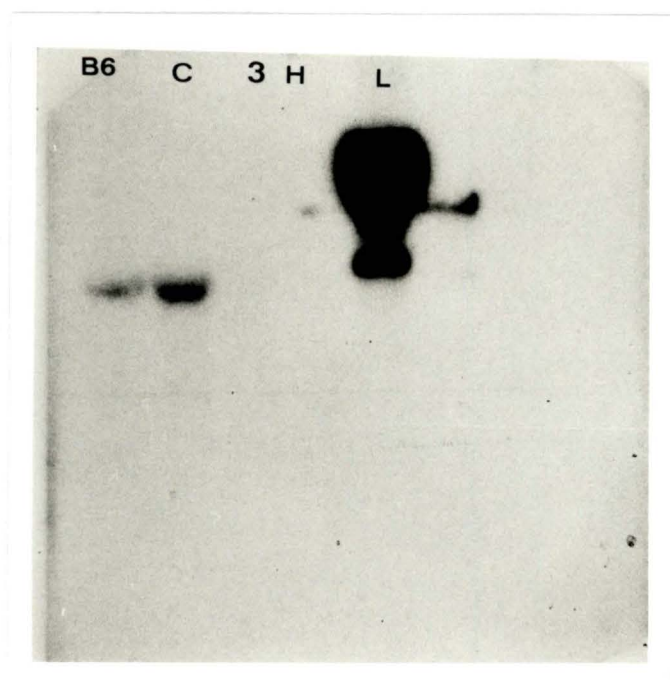


Figure 47 : an alyse en Southern d'ADN de souris B6, C, BM3C3 (3) et de hamster (HA) digérés par *Msp* I et hybridés à la sonde 121 marquée au ^{32}P par multiPrimed DNA Labelling.

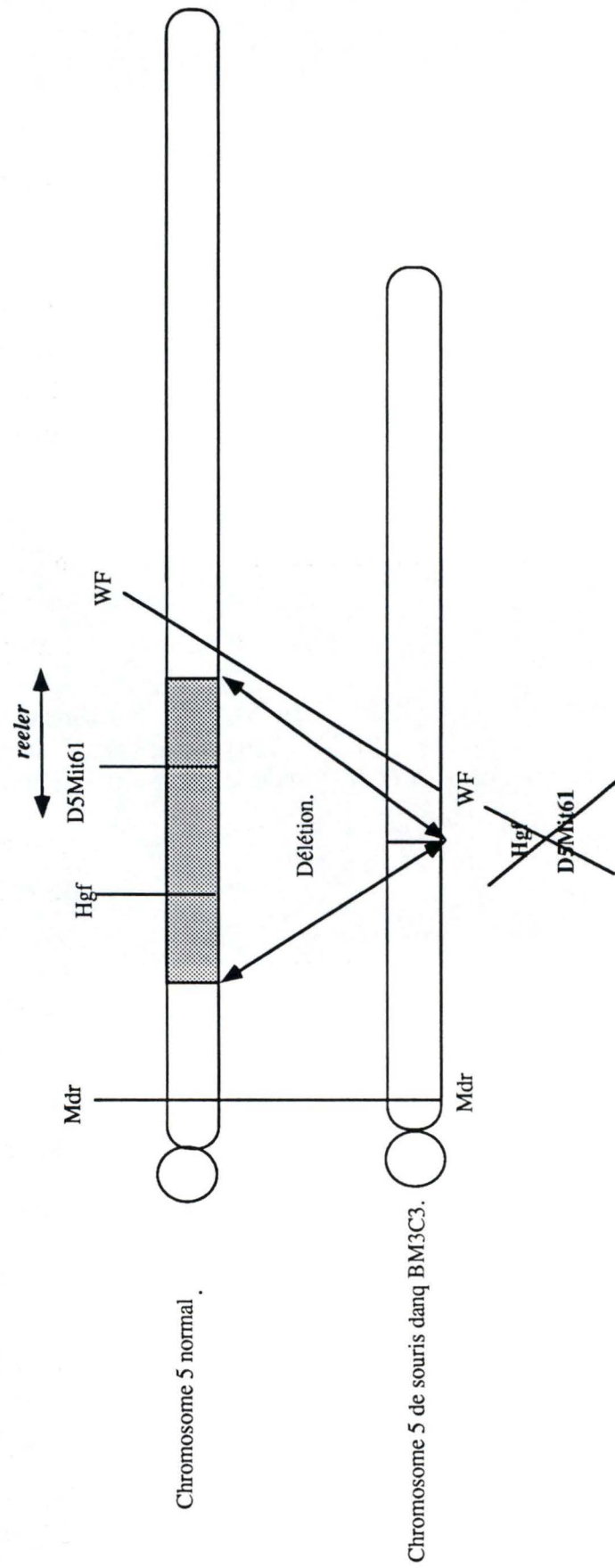


Figure 48 : cartographie de la délétion dans le chromosome 5 de BM3C3.

V. 3. Préparation des membranes.

Afin de rechercher sa provenance chromosomique, chaque insert a été testé sur :

- des dots blots (membranes contenant des mêmes quantités d'ADN de souris mono- di- et trisomique pour la région centromérique du chromosome 5 et la région distale du chromosome 12) permettant de visualiser un effet de dose 1-2-3 si l'insert provient de la région proximale du chromosome 5 (ou distale 12),

- et si le résultat obtenu lors du test de dosage génique est positif (effet de dose 1-2-3) sur des membranes sur lesquelles est fixé de l'ADN de souris B6 et C, de la lignée BM3C3 et de hamster. Un signal d'hybridation avec B6, C et BM3C3 est attendu.

V. 4. Résultats.

Les résultats de l'hybridation des divers inserts (161, 121, 45 et 2 par exemple) ont montré un effet de dose (**figure 46** : effet de dose de l'insert 121), mais contrairement à ce qui était attendu, chacun de ces inserts a montré une hybridation avec l'ADN des souris B6 et C, mais **pas** avec BM3C3 et l'ADN de hamster (**figure 47**, résultat obtenu avec la sonde 121). Les hypothèses quand à leur origine chromosomiques étaient donc deux : soit ils provenaient tous de la région distale 12, soit certains provenaient de la région distale 12 et d'autres de la région proximale 5 mais n'hybridaient pas avec le chromosome 5 de BM3C3.

D'autres sondes utilisées au laboratoire et cartographiées par analyses de recombinaisons génétiques dans la région proche de *reeler* ne montrent pas d'hybridation avec l'ADN de BM3C3 : les sondes Hgf et D5Mit61 (située à 3 cM et moins de 0,5 cM de *reeler* respectivement) ne s'hybrident pas avec le chromosome 5 de BM3C3, alors que Wf et Mdr (situés à 0,5 et 8 cM respectivement de *reeler*) se trouvent sur BM3C3 (**figure 48**). Nous avons donc postulé que le chromosome 5 de la lignée BM3C3 portait une délétion dans une région proche de *reeler*.

La taille de la délétion du chromosome 5 dans BM3C3 n'est pas connue, mais elle est au minimum de l'ordre de 3 cM, étant donné l'absence des sondes Hgf et D5Mit61 dans le chromosome 5 de BM3C3. La présence de cette délétion nous porte à considérer avec attention les inserts qui donnent une hybridation différentielle 1-2-3, une hybridation à B6, C mais qui ne donnent aucun signal avec le DNA de BM3C3 ou de hamster. En effet, ceux-ci sont localisés sur le chromosome 12 distal ou dans la région proximale du chromosome 5 et, de plus, dans une zone proche de *reeler*.

Rem. : les analyses d'hybridation des produits de microdissection servant au FISH montrent un signal dans BM3C3. Ceci s'explique par le fait qu'une grande partie de la région distale du chromosome 5 est prélevée et qu'elle contient donc de l'ADN qui se retrouve dans le chromosome 5 de BM3C3.

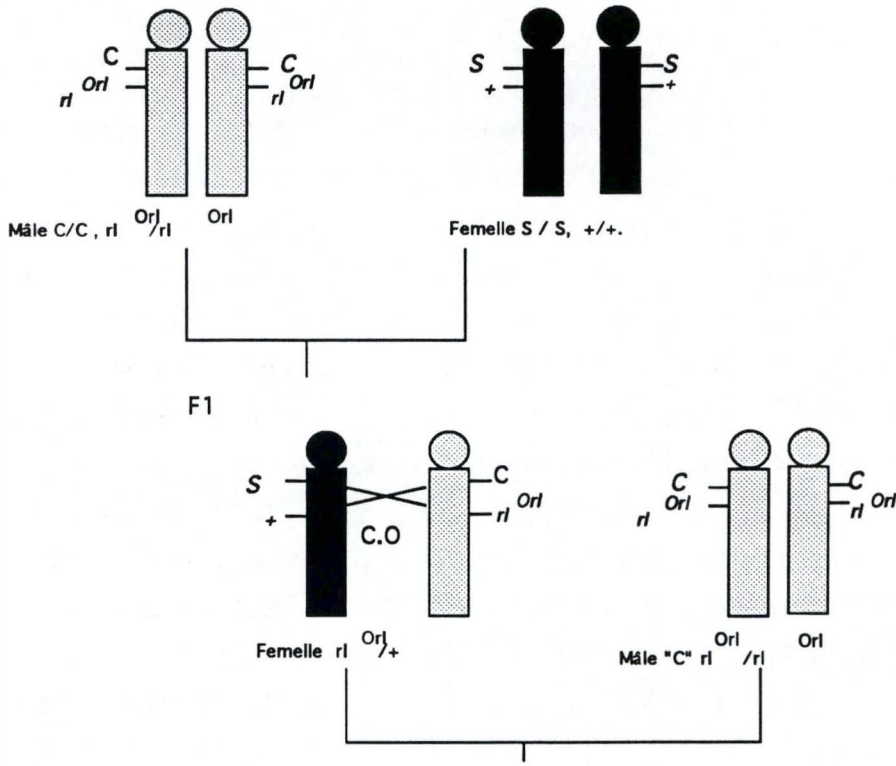
VI. Cartographie des inserts sélectionnés.

VI. 1. Introduction

La localisation des marqueurs testés par rapport à *reeler* est déterminée en calculant le nombre de recombinants entre ces marqueurs et *reeler*. Ce nombre est proportionnel au taux de crossing-overs (C-O) qui se sont produits entre les deux loci. Ce nombre de C-O est lui-même fonction de la distance séparant les deux marqueurs.

Nous disposons de 2 souches de souris porteuses de la mutation *reeler*, à savoir la souche BALB/c (C), porteuse de l'allèle Orléans, et la souche C57BI/6J (B6), porteuse de l'allèle Edimbourg.

Pour le calcul du pourcentage de recombinaison avec *reeler*, nous avons construit un panneau backcross intraspécifique B6/C de la manière suivante : des mâles homozygotes fertiles *reeler* Orléans sont croisés avec des femelles B6 normales. Les femelles F1 (+/ *rl^{Orl}*) sont backcrossées à un mâle homozygote *reeler* Orléans pour donner le panneau backcross. 127 animaux N2 backcross ont été obtenus.



Individus backcross : génération N2.

	Génotype des backcross.	Phénotype.	polymorphisme
NON RECOMBINANTS		Normal	"S"/"C"
		Reeler	"C"/"C"
RECOMBINANTS		Reeler	"S"/"C"
		Normal	"C"/"C"

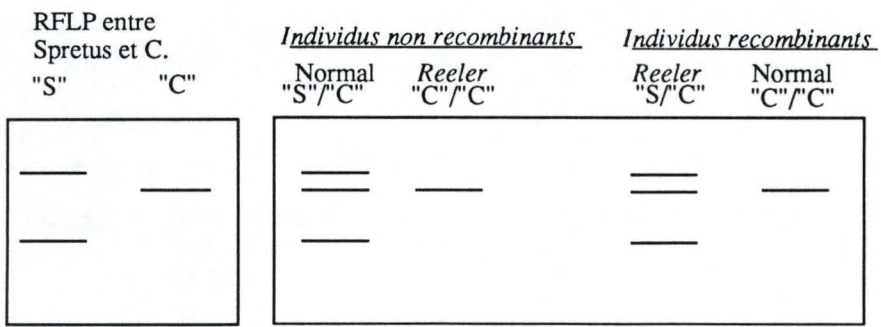


Figure 49 : création de lignées backcross interspécifiques entre les souches de souris BALB/c (C) et *spretus* (S) et principe du polymorphisme de restriction.

Il est en général difficile de trouver un polymorphisme de restriction entre souris de la même espèce. Nous avons donc entrepris la construction d'un panneau backcross interspécifique BALB/c-*Mus spretus* (figure 49) : des femelles *spretus* pour la partie proximale du chromosome 5 sont croisées avec un mâle homozygote *reeler* Orléans. Les femelles F1 (+/*rl*, C/*spretus*), sont backcrossées avec un mâle *reeler* BALB/c pour engendrer le panneau backcross interspécifique. 133 animaux N2 ont été obtenus.

Chacun de ces animaux est typé pour le caractère *reeler* par phénotype et/ou dissection du cerveau, et les ADNs de foie, rate et thymus sont extraits selon les protocoles classiques (Maniatis *et al.*, 1989), et congelés.

Lorsque de l'ADN d'animaux de deux espèces différentes est restreint par une même enzyme et dans les mêmes conditions, les tailles des fragments obtenus peuvent varier. Une même sonde hybridée à des membranes d'ADN d'individus de deux espèces différentes révèle des fragments de tailles différentes, correspondant à un polymorphisme de restriction ou RFLP (figure 49). Ceci permet de reconnaître l'origine de chacun des deux allèles pour la sonde testée (par exemple C/C ou C/*spretus*). Cette information, comparée au phénotype des animaux testés (normal ou *reeler*) permet d'identifier les animaux recombinants.

Différents marqueurs ont déjà été localisés par rapport à *reeler*. Trois sont particulièrement intéressants parce que proches de ce gène: Hgf, Wf (allèle de Xmv-45) et 5 HT-5A. Après avoir déterminé, par l'analyse au hasard de quelques animaux, qu'une sonde donnée ne provient pas d'un autre chromosome, nous avons donc testé nos sondes uniquement sur les animaux recombinants pour ces marqueurs. Par exemple, si la sonde testée ne recombine pas pour tous les animaux recombinants pour Hgf, elle est donc plus proche de *dereeler* que Hgf. Dans le cas contraire, elle est aussi proche ou plus éloignée de *reeler* que Hgf.

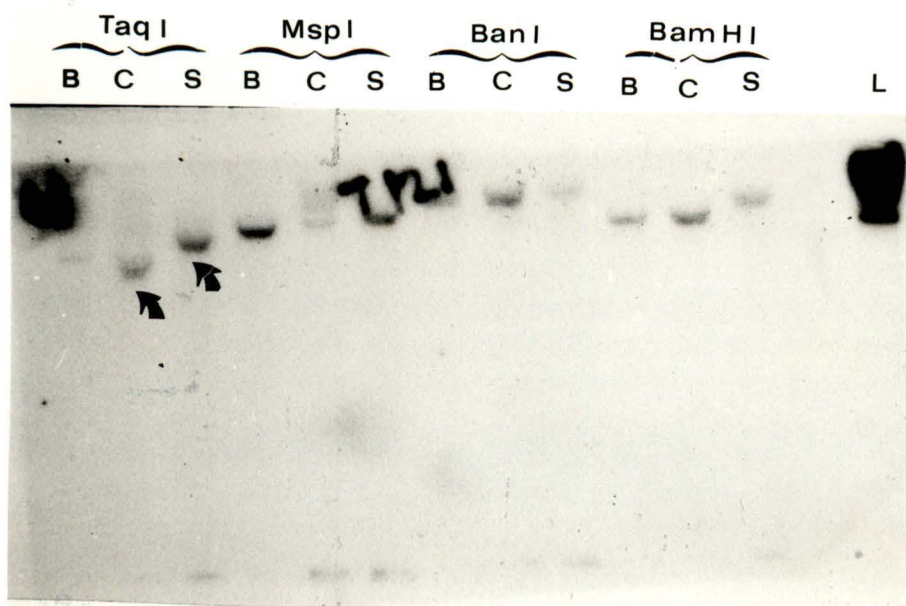


Figure 50 : analyse en Southern d'ADN de souris B6, C et SEG (S) restreints par *Taq I*, *Msp I*, *Ban I* et *BamH I* avec la sonde 121 marquée au ^{32}P par MultiPrimed DNA Labelling. Les flèches indiquent le polymorphisme de restriction entre C et SEG digérés par *Taq I*.

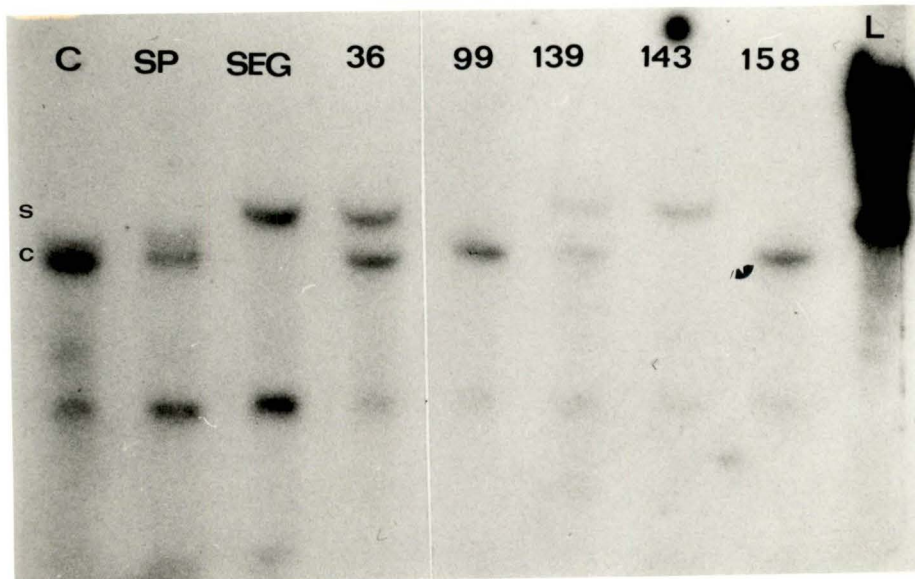
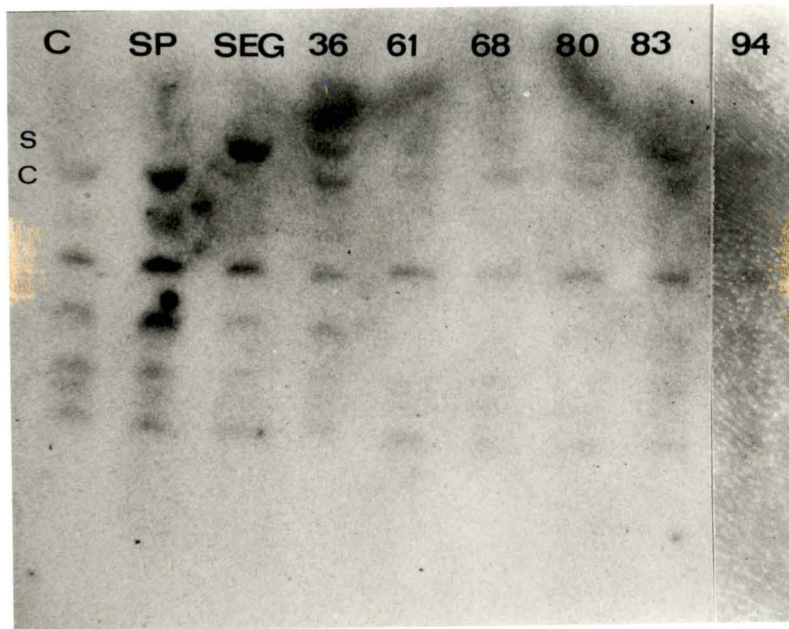


Figure 51 : analyse en Southern d'ADN de souris *C*, *spretus* (SP) et SEG et des souris backcross recombinantes 36, 61, 68, 80, 83, 94, 99, 143 et 158 restreints par *Taq* I. L= Lambda/*Hind* III. C et S représentent respectivement l'allèle BALB/*c* et *spretus* pour le locus 121.

VI. 2. Recherche de polymorphismes de restriction.

Parmi les 4 premiers inserts sélectionnés, seul le 121 montrait un polymorphisme entre C et SEG avec une des enzymes testées. La **figure 50** montre le résultat de l'hybridation de la sonde 121 sur une membrane comprenant de l'ADN de B6, C et SEG (une souche de souris de l'espèce *Mus spretus*) digérés par 4 enzymes : *TaqI*, *MspI*, *BanI* et *BamHI*. Un polymorphisme de restriction est visible pour l'enzyme *TaqI* entre C et SEG. Les démarches suivantes sont donc de tester l'insert 121 sur un panneau de souris backcross intraspécifiques recombinantes pour les sondes Wf, Hgf et 5HT-5A, et non recombinantes, et de continuer à tester les autres inserts sur des ADN restreints avec d'autres enzymes jusqu'à obtention d'un polymorphisme entre C (ou B6) et SEG.

VI. 3. Résultats.

L'insert 121 testé sur les souris backcross interspécifiques recombinantes donne les résultats suivants (**figure 51**) :

Souris	Type	Insert 121	Wf	5 HT-5A	Hgf
36	normale	SC	SC	SC	CC*
61	normale	SC	SC	SC	SC
68	reeler	CC	CC	SC*	CC
80	normale	SC	CC*	CC*	SC
83	normale	SC	SC	SC	CC*
94	normale	SC	SC	CC*	SC
99	reeler	CC	CC	CC	CC
139	normale	SC	SC	SC	SC
143	normale	SS	SS*	SS*	SC
158	reeler	CC	SC*	SC*	CC

* = recombinaison entre *reeler* et cette sonde chez cette souris.

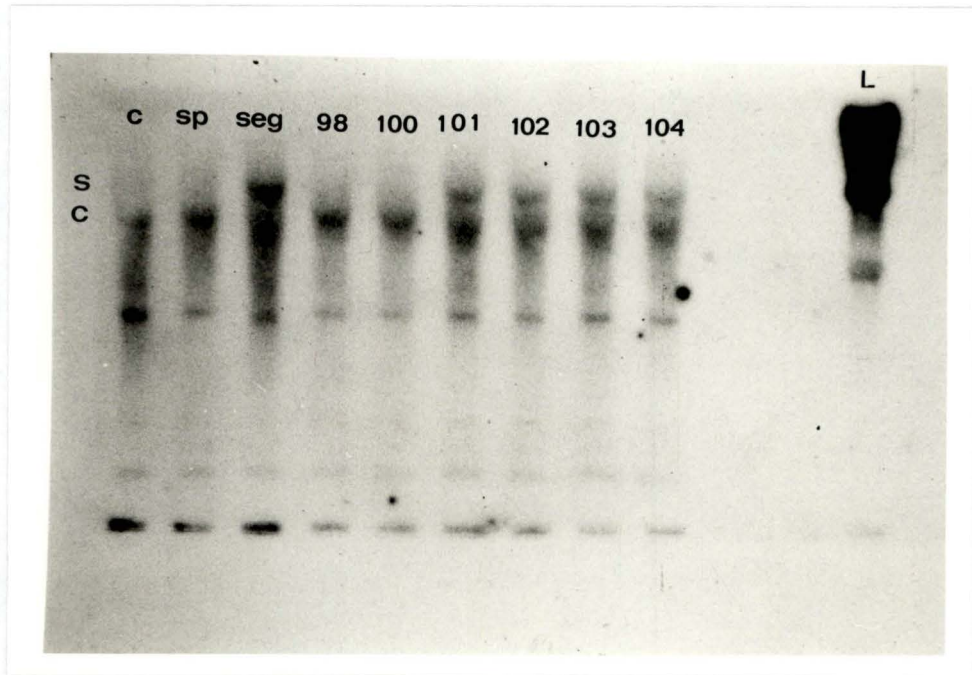


Figure 52 : analyse en Southern d'ADN de souris *C*, *spretus* (SP) et SEG et des souris backcross non recombinantes 98, 100, 101, 102, 103 et 104 digérés par *Taq* I. L = Lambda/*Hind* III. C et S représentent respectivement l'allèle BALB/*c* et *spretus* pour le locus 121.

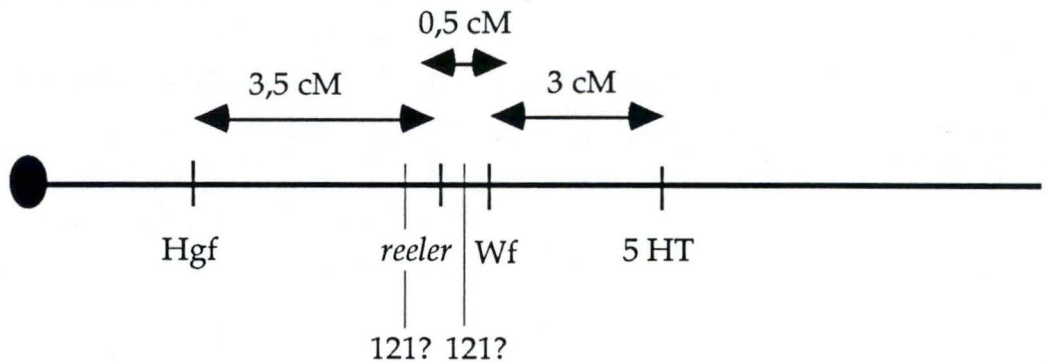


Figure 53 : localisation de la sonde 121 par rapport à *reeler*, *Hgf*, *Wf* et 5HT-5A.

Dans ce tableau nous pouvons tirer les observations suivantes :

- 121 ne recombine avec aucune souris recombinante pour Hgf
- 121 ne recombine avec aucune souris recombinante pour Wf
- 121 ne recombine avec aucune souris recombinante pour 5HT-5A
- la souris n°143 (profil de restriction uniquement S) est un cas unique, interprété comme une délétion de l'allèle C pour quelques marqueurs de la région.

Par conséquent, nous pouvons dire que la sonde 121 est plus proche de *reeler* que Hgf et Wf. N'ayant pas observé de recombinaisons entre *reeler* et 121, nous ne pouvons connaître la distance exacte les séparant. Ce type d'analyse de recombinaison ne permet pas de localiser 121 du côté de Wf ou de Hgf par rapport à *reeler*.

Nous avons également testé la sonde 121 sur un panneau de souris interspécifiques non recombinantes, pour s'assurer que l'obtention de 0 recombinant pour la sonde n'était pas dû au hasard. Les résultats obtenus (figure 52) sont récapitulés dans le tableau suivant :

Souris	Type	Insert 121	Wf	5 HT	Hgf
98	reeler	CC	CC	CC	CC
100	reeler	CC	CC	CC	CC
101	normale	SC	SC	SC	SC
102	normale	SC	SC	SC	SC
103	normale	SC	SC	SC	SC
104	normale	SC	SC	SC	SC

Nous observons que la sonde 121 ne montre aucune recombinaison avec *reeler* chez des souris non recombinantes.

En conclusion, la sonde 121 n'a montré aucune recombinaison dans le panneau des souris recombinantes parce qu'elle est très proche de *reeler* (figure 53).

10	20	30	40	50	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	
GGTCGAGTAA	TCCACAGGAT	GAGGATGAGG	CTGCTTCGTT	CCCTGTACTG	50
CACCTCACCA	CCGTACCTCA	TCCCCTCCTT	TCTTTAAGGA	AAAAACTAAC	100
AGCAACTCGG	TGATAAAGAA	ACTAAAGACC	AACTTTACAT	TTGTAAACA	150
AAGTCCAAAA	GGAAAAGTGG	AGTGCCACCA	TGACTCACTC	GAGTCGGC	198

Figure 54 : séquence de l'insert 121.

Residue	Site
4	TaqI
31	FokI
14	MnlI
37	FokI
20	MnlI
18	BbvI
32	Fnu4HI
47	RsaI
64	MnlI
48	HphI
65	RsaI
77	MnlI
56	FokI
85	MnlI
85	MseI
122	HphI
145	MseI
172	BsrI
177	Bsp1286I
183	NlaIII
183	HinfI
177	PleI
189	AvaI
189	PaeR7I
189	XhoI
190	TaqI
192	HinfI
200	PleI

Figure 55 : table des sites de restriction de l'insert 121.

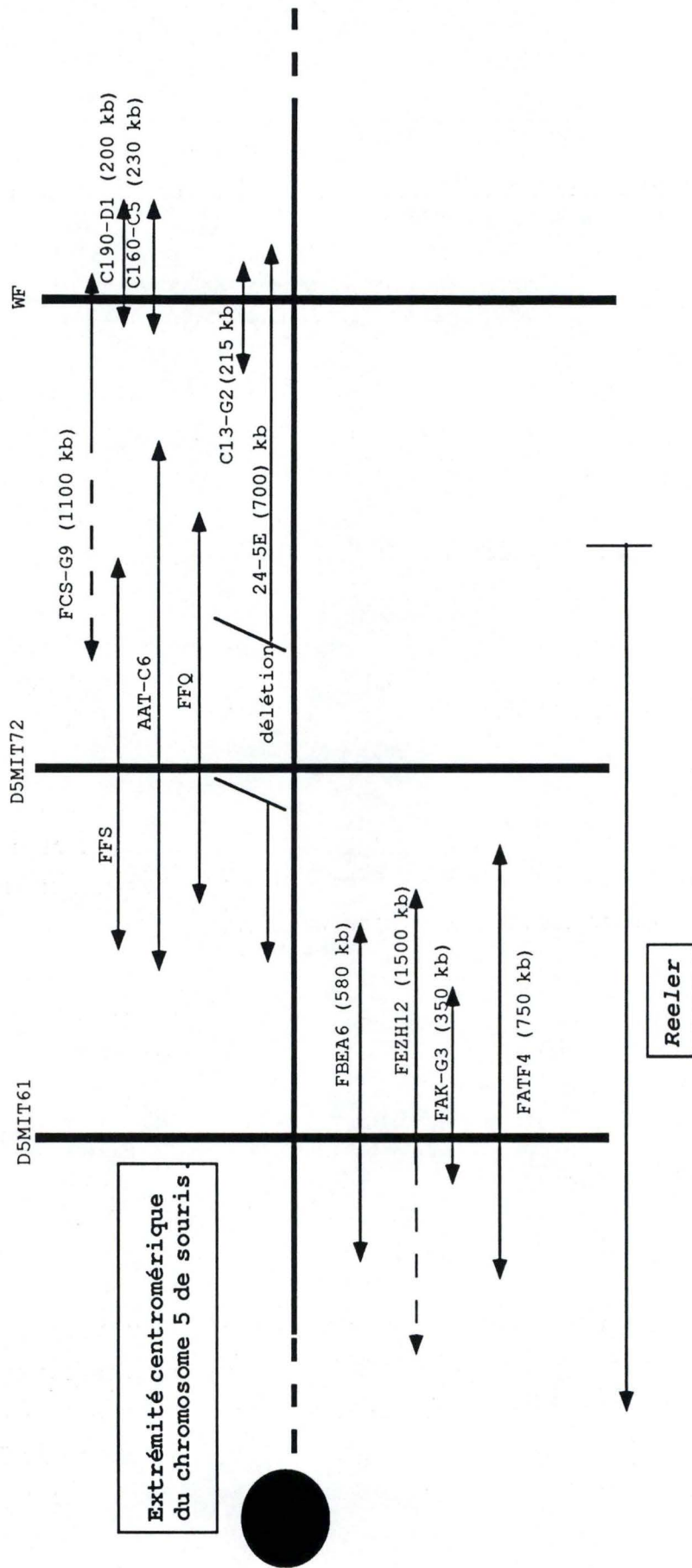


Figure 56 : organisation de la région *reeler* sous forme d'un contig de YACs. L'agencement du contig doit encore être confirmée, notamment en ce qui concerne les YACs Mit72 qui sont en cours de caractérisation.

Au moment de clôturer nos expériences, les autres inserts testés (161, 45 et 2) n'ont pas permis de trouver de polymorphisme de restriction avec les différentes enzymes utilisées.

VI. 4. Séquençage de l'insert 121.

Comme la sonde 121 est intéressante pour la cartographie de notre région d'intérêt, nous en avons déterminé la séquence selon la méthode de Sanger (Maniatis, T., 1989) (**figure 54**). Par le programme Gene Works (méthode FASTA), nous avons fait une recherche d'homologie entre la séquence de 121 et celles contenues dans la banque de données GeneBank. Aucune homologie n'a été trouvée.

Une carte des sites de restriction a été réalisée à partir de la séquence nucléotidique de la sonde 121 (**figure 55**). Nous pouvons remarquer la présence d'un site *XhoI* au niveau du nucléotide 189, indiquant un chimérisme de l'insert. Lors de la réaction de restriction par *XhoI* des concatémères formés suite à l'action de la ligase, le site situé dans 121 n'a pas été coupé, ce qui veut dire que la séquence nucléotidique de 121 n'est pas présente telle quelle dans le chromosome 5.

Le site *XhoI* se trouvant près d'une des extrémités de 121, il est probable que lors des réactions d'hybridation, le signal obtenu correspond à la reconnaissance d'une séquence homologue par la région la plus grande de la sonde. Les résultats précédemment obtenus ne sont donc probablement pas influencés par le chimérisme de la sonde.

VI. 5. Analyses futures.

121 a donc été localisé dans une région très proche de *reeler*, mais sa position par rapport à ce gène n'a pu être déterminée par nos expériences. Pour cela, il faudra procéder à des hybridations de la sonde sur un panneau de souris congéniques. Il sera également intéressant de tester 121 par rapport aux YACs constituant le contig recouvrant la région de *reeler* (**figure 56**).

En effet, une hybridation préférentielle de la sonde avec certains YACs indiquerait sa position par rapport à D5Mit61 et Wf, et donnerait donc une information supplémentaire sur la localisation de 121 par rapport à *reeler*.

VII. Conclusions et discussion.

L'utilisation d'ADN microdisséqué a montré son utilité dans la recherche de nouveaux marqueurs. Les techniques de microdissection du chromosome 5¹² et d'amplification par DOP-PCR sont assez faciles à mettre en oeuvre. En outre, le clonage de l'ADN amplifié par DOP-PCR produit un bon nombre de sondes potentielles à tester.

Même si la restriction des concatémères d'ADN par *XhoI* peut ne pas être totale (comme cela a été le cas pour l'insert 121), elle reste toujours plus efficace qu'une restriction sur les produits de PCR non liés. Si un insert intéressant se trouve être chimérique, il peut être restreint par la suite.

Du clonage de l'ADN microdisséqué, nous avons récolté une vingtaine de colonies blanches dont les inserts ont été récupérés. Après une première sélection basée sur le dosage génique, 11 inserts ont été conservés. Après hybridation de ceux-ci sur les southern d'ADN de B6, C, BM3C3 et de hamster, 8 sondes ont été sélectionnées. La recherche d'un polymorphisme de restriction a été entreprise sur 4 inserts (161, 121, 45 et 2) et n'a abouti que pour la sonde 121.

Testé sur un panneau de souris backcross interspécifiques recombinantes pour des marqueurs connus de la région proximale du chromosome 5, le fragment 121 a pu être localisé à moins de 1 cM du gène *reeler*, et apporte donc une information supplémentaire pour la cartographie de cette région chromosomique.

Parmi les expériences évidentes à réaliser pour caractériser le fragment 121 de manière plus complète, mais que le temps imparti à ce travail ne nous a pas permis de terminer, citons :

- l'analyse d'hybridation de la sonde 121 sur les YACs constituant le contig recouvrant la région de *reeler*,
- l'analyse d'hybridation de la sonde 121 sur un panneau de souris congéniques qui permettrait sa localisation orientée par rapport à *reeler*,
- la poursuite de la recherche de polymorphismes de restrictions avec les divers inserts montrant un effet de dose 1-2-3 et localisés dans la région délétée du chromosome 5 de BM3C3.

Conclusion et perspectives

Les travaux du laboratoire ont pour buts l'isolement et la caractérisation du gène *reeler*. Son produit joue un rôle important dans l'agencement architectonique postmigratoire et est donc nécessaire à un développement normal du système nerveux central des mammifères.

Reeler est localisé dans la région proximale du chromosome 5 de souris. Son produit étant inconnu, la seule démarche pour isoler le gène est le clonage positionnel. Cette méthode requiert la présence de marqueurs à moins de 1 cM du gène, cette distance permettant la construction d'un contig de YACs recouvrant la région d'intérêt.

La recherche de nouveaux marqueurs proches de *reeler* se fait par cartographie :

- de sondes isolées par d'autres laboratoires et provenant de la région centromérique du chromosome 5 de souris,
- de sondes localisées dans les régions du chromosome 7 humain cosynténiques avec la région proximale du chromosome 5 de souris,
- de sondes créées par IRS-PCR sur le chromosome 5 de la lignée hybride BM3C3,
- de sondes isolées à partir d'une banque d'ADN complémentaire
- et de sondes créées par microdissection du chromosome 5¹².

C'est cette dernière approche que nous avons particulièrement développée lors de la réalisation de ce mémoire.

Afin de démontrer la fiabilité de la méthode de microdissection du chromosome transloqué 5¹² (contenant la région *reeler*), nous avons mis au point la technique d'hybridation fluorescente *in situ* à partir des produits de microdissection (amplifiés et marqués par la biotine). L'hybridation a été détectée par immunocytochimie et visualisée par microscopie à épifluorescence. Les résultats obtenus ont montré que l'ADN microdisséqué provenait uniquement du chromosome 5¹², indiquant ainsi la fiabilité et la précision de la méthode. L'analyse en FISH de la provenance de l'ADN exogène de certains YACs a également été entreprise, mais n'a pas encore été parfaitement mise au point.

Nous avons ensuite entrepris la recherche de nouvelles sondes par clonage d'ADN microdisséqué, en sélectionnant des clones d'intérêt provenant de la région proche de *reeler*. Par analyses de recombinaisons génétiques, un de ces inserts (appelé "121") a été localisé à moins de 1 cM de *reeler*.

Des analyses en vue de révéler la localisation de la sonde 121 sur les YACs du contig recouvrant la région *reeler*, ainsi que sur un panneau de souris congéniques permettra sa localisation plus fine par rapport à *reeler*.

D'autres inserts sélectionnés en même temps que la sonde 121 devront faire l'objet des mêmes analyses afin de les cartographier.

La technique de clonage de fragments d'ADN microdisséqués s'est donc avérée efficace dans la recherche de marqueurs de la région de *reeler*, et constitue une approche utile dans le cadre général de l'approche d'un locus quelconque.

Bibliographie

- BAUMANN, J. G. J., WEIGANT, J., BORST, P., VAN DUIJN, P. (1980)
Exp. Cell Res., **138** : 485-490
 "A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by *in situ* hybridization of fluorochrome labeled RNA. "
- BAUMANN, J. G. J., WIEGANT, J., VAN DUIJN, P. (1981)
Histochemistry, **73** : 181-193
 "Cytochemical hybridization with fluorochrome-labeled RNA. III increased sensitivity for the use of anti fluorescein antibodies".
- BAUMANN, J. G. J., VAN DER PLOEG, M., VAN DUIJN, P. (1984)
 "Fluorescent hybridochemical procedures : DNA hybridization *in Situ*".
 In : *Investigative microtechnique in medicine and microbiology*.
 Eds. Marcel Dekker, New York, p 41-48
- BEECHEY, C. V., KIRK, M., SEARLE, A. G. (1980)
Cytogenet. Cell. Genet., **27** : 129-146
 "A reciprocal translocation induced in an oocyte and affecting fertility in male mice".
- BOYLE, A. L., FELTQUITE, D. M., DRACOPOLI, N. C., HOUSMAN, D. E., WARD, D. C. (1992)
Genomics, **12** : 106-115
 "Rapid physical mapping of cloned DNA on banded mouse chromosomes by Fluorescence *in situ* Hybridization".
- CASEY, J. & DAVIDSON, N. (1976)
Nucleic Acid Res., **4** : 1539-1552
 "Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and RNA:DNA duplexes at high concentration of formamide".
- COTTER, F. E., HAMPTON, G. M., NASIPURI, S., BODMER, W. F., YOUNG, B. D. (1990)
Genomics, **7** : 257-263
 "Rapid isolation of human chromosome-specific DNA probes from a somatic cell hybrid".

- COTTER, F. E., DAS, S., DOUEK, E., CARTER, N. P., YOUNG, B. D. (1991)
Genomics, **9** : 473-480
 "The generation of DNA probes to chromosome 11q23 by *Alu*-PCR on small numbers of flow-sorted 22q-derivative chromosomes".
- COX, K. H., DE LEON, D.V., ANGERER, L.M., ANGERER, R.C. (1984)
Dev. Biol., **101** : 485-503
 "Detection of mRNAs in sea urchin embryos by *in situ* hybridization using asymmetric RNA probes".
- DAUWERSE, J. G., WIEGANT, J., RAAP, A. K., BREUNING, M. H., VAN OMMEN, G. J. B. (1992)
Hum. Mol. Genet., **1** : 593-598
 "Multiple colors by fluorescence *in situ* hybridization using ratio-labelled DNA probes create a molecular karyotype".
- DIETRICH, W., KATZ, H., LICOLN, S. E., SHIN, S. H., FRIEDMAN, J., DRACOPOLI, N., LANDER, E. S. (1992)
Genetics, **131** : 423-448
 "A genetic map of the mouse suitable for typing intraspecific crosses".
- DUDIN, G., CREMER, T., SCHARDIN, M., HAUSMANN, M., BIER, F., CREMER, C. (1987)
Hum. Genet., **76** : 290-292
 "A method for nucleic acid hybridization to isolated chromosomes in suspension."
- FALCONER, D. S. (1952)
Heredity, **6** : 255-257
 "Location of *reeler* in linkage group III of the mouse".
- FISCHER, D., WEISENBERGER, D., SCHEER, V. (1991)
Chromosoma, **101** : 133-140
 "Assigning functions to nucleolar structures".
- FLAVELL, R. A., BIRFELDER, J. E., SANDERS, J. P. M., BORST, P. (1974)
Eur. J. Biochem., **47** : 535-543
 "DNA:DNA hybridization on nitrocellulose filters. I. General considerations and non-ideal kinetics".
- GOFFINET, A. M. (1992)
Int. J. Dev. Biol., **36** : 101-107
 "The *reeler* gene: a clue to brain development and evolution".

- GROPP, A., HILWIG, I., SETH, P. K. (1988)
 "Fluorescence chromosome banding patterns produced by a benzimidazole derivative."
 In: *Chromosome identification - technique and applications in biology and medicine*.
 Eds. T. CASPERSSON & L. ZECH
 Academic Press, New York & London. p 302.
- HADANO, S., WATANABE, M., YOKOI, H., KOGLI, M., KONDO, I., TSUCHIYA, H., KANAZAWA, I., WASAKA, K., IKEDA, J. E. (1991)
Genomics, **11** : 364-373
 "Laser microdissection and single unique primer PCR allow generation of regional chromosome DNA clones from a single human chromosome".
- HAMES, B. D. & HIGGINS, S. J. (1985)
 In : *Nucleic acid hybridization-a practical approach*.
 IRL Press, Oxford-Washington.
- HARPER, M. E., ULLRICH, A., SAUNDERS, G. F. (1981)
Chromosoma, **83** : 431-439
 "Localization of the human insuline gene to the distal end of the short arm of chromosome 11".
- HASTIE, N. D. (1989)
 "Highly repeated DNA families in the genome of *Mus musculus*".
 In: *Genetic variants and strains of the laboratory mouse*.
 Oxford Univ. Press, London, pp 559-573
- HERRMANN, B. G., LABEIT, S., POUTSKA, A., KING, T. R., LEHRACH, H. (1990)
Nature, **343** : 617-657
 "Cloning of the T gene required in mesoderm formation of the mouse".
- HILLAN, K. J., FARQUHARSON, M., HARVIE, R., McKEE, T. A., MACSWEEN, R. N. M., McNICOL, A. M. (1990)
J. Pathol., **160** : 164A
 "Detection of messenger RNA in formalin fixed rat tissues using RNA probes labeled with a new nucleotide analogue digoxigenin-11-UTP".
- HINKJAER, J., KOCH, J., MOGENSEN, J., PEDERSEN, S., FISCHER, H., NYGAARD, M., JUNKER, S., GREGERSEN, N., KOLURAA, S., THERKESSEN, A. J., BOLUND, L. (1991)
BFE, **8** : 752-756
 "Primed *in situ* labeling of nucleic acids".

HIROTA, T., TSUKAMOTO, K., DENG, H. D., YOSHIURA, K. I., OHTA, T., TOHMA, T., KIBE, T., HARADA, N., JINNO, Y., NIIKAWA, N. (1992)

Genomics, **13** : 349-354

"Microdissection of human chromosomal regions 8q23.3-q24.11 and 2q33-qter: construction of DNA libraries and isolation of their clones".

HWU, H. R., ROBERTS, J. W., DAVIDSON, E. H., BRITTEN, R. J. (1986)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83** : 3875-3879

"Insertion and/or deletion of many repeated DNA sequences in human and higher ape evolution".

JHANWAG, S. C., NEEL, B. G. HAYWARD, W. S., CHAGANTI, R. S. K. (1984)

Cytogenet. Cell Genet., **38** : 73-75

"Localization of the cellular oncogene *ABL*, *SIS* and *FES* on human germ-line chromosome".

JOHN, H., BIRNSTIEL, M., JONES, K. (1969)

Nature, **223** : 582-587

"RNA:DNA hybrids at the cytogenetical level".

JOHNSTON, J. R. (1988)

"Chapter 5 : Yeast genetics, molecular aspects."

In : *Yeast - a practical approach*.

Eds. I. CAMPBELL & J. H. DUFFUS

IRL Press p 108

KORENBERG, J. R. & RYKOWSKI, M. C. (1988)

Cell, **53** : 391-400

"Human genome organization : *Alu* lines and the molecular structure of metaphase chromosome bands".

LANGER, P. R., WALDROP, A. A., WARD, D. C. (1981)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78** : 6633-6637

"Enzymatic synthesis of biotin labeled polynucleotides : novel nucleic acid affinity probes".

LANSDORP, P. M., VAN DER KWAST, T. H., de BOER, M., ZEIJLEMAKER, W. P. (1984)

J. Histochem. Cytochem., **32** : 172-178

"Stepwise amplified immunoperoxidase (PAP) staining.

I. Cellular morphology in relation to membrane markers".

LEARY, J. L., BRIGATI, D. J., WARD, D. C. (1983)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80** : 4045-4049

"Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin labelled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose : bio-blots".

- LEDBETTER, S. A., GARCIA-HERAS, J., LEDBETTER, D. H. (1990a)
Genomics, 8 : 614-622
 "PCR-karyotype of human chromosomes in somatic cell hybrids".
- LEDBETTER, S. A., NELSON, D. L., WARREN, S. T., LEDBETTER, D. H. (1990b)
Genomics, 6 : 475-481
 "Rapid isolation of DNA probes within specific chromosome regions by Interspersed Repetitive Sequence Polymerase Chain Reaction".
- LEWIN, B. (1988)
 In: *Gènes*
 Eds. Médecine-Sciences Flammarion, p. 58.
- LORENS, J. B. (1991)
PCR Methods and Applications, 1 : 140-141
 "Rapid and reliable cloning of PCR products".
- LÜDECKE, H.-J., SENGER, G., CLAUSSEN, U., HORSTHEMKE, B. (1989)
Nature, 338 : 348-350
 "Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification".
- MANIATIS, T., FRITSCH, E. F., SAMBROOK, J. (1989)
 "Molecular cloning, a laboratory manual".
 Cold Spring Harbor Laboratories.
- MELTZER, P. S., GUAN, X. Y., BURGESS, A., TRENT, J. M. (1992)
Nature Genetics, 1 : 24-28
 "Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application".
- NELSON, D. L., LEDBETTER, S. A., CORBO, L., VICTORIA, M. F., RAMIREZ-SOLIS, R., WEBSTER, T. D., LEDBETTER, D. H., CASKEY, C. T. (1989)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86 : 6686-6690
 "Alu polymerase chain reaction: a method for rapid isolation of human-specific sequences from complex DNA sources".
- PARDUE, M. L., & GALL, J. G. (1969)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 64 : 600-604
 "Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations".
- PINKEL, D., STRAUME, T., GRAY, J. W. (1986)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 : 2934-2938
 "Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity fluorescence hybridization".

PINKEL, D., LANDEGENT, J., COLLINS, C., FUSCOE, J., SEGRAVES, R., LUCAS, J., GRAY, J. W. (1988)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85** : 9138-9142

"Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4".

RAAP, A. K., MARIJNEN, J. G. J., VROLIJK, J., VAN DER PLOEG, M. (1986)

Cytometry, **7** : 235-242

"Denaturation, renaturation, and loss of DNA during *in situ* hybridization procedures".

RAAP, A. K., HOPMAN, A. H. N., VAN DER PLOEG, M. (1989)

"Use of hapten modified nucleic and probes in DNA *in situ* hybridization".

In : *Techniques in immunocytochemistry*.

Academic Press **4** : 167-197

RABIN, M., WATSON, M., BARKER, P. E., RYAN, J., BREG, W., RUDDLE, F. M., (1984)

Cytogenet. Cell Genet., **38** : 70-72

"N-ras transforming gene maps to region p11-p13 on chromosome 1 by *in situ* Hybridization".

RAKIC, P. (1990)

Experientia, **46** : 882-891

"Principles of neural cell migration".

RENZ, M. & KURZ, C. (1984)

Nucleic Acid Res., **12** : 3435-3444

"A colorimetric method for DNA hybridization".

RÖHME, D., FOX, H., HERRMANN, B., FRISCHAUF A. M., EDSTRÖM, J. E., MAINS, P., SILVER, L. M., LEHRACH, H. (1984)

Cell, **36** : 783-788

"Molecular clones of the mouse *t* complex derived from microdissected metaphase chromosomes".

ROMMENS, J., IANNUZZI, M., KEREM, B., DRUMM, M., MELMER, G., DEAN, M., ROZMAHEL, R., COLE, J., KENNEDY, D., HIDAKA, N., ZSIGA, M., BUCHWALD, M., RIORDAN, J., TSUI, L., COLLINS, F. (1989)

Science, **242** : 1059-1065

"Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping".

- SAIKI, R., SCHARF, S., FALOONA, F. A., MULLIS, K. B., HORN, G. T., EHRlich, H. A., ARNHEIM, M. (1985)
Science, **230** : 1350-1354
 "Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia".
- SAUNDERS, R. D., GLOVER, D. M., ASHBURNER, M., SIDENKIAMOS, I., LOUIS, C., MONASTIRIOTI, M., SAVAKIS, C., KAFATOS, F. (1989)
Nucleic Acids Res., **17** : 9027-9037
 "PCR amplification of DNA microdissected from a single polytene band: a comparison with conventional microcloning".
- SCALENGHE, F., TURCO, E., EDSTRÖM, J. E., PIROTTA, V., MELLI, M. (1981)
Chromosoma, **82** : 205-216
 "Microdissection and cloning of DNA from a specific region of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes".
- SCHROEDER, W. T., LOPEZ, L. C., HARPER, M. E., SAUNDERS, G., (1984)
Cytogenet. Cell Genet., **38** : 76-79
 "Localization of the human glucagon gene (CGC) to chromosome segment 2936-37".
- SELLERI, L., HERMANSON, G. G., EUBANKS, J. H., EVANS, G. A. (1991)
GATA, **8(2)** : 59-66
 "Chromosomal in situ hybridization using yeast artificial chromosomes".
- SENGER, G., LÜDECKE, H. J., HORSTHEMKE, B., CLAUSSEN, U. (1990)
Hum. Genet., **84** : 507-511
 "Microdissection of banded human chromosomes".
- SPIEGELMAN, G. B., HABER, J. E., HALVORSON, H. D. (1973)
Biochemistry, **12** : 1234-1242
 "Kinetics of ribonucleic acid-deoxyribonucleic acid membrane filter hybridization".
- TAUTZ, D. & PFEIFFELE, C. (1989)
Chromosoma, **98** : 81-85
 "A non radioactive *in situ* Hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback".
- TELENIUS, H., CARTER, N. P., BEBB, C. E., NORDENSKJÖLD, M., PONDER, B. A. J., TUNNACLIFFE, A. (1992)
Genomics, **13** : 718-725
 "Degenerate Oligonucleotide-Primed PCR (DOP-PCR): general amplification of target DNA by a single degenerate primer".

THE HUNTINGTON'S DISEASE COLLABORATIVE RESEARCH GROUP (1993)

Cell, **72** : 971-983

"A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes".

VISCIDI, R. P., CONNELLY, C. J., YOLKEN, R. H. (1980)

J. Clin. Microbiol., **23** : 311-317

"Novel clinical method for the preparation of nucleic acids for non-isotopic hybridization".

VISCIDI, R. P. (1988)

"Nucleic acid hybridization assays - DNA probes."

In : *Handbook of serodiagnosis in infectious diseases*.

Eds. R. C. MATTHEWS & J. P. BURNIE

Butterworth Heinemann. p 106-142.

WELSH, J. & McCLELLAND M. (1990)

Nucleic Acid Res., **18** : 7213-7218

"Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers".

WETMUR, J. G. (1975)

Biopolymers, **14** : 2517-2524

"Acceleration of DNA renaturation rates".

WETMUR, J. G. & DAVIDSON, N. (1986)

J. Mol. Biol., **31** : 349-370

"Kinetics of renaturation of DNA".

WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J. A., TINGEY, S. V. (1990)

Nucleic Acids Res., **18** : 6531-6535

"DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers".

ZARDA, B., ARMANN, R., WALLNER, G., SCHLEIFER, K. H. (1991)

J. Gen. Microbiol., **137** : 2823-2830

"Identification of single bacterial cells using digoxigenin-labeled rRNA-targeted oligonucleotides".