



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Isolement et caractérisation de segments codants de la région Reeler du chromosome 5 de la souris

Mvé, Armand

Award date:
1994

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

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

**Isolement et Caractérisation de Segments Codants
de la Région *Reeler*
du Chromosome 5 de la souris.**

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

Armand Mvé

Décembre 1994

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/72.44.20

**Isolement et Caractérisation de Segments Codants
de la Région *Reeler*
du Chromosome 5 de la souris.**

MVE Armand

Résumé

Dans le cadre du projet de clonage positionnel de la mutation *reeler* de la souris, nous avons appliqué des techniques de capture d'ADNc et d'amplification d'exons à partir d'ADN recouvrant la région *reeler*. Parmi les fragments isolés, 4 clones appelés FAK12, FAK19, FAK25 et FAK55, obtenus par exon trapping 3', sont particulièrement intéressants et ont été analysés plus en détail. Par la technique de RT-PCR, nous avons montré que ces 4 fragments proviennent de gènes exprimés dans le cerveau embryonnaire, dans le cerveau adulte, dans le rein et dans le testicule. Aucun résultat n'a été obtenu en Northern blot, sans doute à cause de la petite taille des exons obtenus. Des analyses de séquence ont montré que l'exon FAK25 appartient au gène *Mss1* qui code pour la composante 7 du protéasome 26S. Le gène humain correspondant, *MSS1*, a été localisé sur le chromosome 7, en position 7q22, ce qui nous permet de conclure que le gène *reeler* humain est très probablement situé lui-aussi en 7q22. Deux de nos exons, FAK12 et FAK55 sont absents dans l'ADN et l'ARN des souris *reeler*-Edinburgh. Cette observation nous a permis de démontrer que cet allèle correspond à une délétion d'environ 150 kb. Bien que nous n'ayons pas pu le démontrer, il est possible que l'un des deux clones FAK12 et FAK55 corresponde à un exon du gène *reeler*.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Décembre 1994

Promoteur : J. Vandenhaute

Co-promoteur : A. M. Goffinet

Je remercie le Professeur J. Vandehaute, Promoteur, à qui je dois mon engouement pour la génétique et la réalisation de ce mémoire.

Le Professeur André M. Goffinet m'a aimablement accueilli dans son laboratoire. J'ai bénéficié de ses conseils, de son temps, et de son appui, ce dont je lui sais gré.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Catherine Lambert. Ses encouragements, remarques et suggestions ont rendu captivante mon introduction dans l'univers de l'ADN .

Je remercie tout particulièrement Christiane Dernoncourt à qui je dois la bonne finition de ce travail. Son concours moral et professionnel m'a été très indispensable.

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire : Isabelle ; Inès ; Béatrice ; Danielle ; Daniel ; Mr I. Becsei et Thanh.

Je remercie le Professeur J. Remacle, F. Mainferne, A. Tibor et I. Housen d'avoir accepté de lire ce mémoire.

Enfin, je tiens à remercier la famille Dérèse, pour la motivation qu'elle a suscité en moi.

A mes parents,

Merci.

Table Des Matières

Chapitre 1. INTRODUCTION

1.	Situation du problème	1
1.1.	Rappel de la génétique du locus <i>reeler</i>	2
1.2.	Phénotype <i>reeler</i>	3
2.	Stratégie du clonage positionnel du gène <i>reeler</i>	6
2.1.	Carte génétique de la région <i>reeler</i>	7
2.2.	Carte physique de la région <i>reeler</i>	9
3.	Méthodes d'isolement des séquences codantes d'un contig	9
3.1.	Recherche d'îlots CpG hypométhylés.....	9
3.2.	Hybridation en solution d'ADNc à l'ADN génomique de YAC.....	10
3.3.	Techniques d'amplification d'exons.....	11
4.	Objectif du travail	14

Chapitre 2. MATERIEL ET METHODES

1.	Techniques standard	15
2.	Techniques en rapport avec l'ARN	16
2.1.	Prelèvement de tissus.....	16
2.2.	Extraction de l'ARN en une seule étape.....	17
2.3.	Isolement d'ARN poly(A) ⁺	20
2.4.	Analyse de l'ARN par hybridation en Northern blot.....	22
2.5.	Analyse de l'ARN par RT-PCR.....	27
3.	Purification d'ADN de YAC	30
3.1.	Préparation de l'ADN de levure de haut poids moléculaire.....	30
3.2.	Electrophorèse en champ pulsé d'ADN de YAC.....	32
3.3.	Extraction et purification d'ADN de YAC après le PFGE.....	32
4.	Amplification d'exon 3' à partir d'ADN de YAC	33
4.1.	Vecteur pTAG4.....	34
4.2.	Ligation d'ADN de YAC à pTAG4.....	34
4.3.	Transformation de <i>E. coli</i> . DH5a.....	35
4.4.	Transfection des cellules COS-7.....	35
4.5.	Procédure d'amplification d'exons par RT-PCR.....	37
5.	Analyse des candidats exons	44
5.1.	Séquençage.....	44
5.2.	Comparaison des séquences aux banques de données.....	45
5.3.	Vérification de la région d'origine.....	45
5.4.	Zoo blot.....	46
5.5.	Northern blot.....	46
5.6.	RT-PCR.....	47

Chapitre 3. RESULTATS ET DISCUSSION

1.	Résultats.....	48
1.1.	Isolement d'exons 3' terminaux.....	48
1.2.	Analyse de l'exon 3' FAK19.....	50
1.3.	Analyse de l'exon 3' FAK12.....	53
1.4.	Analyse de l'exon 3' FAK55.....	57
1.5.	Analyse de l'exon 3' FAK25.....	60
2.	Discussion générale et conclusion.....	63

Chapitre 4. BIBLIOGRAPHIE

LISTE DES ABREVIATIONS

CHAPITRE 1

Introduction

1. Situation du problème.

Ce mémoire s'inscrit dans un projet d'isolement et de caractérisation des séquences codantes de la partie proximale du chromosome 5 de la souris, qui contient le locus *reeler*, dans le but de réaliser le clonage positionnel du gène *reeler*.

1.1. Rappel de la génétique du locus *reeler*.

Reeler est une mutation neurologique récessive de la souris qui entraîne, chez les animaux homozygotes, une ataxie et des tremblements apparaissant vers le 15^{ième} jour après la naissance. La mutation fut isolée pour la première fois par Falconer à Edinburg en 1948 (Falconer, 1951) ; le symbole de cet allèle est r^{Ed} . Un second allèle spontané, noté r^{Orl} , apparut en 1969 à Orléans. Une troisième mutation spontanée fut identifiée au Jackson Laboratory voici quelques années, mais ne fut pas conservée (DBA/2). Un quatrième allèle, appelé *reeler*-Albany (r^{Alb}), fut induit par traitement de mâles par le mutagène chlorambucile. Enfin, récemment, un allèle de *reeler* a été obtenu par transgénèse au Roche Institute de Nutley et a reçu le symbole de r^{Tg} . Le caractère allélique de ces mutations a été vérifié par complémentation ainsi que par cartographie génétique. Deux allèles sont utilisés dans notre travail, à savoir l'allèle classique ("Edinburgh") et l'allèle "Orléans". Ce dernier est maintenu sur un fond isogénique BALB/c (noté C). L'allèle Edinburgh est disponible sur fond isogénique C57Bl/6 (noté B6). Il n'est pas apparu dans cette lignée mais bien dans une variété disparue, appelée "white belly", de sorte que les animaux contrôles isogéniques ne sont pas disponibles. Nous disposons aussi d'une lignée congénique de l'allèle classique transféré sur fond BALB/c. La construction de lignées congéniques a permis de comparer les 2 allèles sur les 2 backgrounds C et B6, et de montrer que les différences morphologiques entre allèles r^{Ed} et r^{Orl} sont liées au background.

1.2. Le phénotype *reeler*.

Des études morphologiques du développement cérébral (revues par Goffinet, 1984) suggèrent que la présence d'un allèle normal au locus *reeler* est nécessaire pour la stabilisation et l'organisation des neurones à la fin de leur migration. En effet, alors que les neurones de souris normales se disposent en patterns architectoniques harmonieux, la formation architectonique est grossièrement déficiente chez les embryons homozygotes *reeler*, et ce au niveau de tous les endroits du système nerveux central qui ont été étudiés soigneusement. En revanche, le gène *reeler* ne semble pas perturber le développement du système nerveux périphérique ni des organes non neurologiques.

Rappelons que le SNC dérive de l'épiblaste embryonnaire sous la forme d'une plaque neurale qui s'invagine avant de se refermer en tube neural . Alors que ce dernier donne naissance au système ventriculaire, l'ensemble du tissu nerveux dérive de sa paroi .

La prolifération des précurseurs neuronaux a lieu autour des ventricules, dans la zone ventriculaire, et s'étend généralement dans une période comprise entre les onzième et dix-septième jours embryonnaires. A partir du 14ième jour embryonnaire, les jeunes neurones postmitotiques entament une migration qui les conduit depuis la zone ventriculaire où ils sont nés jusqu'à leur territoire de destination où ils se différencient. Sauf dans quelques cas, dont le plus connu est celui des grains externes du cervelet, la migration neuronale est radiaire, utilisant comme substrat les fibres radiaires fournies par les prolongements neuro-épithéliaux des cellules de la zone ventriculaire. Dès la fin de leur migration radiaire, les neurones postmigratoires s'organisent un patterns cellulaires appelés architectoniques. Cette disposition architectonique précoce est stable et

préfigure l'architectonique adulte. Elle précède le déploiement des arborisations dendritique et axonale (différenciation), l'établissement progressif des connexions ou synaptogenèse, et enfin le développement des gaines de myéline (myélinogenèse).

La mutation *reeler* touche sélectivement le développement de l'architectonique précoce. En effet, les neurones *reeler* apparaissent en nombre normal et au moment normal au cours de l'embryogenèse. Leur migration radiale initiale depuis la zone ventriculaire vers leur position finale se passe aussi normalement, de même que les événements de différenciation cellulaire et l'établissement des jonctions synaptiques. La mutation semble plutôt affecter la capacité des neurones à s'organiser en structures architectoniques normales en fin de migration, comme s'il leur manquait un facteur de "stabilisation neuronale postmigratoire". En conséquence, les phénomènes de maturation se produisent sur une structure architectonique mal ordonnée, ce qui conduit à un développement de plus en plus anarchique du SNC. L'anomalie est particulièrement perceptible au niveau du cervelet, du cortex cérébral et de l'hippocampe. Par exemple, le cortex cérébral de la souris *reeler* se développe suivant un gradient histogénétique dirigé de dehors en dedans, les neurones qui naissent les derniers migrant en dedans de leurs prédécesseurs, alors que le gradient de corticogenèse est dirigé de dedans en dehors chez tous les mammifères normaux, c'est-à-dire que les neurones en migration traversent les couches précédentes pour s'établir à des niveaux de plus en plus superficiels. Quant au cervelet, il est de loin l'organe le plus affecté par la mutation, avec une atrophie majeure et une absence quasi totale de foliation. C'est d'ailleurs l'atrophie cérébelleuse qui est responsable des signes cliniques d'ataxie et de tremblement.

Ces observations morphologiques 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, de sorte que le gène *reeler* participe au mécanisme de régulation du développement cérébral. Par ailleurs, il est également probable que le gène *reeler* intervienne dans l'évolution du cerveau, sur la lignée qui conduit des reptiles ancestraux aux mammifères (Goffinet, 1990, 1992). En effet, des études d'embryologie comparée ont montré que l'organisation architectonique du cortex des embryons de reptiles est primitive, rappelant par certains aspects celle des souris *reeler*, et que le gradient d'histogénèse corticale chez les reptiles est dirigé de dehors en dedans, comme chez les mutants *reeler*, mais dans le sens opposé à celui des mammifères.

L'intérêt de cloner le gène *reeler* est double. D'un point de vue fondamental, la souris *reeler* est un excellent modèle permettant l'étude d'aspects originaux du développement et de l'évolution du SNC. D'un point de vue plus clinique, l'élucidation du mécanisme d'action du gène *reeler* permettrait une meilleure compréhension des cas d'hérotropies neuronales et d'anomalies architectoniques, comme celles qui accompagnent le syndrome hépato-cérébro-rénal ou maladie de Zellweger (Shimozawa et al., 1992); plus généralement, elle contribuerait à une meilleure analyse de la débilité mentale idiopathique.

Les facteurs responsables de l'établissement d'une configuration stable des structures neuronales ne sont pas connus. Alors que plusieurs molécules d'adhésion cellulaire sont impliquées dans le développement du SNC, les données de cartographie génétique les excluent en tant que gènes *reeler* candidats. En l'absence d'informations biochimiques et

immunologiques sur le produit du gène *reeler* la seule approche du gène envisageable est le clonage positionnel.

2. Stratégie du clonage positionnel du gène *reeler*.

La stratégie du clonage positionnel permet l'isolement d'un gène uniquement sur base de sa localisation chromosomique. Elle consiste à isoler des marqueurs génétiques situés de part et d'autre du gène d'intérêt et rapprochés de lui de moins d'un centimorgan (cM) puis à entreprendre, à partir de ces marqueurs, une marche sur le chromosome ("chromosome walking") en direction du gène jusqu'à ce que la région comprise entre les marqueurs flanquants soit couverte sous la forme d'un agencement de fragments génomiques chevauchants appelé "contig". La dernière étape de la stratégie consiste à isoler, à partir de l'ADN du contig, des séquences codantes dont la caractérisation aboutit à l'identification du gène d'intérêt. Le clonage positionnel a été appliqué avec succès pour l'identification des gènes impliqués dans plusieurs pathologies humaines telles que la mucoviscidose (Green et al., 1990 ; Rommens et al., 1989) et la maladie de huntington (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

2.1. Carte génétique de la région *reeler*.

Lorsque le clonage positionnel du gène *reeler* fut entrepris par notre laboratoire, la cartographie de la région était rudimentaire. Dans un premier temps, le gène *reeler* a été localisé génétiquement (Goffinet et al., 1991 ; Deroncourt et al., 1991), par rapport à 3 marqueurs connus de la partie proximale du chromosome 5 : le locus Multidrug resistance (*Pgy-1*) à 7 cM en position proximale ; le gène *Engrailed-2* (*En-2*) à 8 cM en position distale ; et le point de translocation *T(5;12)31H* situé à 2 cM en position distal du locus *reeler*. Comme le montre les distances génétiques estimées, *reeler* est tellement éloigné de ces marqueurs que l'isolement de marqueurs plus proches du gène est devenu indispensable.

Depuis 1991, le travail a surtout consisté à sélectionner et à localiser par rapport au locus *reeler* un certain nombre de marqueurs. La technique d'IRS-PCR (Interspersed Repetitive Element-Polymerase Chain Reaction ; Simmer et al., 1991) qui consiste à amplifier l'ADN comprise entre 2 séquences répétées, a permis au laboratoire d'exploiter une lignée cellulaire hybride hamster-souris spécifique du chromosome 5 de souris, en sélectionnant la sonde *CD9* qui a été par la suite positionnée à une distance de 4,2 cM de *reeler*.

L'analyse des microsatellites (Love et al., 1990), basée sur l'amplification de l'ADN de séquences di- ou trinuécléotidiques répétées plusieurs dizaines de fois, à partir d'amorces correspondant aux séquences uniques flanquants ces microsatellites, a permis au groupe d'Eric Lander (MIT) de construire une carte du génome de souris composée de microsatellites (Dietrich et al., 1992) répartis sur l'ensemble des chromosomes. Le laboratoire a testé, pour leur liaison à *reeler*, des microsatellites de la région

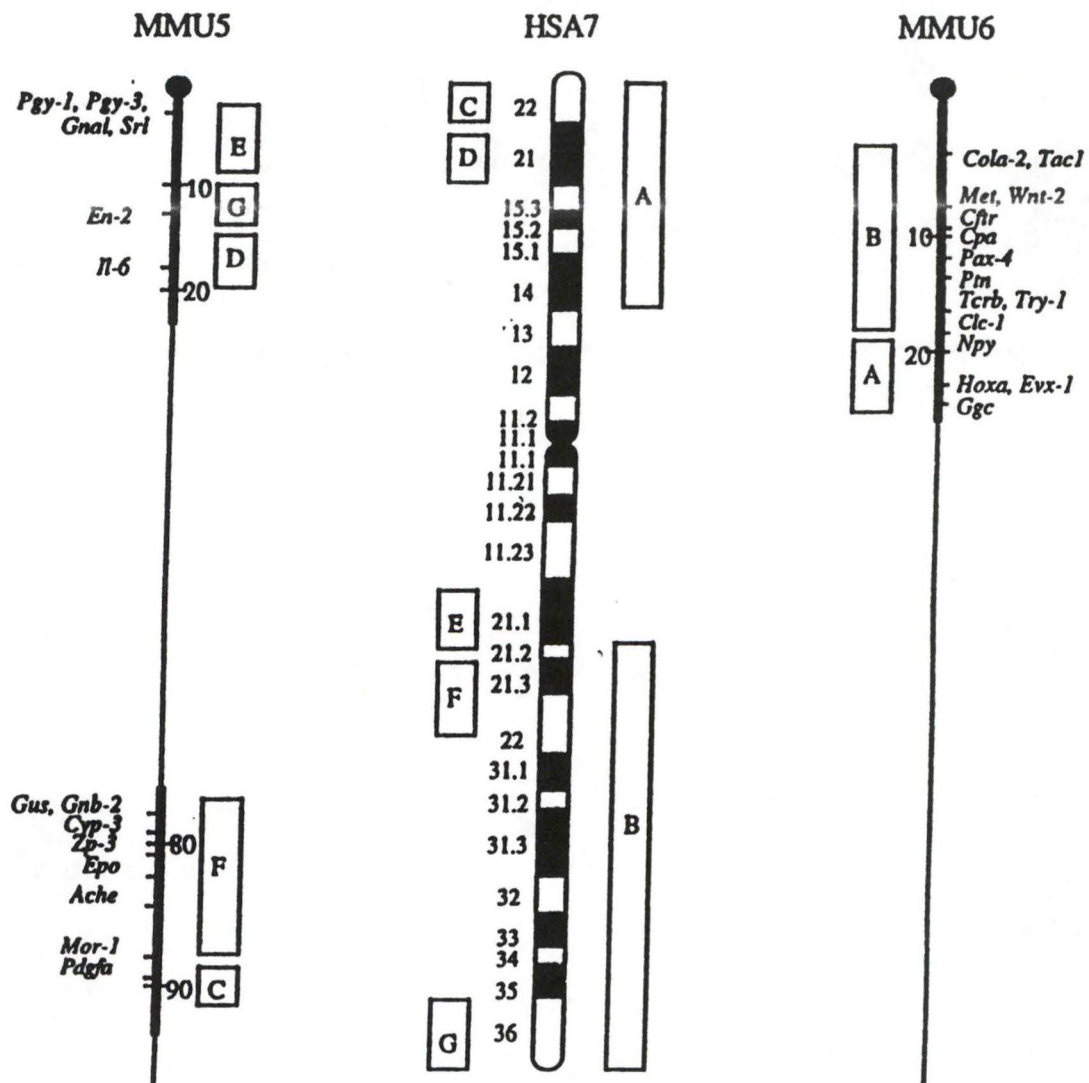


Figure 1 : Carte comparée des régions d'homologie entre le chromosome 5 de souris (MM5) et le chromosome 7 humain (HSA 7). Les régions d'homologie entre le chromosome 7 humain et le chromosome 6 de souris (MM6) sont également représentées. *Reeler* est probablement localisé dans le bloc E.

proximale du chromosome 5 de souris. Le marqueur *D5Mit66* a été localisé à une distance de 8,9 cM de *reeler*, alors que les microsatellites *D5Mit61* et *D5Mit72* se sont avérés intéressants et ont été retenus comme les marqueurs les plus proches.

Un autre marqueur utile est un locus d'intégration d'un virus de type MuLV xénotrope, appelé *Xmv-45*. Ce locus a été étudié au moyen de sondes oligonucléotidiques spécifiques des provirus xénotropes. Les sondes oligonucléotidiques étant difficilement utilisables, un fragment d'ADN flanquant le provirus, fourni par W. Frankel, a été utilisé pour mesurer la distance entre *Xmv45* et *reeler*, estimée à 0,53 cM (Beckers et al., 1993).

Les données de cartographie comparée de l'homme et de la souris démontrent l'existence d'une grande homologie entre les chromosomes 5 de souris et 7 humain (figure 1). Sur base de l'existence de groupes cosynténiques, des marqueurs humains ont pu être localisés dans la partie proximale du chromosome 5 et leur distance par rapport à *reeler* déterminée. Le gène *Hgf* (gène humain HGF ; hépatocyte growth factor : localisation en 7q21) a été localisé à 3,5 cM de *reeler*, en position proximale ; *5HT5A* (récepteur à la sérotonine, type 5A : 7q36) a pu être localisé à 3,3 cM, en position distale .

L'ensemble des résultats de cartographie a permis la construction d'une carte génétique de l'extrémité centromérique du chromosome 5 et la sélection de deux marqueurs adéquats (locus *Xmv45* à 0,53 cM de *reeler* et le microsatellite *D5Mit61* à 0,4 cM de *reeler*) comme point de départ de la marche vers *reeler*. Au cours des travaux de cartographie, il est apparu que le locus *D5Mit72* est en position distale de *reeler*, ce qui a encore réduit

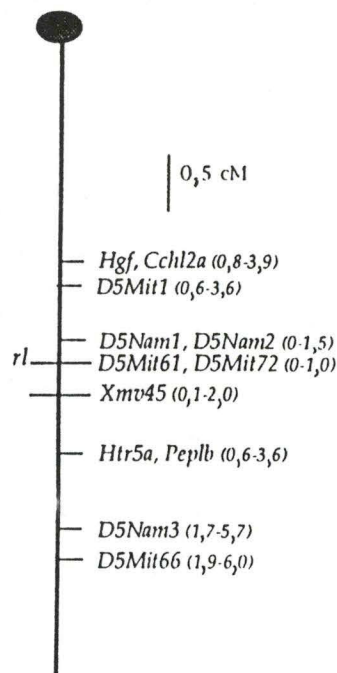


Figure 2 : Carte génétique de la partie du chromosome 5 de souris contenant *reeler* (Beckers et al., 1994). Les distances génétiques sont exprimées en cM; avec un intervalle de confiance à 95%

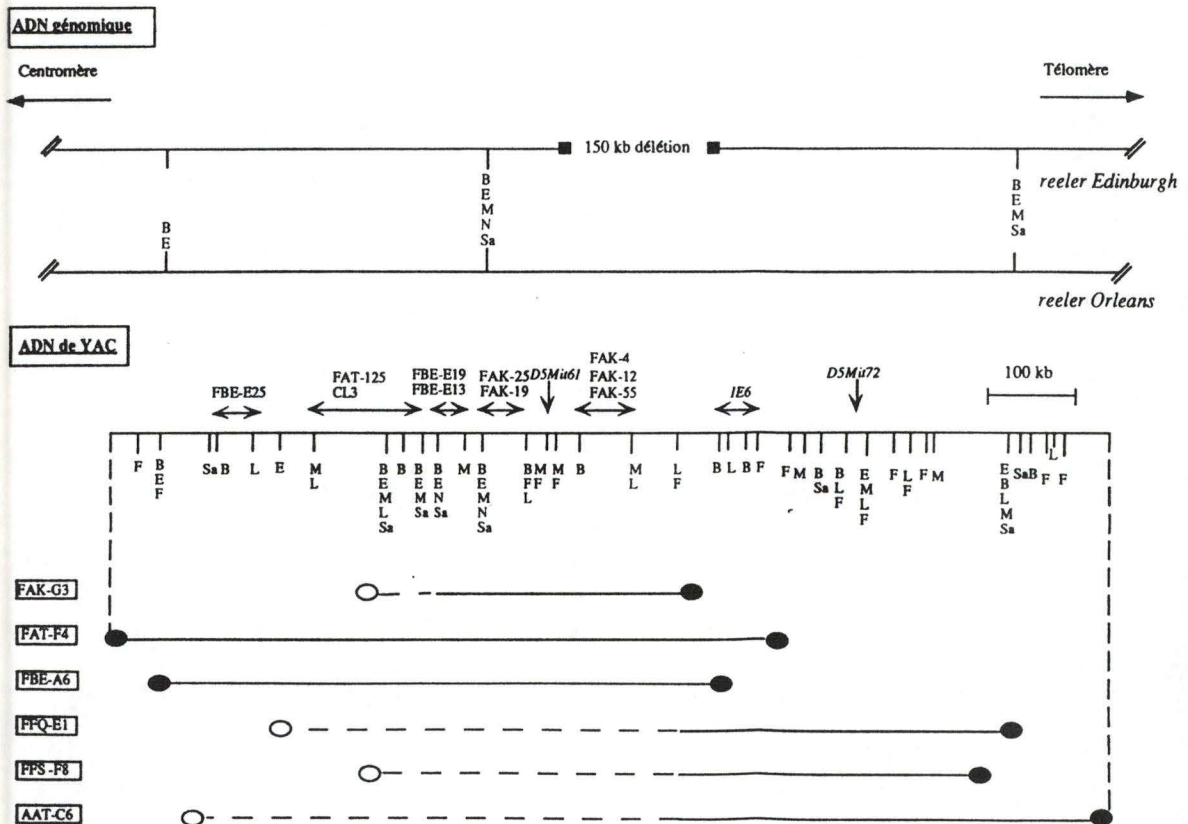


Figure 3 : Carte physique du contig contenant le gène *reeler*.

La partie inférieure du schéma représente la carte de restriction de l'ADN des YACs et l'organisation de ces YACs sous forme de contig. La carte de restriction préliminaire de l'ADN génomique des deux allèles *reeler Ed* et *Orl*. est présentée à la partie supérieure de la figure. Les cercles vides et pleins représentent respectivement des extrémités chimériques et non chimériques de YACs. Le chimérisme des YACs est indiqué par des lignes interrompues. B=BssHII, E=EagI, F=SfiI, L=Sall, M=MluI, N=NotI, Sa=SacII.

l'intervalle d'intérêt à la région comprise entre *D5Mit61* et *D5Mit72*. La carte génétique fine de la région (Beckers et al., 1994) est donnée à la figure 2.

2.2. Carte physique de la région *reeler*.

Sur base des données exposées plus haut, l'isolement de clones de chromosomes artificiels de levure ou YACs contenant les marqueurs *Xmv45*, *D5Mit61* et *D5Mit72* a été entrepris, en criblant les banques de l'ICRF (London) et de Princeton. Par clonage des extrémités des clones YAC, il a été possible d'aligner des clones contigus jusqu'à couvrir la zone génomique contenant les marqueurs *D5Mit61* et *D5Mit72*, et de démontrer que la région clonée contient le locus *reeler*, de sorte que cet ensemble de clones forme un contig contenant *reeler*. Une carte de restriction détaillée du contig et de la région génomique correspondante, appelée carte physique, a été établie (Bar et al., 1994) La carte physique du contig contenant le locus *reeler* est montrée à la figure 3.

3. Méthodes d'isolement des séquences codantes d'un contig.

3.1. Recherche d'îlots CpG hypométhylés.

Alors que les résidus C des dinucléotides CpG sont le plus souvent méthylés, il existe, dans le génome, des "îlots CpG" caractérisés par une

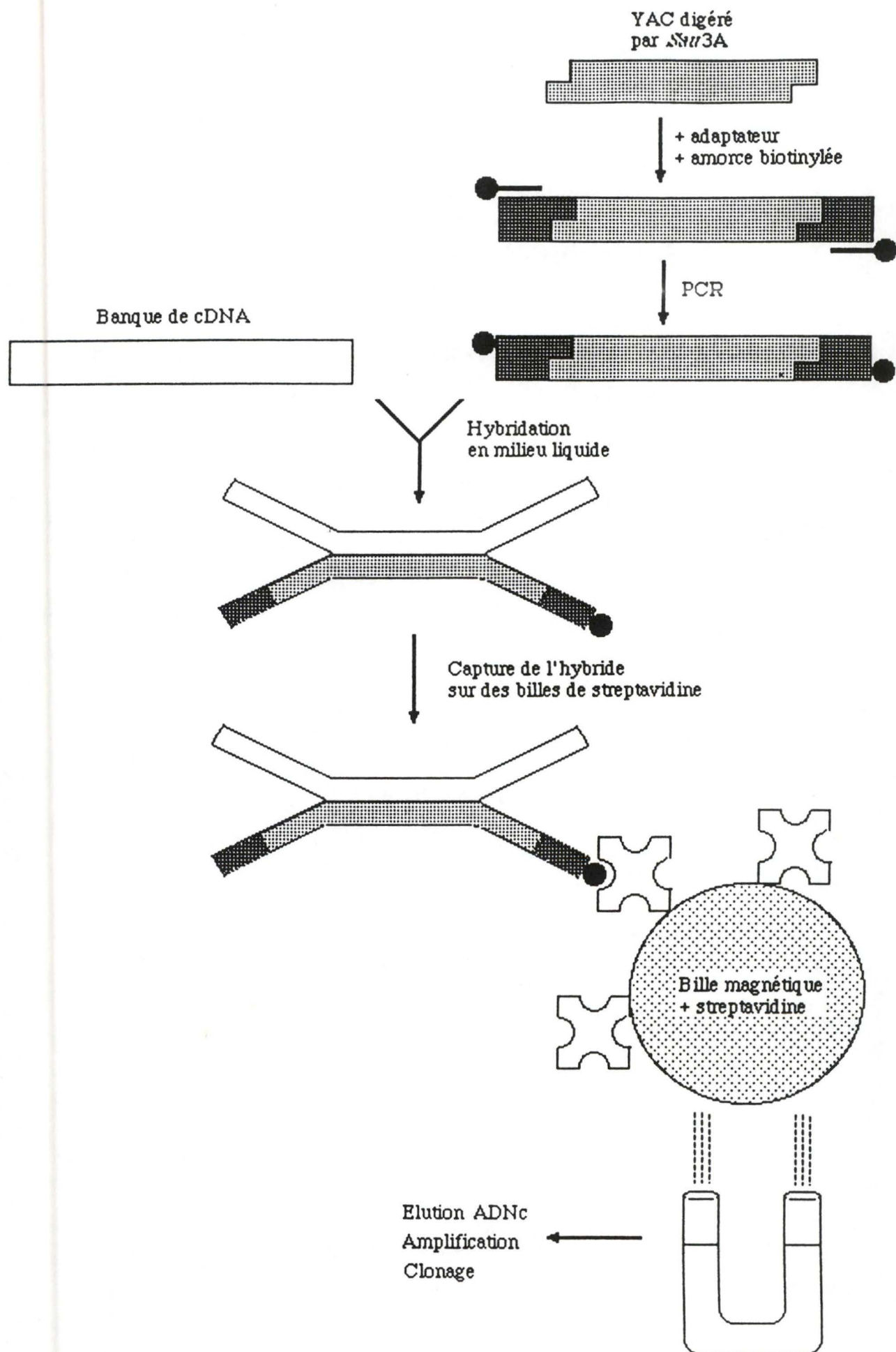


Figure 4 : Principe de l'isolement de séquences codantes par capture magnétique.

densité élevée de dinucléotides CpG non méthylés. Ces sites génomiques sont préférentiellement clivés par les enzymes de restriction qui contiennent un ou plusieurs résidus CpG dans leur site de reconnaissance (Bird, 1987). La plupart des gènes ubiquistes transcrits par la RNA polymérase II, de même que certains gènes montrant une expression spécifique de tissu sont associés à des îlots CpG. Ces derniers sont le plus souvent associés aux extrémités 5' des gènes, bien que certains aient été trouvés associés aux extrémités 3' et à l'intérieur-même des séquences transcrites (Gardiner-Garden et al., 1987). Une approche des segments codants est donc de déterminer les amas de sites de restriction pour les enzymes contenant des CpG dans leur site et de cloner préférentiellement des fragments engendrés par ces enzymes.

3.2. Hybridation en solution d'ADNc à l'ADN génomique de YAC.

Les cinétiques d'hybridation sur filtre sont difficiles à prédire par rapport aux cinétiques d'hybridation en solution (Young, 1985). C'est pourquoi un système de capture biotine/streptavidine suivi d'une hybridation en solution, dont le principe est schématisé à la figure 4 a été proposé afin de mieux contrôler les paramètres de l'hybridation (Tagle, 1993). L'ADN génomique de YAC purifié à partir d'un gel pulsé est digéré par une enzyme "4 bases cutter" et ligué à des adaptateurs. Les segments génomiques ligés sont amplifiés par PCR à l'aide d'une amorce biotinylée en 5' dont la séquence est complémentaire à l'un des brins de l'adaptateur. Les inserts de la banque d'ADNc sont amplifiés par PCR à l'aide d'amorces vecteurs et hybridés à haute stringence aux fragments génomiques

biotinylés, après blocage des séquences répétées. Les complexes biotinylés ADNc-YAC sont capturés à l'aide de billes paramagnétiques couvertes de streptavidine, et les ADNc non spécifiquement liés sont lavés. L'ADNc retenu est ensuite élué et amplifié par PCR. Les produits de PCR peuvent être clonés afin de constituer une sous-banque spécifique d'une région, ou être recyclés dans un nouveau tour de sélection. Un enrichissement de 2 à 3 ordres de grandeur par étape de sélection est mentionné dans la littérature (Snell et al., 1993)

3.3. Techniques d'amplification d'exons.

3.3.1. Rappel sur l'épissage de l'ARN.

Les méthodes d'amplification d'exons permettent l'isolement des séquences codantes à partir de l'ADN génomique. Elle ont permis l'isolement de séquences codantes du gène de la maladie de Huntington (The Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993). Rappelons que chez les eucaryotes, les séquences codantes des gènes (=exons) sont généralement interrompues par des séquences non codantes (= introns) (Padgett et al., 1986 ; Sharp, 1994). Les introns sont transcrits avant d'être éliminés par un processus d'excision-épissage faisant intervenir des particules ribonucléoprotéiques (snRNPs) et des protéines accessoires. Ce complexe multimérique, appelé splicéosome, s'associe avec l'ARN pré-messager (pré-ARNm) au niveau de séquences consensus présentes dans l'intron (Mount, 1982 ; Ohshima et al., 1987) :

- un site donneur en 5' (SD) qui s'étend des deux derniers nucléotides de l'exon jusqu'aux six premiers nucléotides de l'intron :

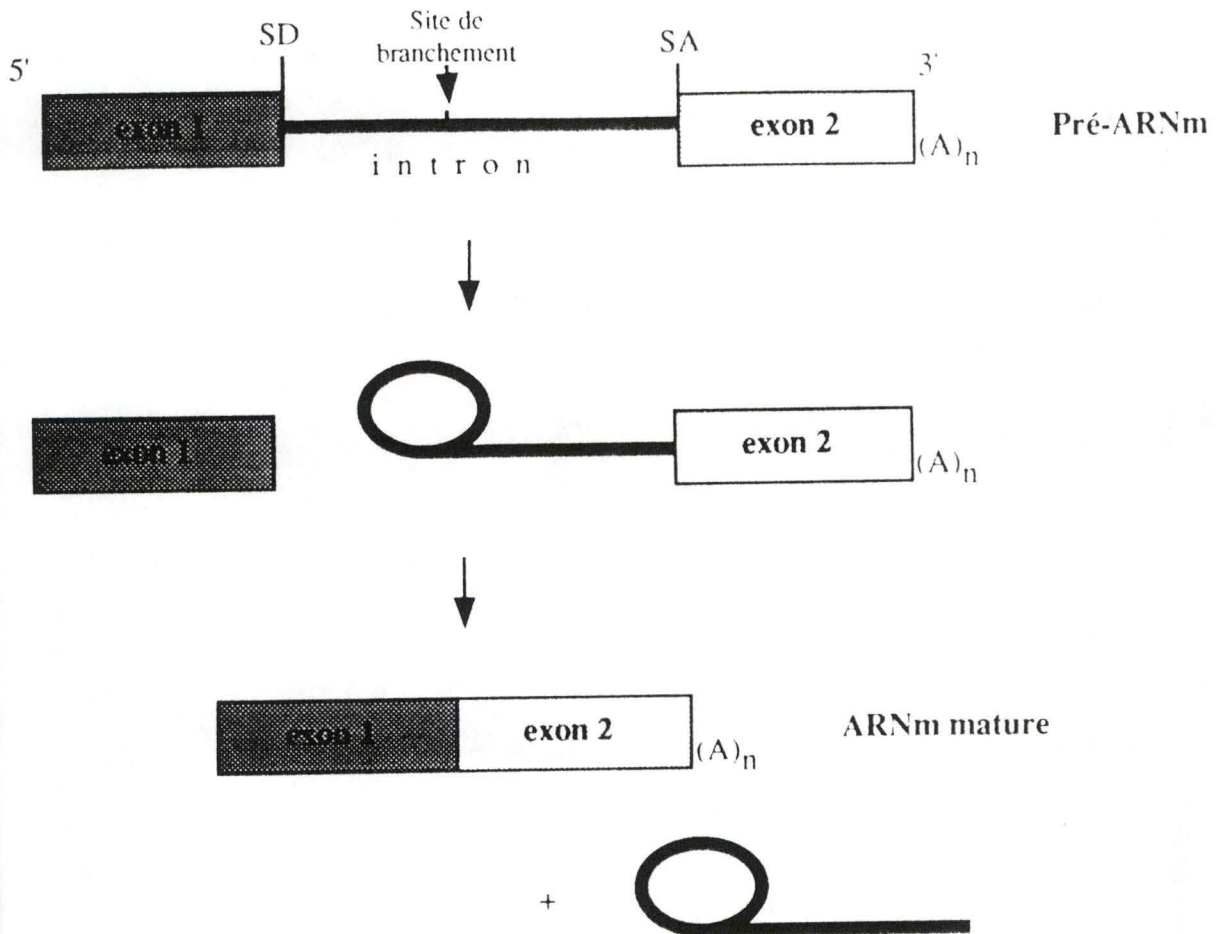


Figure 5 : Mécanisme d'excision-épissage des ARNm. Clivage au site d'épissage 5'(SD) et formation d'une liaison phosphodiester 2'- 5'entre le résidu G du site SD et le A invariant du site de branchement. Coupure au site d'épissage 3'(SA) et ligation des extrémités des exons.

A G / G U (A) A G A (/ = site de coupure)

- un site accepteur en 3' (SA) qui s'étend au moins à partir des 15 derniers nucléotides de l'intron jusqu'au premier nucléotides de l'exon :

(U / C)₁₁ N C A G / G

- un site de branchement situé dans l'intron, à environ 20 à 50 pb en amont du SA, faiblement conservé chez les eucaryotes supérieurs (seulement un A),

- une région riche en résidus pyrimidines ("polypyrimidine tract").

Le spliceosome assure l'appariement correct de la jonction 5' d'épissage à la jonction 3' pour donner un ARN messager mature, avec élimination de l'intron sous forme de lasso (figure 5).

Cependant les quatre séquences consensus ne sont pas suffisantes pour expliquer la grande spécificité de la réaction d'épissage. En effet, l'efficacité des sites donneurs et accepteurs n'est pas égale. Certains sites peuvent être ignorés, conduisant au phénomène dit d'exon skipping, alors que d'autres, normalement inefficaces, sont révélés dans certaines circonstances, et appelés sites cryptiques (épissage cryptique). De plus, l'efficacité d'épissage peut varier en conditions physiologiques, conduisant au phénomène d'épissage alternatif. Notons que des études ont montré que la longueur des exons de même que celle de la région aux résidus pyrimidines joue un rôle important dans l'épissage des ARNm à multiples introns (Zbigniew et al., 1991).

3.3.2. Principe de l'amplification d'exons.

L'exon trapping est basé sur le mécanisme d'excision-épissage. Un fragment d'ADN génomique (par ex. fragments de YACs ou de cosmides) est inséré dans un vecteur d'expression mammalien, au niveau d'un intron

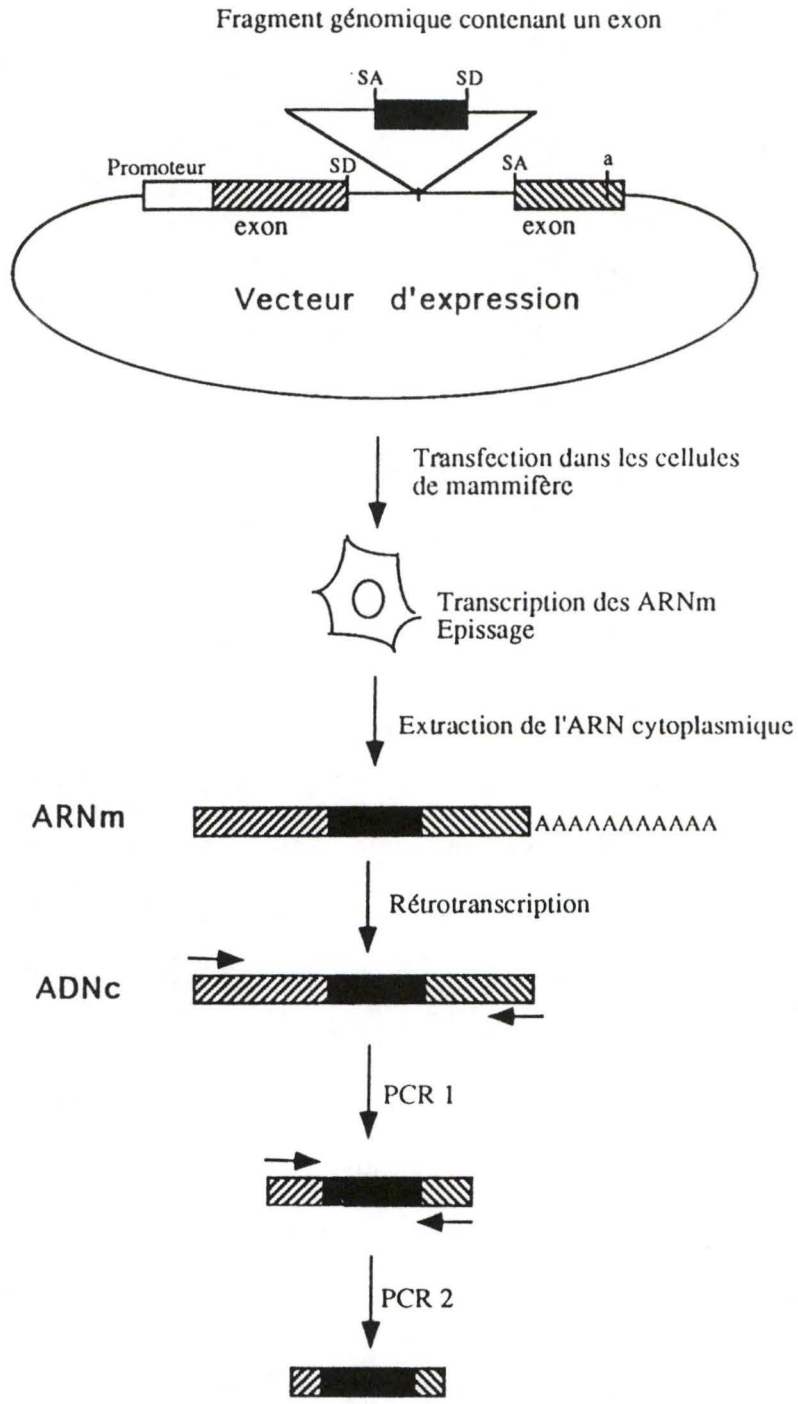


Figure 6 : Principe de l'exon trapping classique.
 SD=site donneur de splicing; SA=site accepteur de splicing;
 a=signal de polyadénylation.

appartenant à une unité de transcription d'un gène choisi, placé sous le contrôle d'un promoteur fort (figure 6) La construction ainsi obtenue est transfectée dans les cellules de mammifère où il est transcrit en pré-ARN .

La présence d'un exon dans la bonne orientation au sein du fragment inséré permet la maturation grâce au mécanisme d'excision-épissage, résultant en la formation d'un ARNm hybride composé des exons du fragment cloné, flanqués d'exons provenant du vecteur. Les messagers hybrides sont détectés en pratiquant une réaction de transcription inverse suivie d'une amplification par PCR (technique de RT-PCR), au moyen d'amorces spécifiques des exons du vecteur. Les produits de PCR sont ensuite clonés et séquencés. Cette technique a été développée initialement par Buckler et al. (1991).

La technique d'exon trapping 3', que nous avons surtout employée dans ce travail, est une variante de la technique originale (Krizman & Berget, 1993 ; 1994). La différence vient du fait que l'unité de transcription du vecteur d'expression manque d'exon 3' terminal (figure 7). La transcription de ce vecteur n'aboutit à un ARNm polyadénylé stable que si le fragment génomique inséré renferme dans la bonne orientation, un exon 3' caractérisé par un site accepteur (SA) à l'extrémité 5' et, d'un signal de polyadénylation (AATAAA ou ATTAAA) dans la région 3', nécessaire à l'addition de la queue poly(A). La technique est détaillée dans la section Matériels et Méthodes.

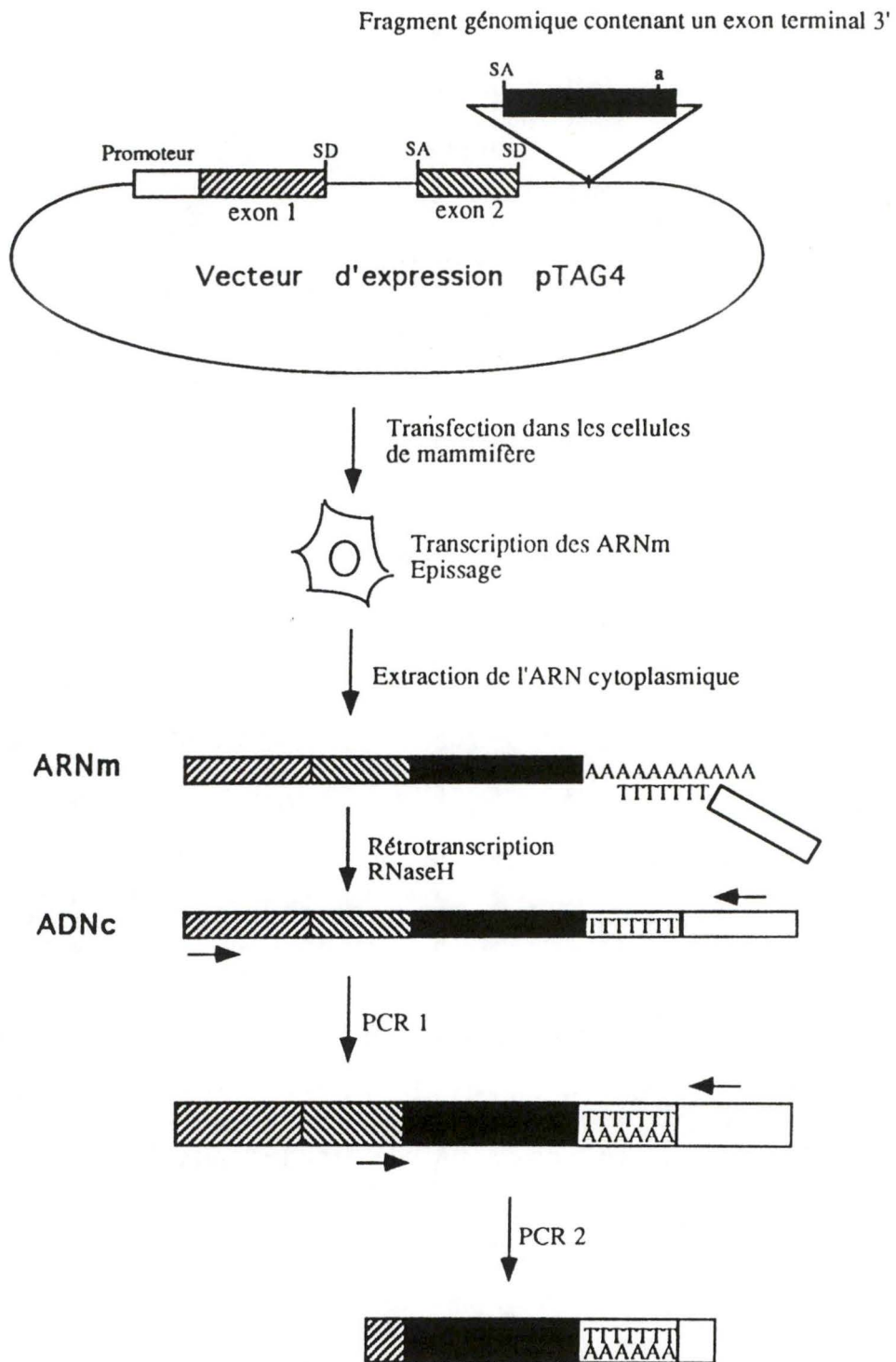


Figure 7 : Principe de l'exon trapping 3'
 SD=site donneur de splicing; SA=site accepteur de splicing;
 a=signal de polyadénylation.

4. Objectifs du travail.

Au cours de ce travail, nous avons utilisé les techniques rappelées ci-dessus pour tenter d'isoler puis de caractériser certaines des séquences codantes présentes dans le contig reeler. Alors que la technique d'hybridation en solution ne nous a pas procuré de résultat favorable, la méthode d'exon trapping 3' a permis d'isoler plusieurs exons, plus particulièrement 4 dont nous avons pu prouver qu'ils correspondent à des fragments de messages. Bien que nous n'ayons pas été à même d'identifier avec certitude, un fragment du gène reeler parmi les exons isolés, l'un des exons clonés s'est avéré correspondre à un fragment homologue du gène humain MSS1, positionné en 7q22 sur le chromosome 7 humain, mais qui n'avait jamais été cartographié chez la souris.

CHAPITRE 2

Matériel et Méthodes

1. Techniques standard.

Une bonne partie des techniques standard de biologie moléculaire utilisées au cours de notre travail ont été décrites dans les mémoires réalisés antérieurement au laboratoire. Elles sont adaptées de protocoles publiés, en particulier dans le "Red Book" (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., 1994), et fournies par les firmes qui commercialisent les kits et réactifs, raisons pour lesquelles nous n'avons pas trouvé utile de les détailler davantage. Ces techniques sont les suivantes: transformation de bactéries par électroporation de plasmides, préparation de plasmides par mini- et midipreps, restriction de l'ADN, purification des inserts, marquage d'ADN par "random

priming", Southern blot sur DNA génomique, autoradiographie, séquençage par Sequenase.

Nous détaillerons par contre les méthodes que nous avons plus spécifiquement employées au cours de ce travail, en particulier celles qui ont trait à l'ARN.

2. Techniques en rapport avec l'ARN.

2.1. Prélèvement de tissus.

Des précautions doivent être prises lors de l'isolement de l'ARN en raison de la présence très répandue dans les tissus et l'environnement de RNAses actives et résistantes. Les expériences utilisant l'ARN doivent donc être effectuées dans un environnement stérile et RNase-free. Des gants à usage unique sont portés constamment et changés fréquemment. Le plastique à usage unique est considéré RNase-free au sortir des emballages. Après leur lavage, la vaisselle et les instruments sont rincés avec une solution de 0,1N NaOH, 1mM EDTA, puis avec de l'eau RNase-free avant d'être autoclavés. Une autre possibilité est de cuire les instruments ou la vaisselle au four à 150-180°C pendant 3 heures. Lors des manipulations délicates comme la RT-PCR, des embouts de type ART sont utilisés.

Les souris sont anesthésiées à l'éther avant d'être sacrifiées par dislocation cervicale. La peau est largement désinfectée à l'alcool.

Toutes les dissections sont effectuées avec des instruments stériles et RNase-free. Les organes sont prélevés aussi rapidement que possible et immédiatement placés sur glace avant d'être pesés puis homogénéisés.

Tissus embryonnaires.

La datation des embryons est réalisée en accouplant les souris la nuit et en détectant le lendemain matin la présence d'un bouchon vaginal, signe de copulation. Les souris utilisées pour la production des embryons sont généralement de la souche NMRI, une variété non inbred très fertile. Pour l'obtention des embryons *reeler*, des animaux homozygotes des deux sexes sont simplement gardés dans les mêmes cages et les femelles sont sacrifiées lorsqu'elles sont manifestement gravides, de sorte que les stades embryonnaires ne sont précisés qu'à posteriori, par référence à l'atlas de Theiler (1972).

2.2. Extraction de l'ARN en une seule étape.

Nous avons utilisé la technique de Chomczynski (1989), basée sur la dénaturation par l'isothiocyanate de guanidium suivie d'une extraction par le phénol aqueux, à un pH relativement acide (4 à 5), ce qui sépare l'ARN (phase aqueuse) de l'ADN et des protéines (phase phénolique).

2.2.1. Réactifs.

Eau DEPC : traiter l'eau Millipore avec 0,1% de diéthylpyrocarbonate (DEPC) (Sigma) toute la nuit et autoclaver. A noter que le DEPC est inutilisable avec les solutions contenant de Tris qui le décompose rapidement en éthanol et dioxyde de carbone.

Solution dénaturante :

4 M guanidinium thiocyanate;

25 mM citrate de sodium, pH 7;

0,1 M β -mercaptoéthanol;

0,5% N-lauroylsarcosine (Sarkosyl);

Préparer une solution stock en dissolvant à 60-65 °C, 250 g de guanidinium thiocyanate (Sigma) dans une solution composée de 293 ml d'eau DEPC, 17,6 ml de citrate de sodium 0,75 M, pH 7 (Sigma) et, 26,4 ml de Sarkosyl 10% (Sigma). La solution stock peut se conserver pendant 3 mois à température ambiante. La solution dénaturante est préparée en ajoutant à cette solution stock 0,36 ml de β -mercaptoéthanol (Serva) pour 50 ml. Cette solution D peut être gardée 1 mois à température ambiante ou être congelée.

Phénol aqueux : phénol saturé par de H₂O DEPC, aliquoté par 50 ml et congelé.

Acétate de sodium 2M, pH 4 :

Additionner 16,42g d'acétate de sodium à 40ml d'eau DEPC et 35ml d'acide acétique glacial . Ajuster le pH à 4 avec l'acide acétique glacial, et ajuster le volume à 100ml avec de l'eau DEPC

Chloroforme/alcool isoamylique 49:1.

Isopropanol 100% .

2.2.2. Protocole (pour 100 mg de tissu).

Ajouter 100 ml de solution dénaturante à 100 mg de tissu et homogénéiser rapidement dans un Corex RNase-free de 15 ml, au moyen d'un Ultraturrax T18 (Van Der Heyder) à vitesse maximale, pendant 5 à 10 secondes.

Ajouter, successivement en mélangeant à chaque fois doucement par inversion:

- 0,1 ml d'acétate de sodium 2M, pH 4;
- 1 ml de phénol aqueux;
- 0,2 ml de chloroforme/alcool isoamylique;

Incuber sur glace pendant 15 minutes.

Centrifuger 20 minutes à 9000 rpm à 4 °C. Préléver délicatement la phase aqueuse supérieure en évitant le contact avec l'interface et transvaser dans un Corex RNase free de 15 ml .

Ajouter un volume d'isopropanol 100% et précipiter l'ARN en incubant l'échantillon à -20 °C pendant 30 minutes.

Centrifuger 10 minutes à 9000 rpm à 4 °C et éliminer prudemment le surnageant.

Dissoudre le culot d'ARN dans 0,3 ml de solution dénaturante et transvaser dans un Eppendorf RNase free de 1,5 ml.

Précipiter l'ARN avec 0,3 ml d'isopropanol 100% et laisser 30 minutes à -20 °C. Microfuger 10 minute à 9000 rpm à 4 °C et écarter le surnageant.

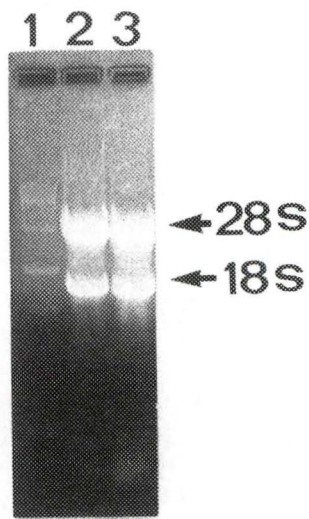


Figure 8 : Gel dénaturant agarose/formaldéhyde coloré au bromure d'éthidium. Les pistes 1 à 3 représentent: le marqueur de poids moléculaire (0,24-9,5 Kb RNA Ladder. LIFE TECHNOLOGIES); 10 μ g d'ARN total de cerveau embryonnaire; 10 μ g d'ARN total de cerveau adulte. 18S et 28S correspondent respectivement aux bandes de l'ARN ribosomique 18S et 28S.

Suspendre le culot d'ARN avec de l'éthanol 75%, vortexer et incuber 10 à 15 minutes à température ambiante afin de bien dissoudre les traces de guanidium.

Microfuger 5 minutes à 9000 rpm, jeter le surnageant et sécher 3 à 5 minutes à la Speed Vac (Savant).

Suspendre dans 100 µl d'eau DEPC, et stocker à -70 °C.

2.2.3. Estimation de la quantité.

L'estimation de la concentration de l'échantillon se fait par spectrométrie UV en mesurant l'absorbance à 260 nm, en considérant qu'une absorbance de 1 correspond à une concentration d'ARN de 40 µg/ml.

2.2.4. Contrôle de qualité.

Le contrôle de qualité de l'ARN total se fait en résolvant 5 à 10 µg de l'échantillon par électrophorèse en gel d'agarose dénaturant coloré par bromure d'éthidium. Le gel doit montrer deux bandes d'ARN ribosomiques 18 S et 28 S, avec un rapport d'intensité de 1:2 comme l'indique la figure 8.

2.3. Isolement d'ARN poly(A)+.

Pour l'isolement d'ARN polyadénylé, nous avons utilisé le kit polyATtract de Promega. Le système utilise des amorces oligo(dT) biotinylées en 5', capables de s'hybrider en solution avec la queue

poly(A)⁺ de la majorité des ARNm eucaryotes. Les hybrides sont capturés sur des particules paramagnétiques couvertes de streptavidine. Les particules sont piégées par un aimant et lavées à haute stringence. Les ARN poly(A)⁺ sont élués de la phase solide à faible force ionique.

2.3.1. Procédure.

Dans un tube stérile RNase-free, mélanger 1 à 5 mg d'ARN total dans un volume total de 2430 µl d'eau DEPC.

Incuber pendant 10 minutes dans un bain à 65 °C.

Ajouter 10 µl d'oligo (dT) biotinylée et 60 µl de SSC 20X. Mélanger délicatement et incuber à température ambiante jusqu'à refroidissement complet.

Suspendre les billes paramagnétiques couvertes de streptavidine (SA-PMPs) jusqu'à dispersion complète, puis les capturer en plaçant le tube dans le collecteur magnétique. Décanter le surnageant délicatement; ne pas centrifuger les billes.

Laver 3 fois les SA-PMPs dans du SSC 0,5X (1,5 ml par lavage) en capturant les SA-PMPs à l'aide du collecteur magnétique et en décantant le surnageant.

Suspendre les SA-PMPs lavées dans 0,5 ml de SSC 0,5X .

Ajouter le volume entier de la réaction d'hybridation ARN-oligo(dT) au tube contenant les SA-PMPs lavées.

Incuber à température ambiante pendant 10 minutes.

Capturer les SA-PMPs à l'aide du collecteur magnétique et décanter le surnageant sans toucher le culot de SA-PMPs. Il est sage de conserver les éluats jusqu'à ce que l'on soit certain que la capture et l'éluion des ARN poly(A)⁺ ont bien eu lieu.



Figure 9 : Gel dénaturant agarose/formaldéhyde coloré au bromure d'éthidium. Les pistes 1 et 2 représentent respectivement: 2 μ g d'ARN poly(A)⁺ de cerveau embryonnaire; 10 μ g d'ARN total de cerveau embryonnaire.

Laver les SA-PMPs 4X dans du SSC 0,1X (1,5 ml par lavage).

Pour éluer les ARNm, suspendre le culot de billes dans 1 ml d'eau DEPC.

Capturer les billes et décanter la phase aqueuse contenant les ARNm dans un tube RNase-free.

2.3.2. Détermination de la concentration et pureté des ARNm.

La concentration des ARNm élués est déterminée par spectrophotométrie. Les ARNm purs auront un rapport des absorbances A260/A280 supérieur ou égal à 2. Pour estimer la concentration, on considère qu'une solution de 40 µg/ml d'ARNm a une absorbance de 1 à 260 nm .

La qualité de l'ARNm isolé est contrôlée par électrophorèse dénaturante en gel d'agarose : l'ARNm doit apparaître comme un smear s'étendant depuis approximativement 8 kb jusqu'à approximativement 0,5 kb (figure 9)

2.4. Analyse d'ARN par hybridation en Northern blot.

L'ARN est fractionné en gel d'agarose dénaturant avant d'être transféré sur filtre. Le filtre est hybridé avec une sonde marquée d'ADN dénaturé ou d'ARN. En raison de leur structure simple brin, la plupart des ARNs forment des structures secondaires par appariement intramoléculaire de bases, et il est nécessaire de les séparer sur un gel

dénaturant. La dénaturation est réalisée par le formaldéhyde ou un mélange de glyoxal et de DMSO. Nous avons utilisé des gels d'agarose/formaldéhyde.

2.4.1. Electrophorèse en gel d'agarose/formaldéhyde.

Réactifs :

Tampon MOPS 10X:

0,4 M MOPS, pH 7,0 (Sigma) ;

0,1 M acétate de sodium (Sigma) ;

0,01 M EDTA ;

préparé avec de l'eau DEPC, autoclavé et, stocké à l'abri de la lumière.

Bleu de bromophénol:

1 mM EDTA, pH 8,0 ;

0,25% (w/v) bleu de bromophénol ;

0,25% (w/v) xylène cyanol ;

50% (w/v) glycerol ;

Formamide désionisée.

Formaldéhyde 12,3M(37%)

Protocole :

Préparation du gel (1% d'agarose et 0,66 M de formaldéhyde : Ausubel et al., 1989)

Dissoudre 0,3 g d'agarose dans 25,4 ml de H₂O DEPC. Chauffer jusqu'à dissolution complète de l'agarose avant de refroidir dans un bain à 60°C.

Ajouter sous la hotte 3 ml MOPS 10X ; 1,61 ml de formaldéhyde (37%) 12,3 M ; 1,5 µl de bromure d'éthidium 10 mg/ml.

Couler le gel et, lorsque la gélification est terminée, le couvrir avec le tampon MOPS 1X

Préparation et migration de l'échantillon.

Porter le volume final de l'échantillon d'ARN (10 µg d'ARN total ou 2 µg d'ARNm poly(A)⁺) à 6 µl.

Ajouter:

12,5 µl de formamide

2,5 µl de MOPS 10X

4 µl de formaldéhyde

Incuber 15 minute à 55°C.

Mettre sur glace pendant environ 3 minutes et, ajouter 2,5 µl de bleu de bromophénol.

Charger et faire migrer à 5V/cm jusqu'à ce que le bleu migre sur les 2/3 du gel.

Examiner et photographier le gel au transilluminateur à UV

2.4.2. Transfert de l'ARN sur fitre.

Le transfert de l'ARN se fait dans une solution de SSC 20X (3M NaCl; 0,3 M Na-citrate; pH 7 autoclavé).

Procédure

Rincer le gel dans d'eau DEPC pendant un quart d'heure.

Equilibrer au moins 45 minutes le gel avec la solution de transfert (SSC 20X).

Confectionner un support de papier Whatman saturé en SSC 20X et placer dans la boîte de transfert contenant la solution de SSC 20X.

Couper un coin du gel pour le repérage des puits, et le placer sur le pont de telle façon que l'ouverture des puits fasse face au pont.

Equilibrer 3 à 5 minutes une membrane (Hybond-N, Amersham) aux dimensions du gel dans SSC 20X.

Placer la membrane sur le gel, puis 3 papiers Whatman saturés en SSC 20X.

Poser 7 autres papiers secs.

Mettre un paquet complet de Kleenex coupés aux dimensions du gel,
Mettre un couvercle et un poids de 500 g sur le montage pour faciliter le contact du gel avec la membrane.

Transférer la nuit.

Le lendemain, rincer la membrane dans la solution de SSC 2X.

Cuire la membrane à l'étuve à 80°C pendant 10 minutes.

2.4.3. Hybridation.

Le principe d'hybridation est le même que celui d'une hybridation southern : la membrane est préhybridée dans une solution de blocage ; puis une sonde marquée ADN (dénaturée) ou d'ARN y est ajouté.

Procédure

Preparer la solution de préhybrition :

50% Formamide désionisé ;

5X SSC ;

5X Solution de Denhardt :

2%(w/v) BSA (bovine serum albumin) ;

2%(w/v) Ficoll ;

2%(w/v) PVP (polyvinylpyrrolidone)

1% SDS (dodecyl sulfate de sodium).

100 µg/ml ADN de sperme de saumon dénaturé.

Préhybrider dans un bain à 42°C avec un volume de solution de préhybridation (25 ml pour 50 cm² de membrane).

Préparer la sonde marquée (Multiprime DNA labelling system, LIFE TECHNOLOGIE). Une quantité de 25 ng d'ADN est suffisante.

Dénaturer la sonde d'ADN marquée pendant 10 minutes. La mettre sur glace et l'ajouter au mélange de préhybridation.

Laisser hybrider toute la nuit.

2.4.4. Lavage des membranes.

Cette étape permet d'éliminer l'excès de sonde ainsi que celle appariée de façon non spécifique. Les lavages sont réalisés dans des milieux de force ionique de plus en plus faible c'est-à-dire de stringence de plus en plus forte. Le degré de stringence appliqué au cours des lavages est déterminé par l'expérimentateur.

Protocole

Préparer les milieux de lavage suivants :

SSC 2X, SDS 0,1%;

SSC 0,2X, SDS 0,1%;

SSC 0,1X, SDS 0,1%.

Aspirer la solution d'hybridation couvrant la membrane.

Recouvrir la membrane de SSC 2X, SDS 0,1% et incuber sous agitation 15 minutes à température ambiante. Répéter une deuxième fois cette opération. Il s'agit d'un lavage à faible stringence qui permet d'enlever le background.

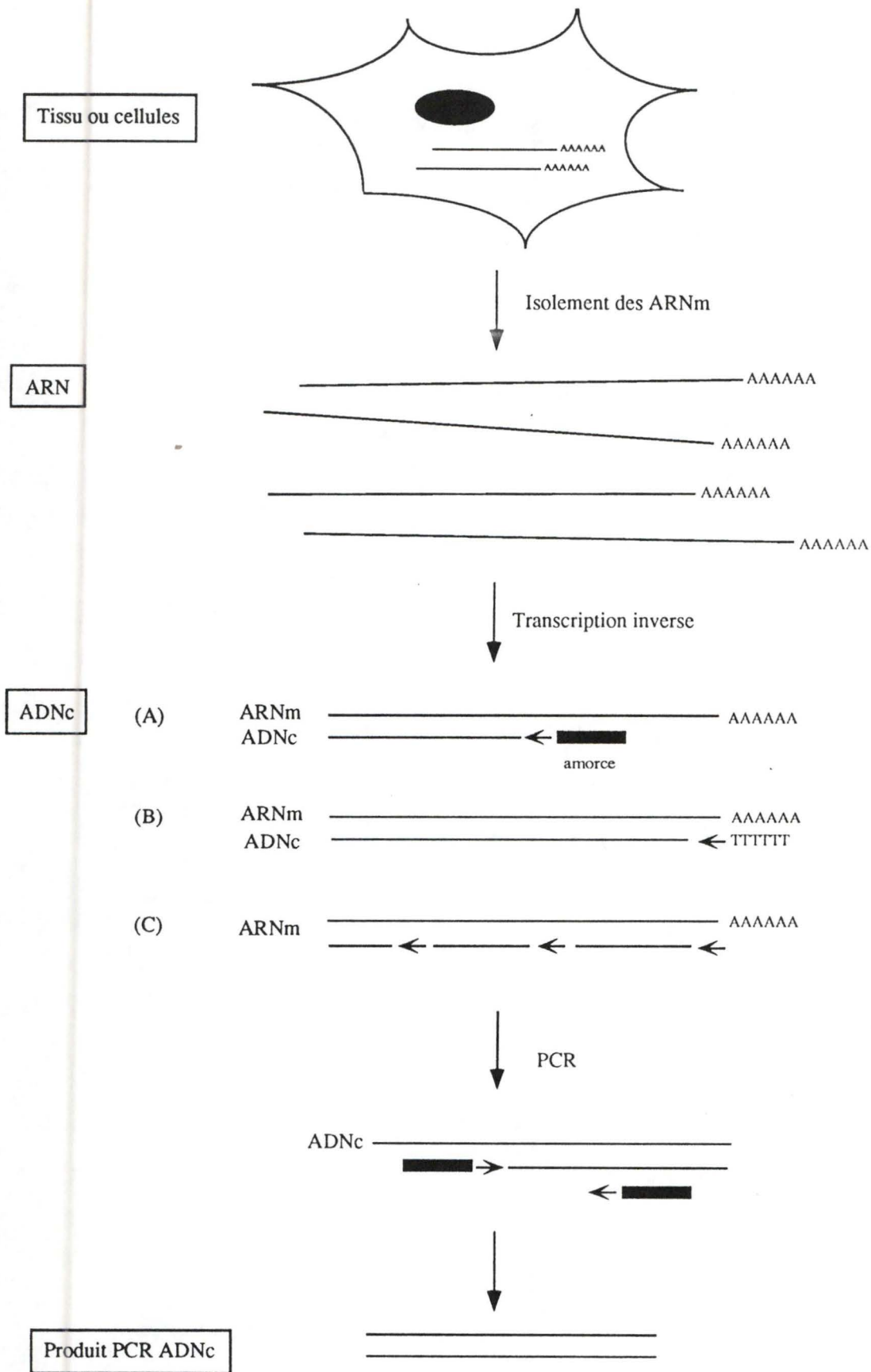


Figure 10 : Principe de la RT-PCR. L'ARN est isolé à partir de cellules ou de tissus, retrotranscrit avec une amorce antisens spécifique (A), une amorce oligodT (B) ou un mélange aléatoire d'hexanucléotides (C). A partir de l'ADNc simple brin, une amplification PCR est réalisée à l'aide d'une paire d'amorces spécifiques.

Recouvrir la membrane de SSC 0,2X, SDS 0,1%. Incuber 15 minutes sous agitation à température ambiante. Répéter le même lavage, mais en incubant dans un bain sous agitation à 42°C pendant 15 minutes. Le niveau de stringence est moyen.

Le lavage à forte stringence peut avoir lieu en réalisant une incubation de 15 minutes sous agitation en présence d'une solution de SSC 0,1X, SDS 0,1% dans un bain à 68°C.

Éliminer le dernier milieu de lavage. Rincer la membrane avec une solution de SSC 2X avant de la sécher.

Autoradiographie sur film (XOMAT-AR) à -70°C.

2.5. Analyse de l'ARN par RT-PCR.

La procédure de RT-PCR appliquée au laboratoire est adaptée de Kawasaki (1990). On utilise de l'ARN total, isolé comme décrit au § 2.1 et 2.2 pour l'intégrité des messagers par analyse électrophorétique en gel d'agarose dénaturant. Un traitement par la DNase I élimine le DNA résiduel. L'ADNc est synthétisé par la transcriptase inverse Superscript II (LIFE TECHNOLOGIES) en amorçant par des hexanucléotides aléatoires. L'amplification PCR est réalisée à l'aide des amorces définissant le STS (Sequence Tagged Site ; Olson, 1990) choisi. Chaque échantillon est traité en double selon le mode "avec et sans transcriptase inverse" afin de mieux contrôler l'amplification due à l'ADN résiduel (figure 10).

2.5.1. Traitement à la DNase.

Ajouter les réactifs suivants dans un tube de 0,5 µl :

1 µg d'ARN total ;

1 µl de 10X DNase I Reaction Buffer ;

1 µl(U=unité/µl) de DNase I, Amp Grade (LIFE TECHNOLOGIES).

Compléter le volume à 10 ul avec de l'eau DEPC.

Incuber 15 minutes à température ambiante.

Inactiver la DNase I par l'ajout de 1 µl EDTA 20 mM et chauffer 10 minutes à 65°C.

2.5.2. Synthèse du premier brin d'ADNc.

Ajouter 1 µl (100 pmol) d'hexanucléotides (Boehringer), collecter l'échantillon au fond du tube par une brève centrifugation. Chauffer 10 minutes à 70°C avant de mettre sur glace.

Ajouter les réactifs suivant:

4 µl de 5XFirst Strand Buffer;

2 µl de DTT 0,1 M;

1 µl de dNTP mix (10 mM each).

Mélanger et centrifuger pour collecter l'échantillon au fond du tube.

Placer 2 minutes à 37°C.

Ajouter 1 µl (200 U/µl) de Superscript II TM (LIFE TECHNOLOGIES).

Incuber 30 minutes à 37°C puis mettre sur glace.

2.5.3. PCR pour le STS concerné.

La PCR est ensuite réalisée avec les amorces du STS que l'on désire analyser, selon le protocole suivant :

Prelever 2 μl de réaction de synthèse du premier brin et les mettre dans un tube stérile de 0,5 μl .

Ajouter 18 μl du mélange suivant :

15,1 μl de H₂O stérile ;

2 μl de tampon-PCR 10X ;

0,4 μl de mélange de dNTP 10 mM de chaque ;

0,2 μl (100 pmol/ μl) d'amorce 3' ;

0,2 μl (100 pmol/ μl) d'amorce 5' ;

0,1 μl (2U/ μl) de DynaZyme(DNA Taq polymérase contenant 1,5 mM de MgCl₂ dans le tampon de stock ; FINNZYMES OY).

Recouvrir chaque tube, de 50 μl d'huile PCR.

Placer les tubes dans le cycleur thermique (MJ Research, Inc) et exécuter le programme suivant :

3 minutes à 94°C de dénaturation

35 fois le cycle:

1 minute à 94°C de dénaturation.

1 minute à une température au moins 5°C en dessous du T_m de la paire d'amorces d'intérêt : annealing.

1 minute à 72°C d'extension.

10 minutes à 72°C d'extension.

Analyser 20 μl de réaction en électrophorèse en gel d'agarose (dont la concentration dépend de la taille attendue du produit amplifié) coloré au bromure d'éthidium.

Valider les produits amplifiés par Southern blot en les transférant sur filtre (Hybond N+, AMERSHAM) et en hybridant avec la sonde marquée (RadPrime DNA Labeling, LIFE TECHNOLOGIES) du fragment d'intérêt.

3. Purification d'ADN de YAC.

3.1 Préparation de l'ADN de levure de haut poids moléculaire.

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

Procédure

Inoculer une colonie isolée dans 100 ml de milieu déficient en uracile et tryptophane. Incuber la culture pendant 2 à 3 jours à 3°C, avec agitation (2 ml de culture permettent la fabrication d'un bloc d'agarose qui contiendra environ 2 µg d'ADN).

Centrifuger la culture à 3000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante, suspendre le culot dans 10 ml de Tris-HCl pH 7,5/ EDTA 50 mM pH 7,5.

Centrifuger à 3000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante et suspendre le culot dans 10 ml de SCE (sorbitol 1 M / citrate de sodium 0,1 M pH 5,8 / EDTA 10 mM pH 7,5).

Centrifuger 10 minutes à 3000 rpm à 20 °C, et suspendre le culot dans le volume adéquat de SCE (40 µl par bloc). Ajouter un volume égal d'agarose Seaplaque GTG (FMC) 1,5 % préparé dans du SCE et contenant 8 mg/ml de Novozyme (le tout équilibré à 50 °C). Mélanger et déposer rapidement 80 µl dans les moules placés sur la glace. Laisser 15 à 30 minutes sur la glace.

Transférer les blocs dans une solution de SCE contenant 10 mM de DTT et incuber 2 heures à 37 °C.

6. Transférer ensuite les blocs dans une solution de lyse contenant 1 % lithium dodecyl sulphate, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8, et incuber 1 heure à 37 °C.

Remplacer par la même solution, et incuber une nuit à 37 °C.

Rincer les blocs 2 fois dans du TE à 50 °C, 2 fois dans du TE à température ambiante pour analyse en gel pulsé.

Conserver dans 10 mM Tris, 50 mM EDTA, à 4 °C.

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

3.2. Electrophorèse en champ pulsé d'ADN de YAC.

Les blocs d'agarose contenant les YACs d'intérêt sont soumis à une électrophorèse en champ pulsé (PFGE) pour séparer le YAC des chromosomes endogènes.

Conditions pour la séparation du YAC-G3 :

- gel d'agarose Low Melting (Seaplaque 1%) et tampon TBE 0,5 X.
- durée des pulses : 30 secondes pendant 14 heures, suivi de 60 secondes pendant 12 heures
- durée de l'électrophorèse : 26 heures, voltage : 200 V et ampérage : 130 mA.

3.3. Extraction et purification d'ADN de YAC après le PFGE.

Après coloration du gel, exciser la bande d'intérêt sous UV, le plus rapidement possible pour minimiser les dégats causés à l'ADN.

Equilibrer le fragment d'agarose contenant le YAC dans EDTA 5 mM et NaCl 100 mM à température ambiante et sous agitation pendant 30 minutes.

Renouveler la solution et laisser équilibrer 30 minutes supplémentaires.

Enlever la solution d'équilibration et fondre la bande d'agarose à 68°C pendant 15 minutes.

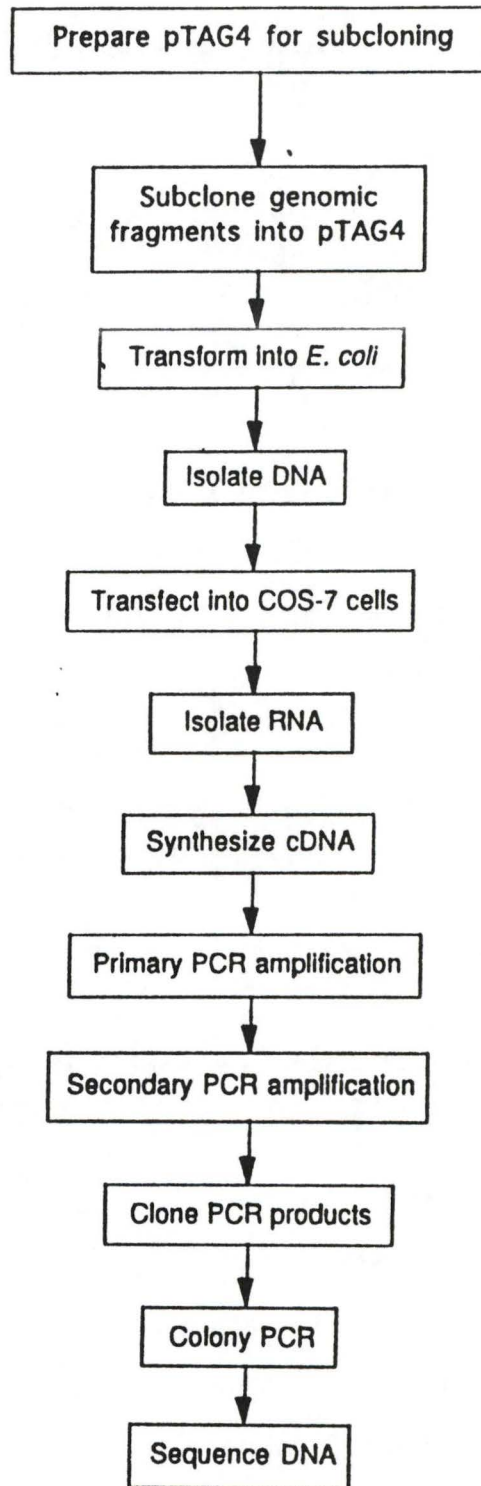


Figure 11 : Schéma général de la procédure de l'exon trapping

Laisser refroidir à 37 °C pendant 5-10 minutes (pour éviter de dénaturer l'agarase).

Additionner la β -agarase (Calbiochem ou New England Biolabs) à raison de 50 U/ml d'agarose fondu.

Incuber 3-4 heures à 37 °C.

Extraire au phénol/chloroforme. Si le surnageant est laiteux, rajouter un volume de CIAA, centrifuger et récupérer la phase aqueuse.

Ajouter 1/10 de volume de NaCl 3 M et 2 volumes d'éthanol absolu. Laisser à -20 °C pendant 12 heures ou à -70 °C pendant 60 minutes.

Centrifuger à 10 000 rpm pendant 10 minutes, décanter le surnageant et laver le culot à l' éthanol 70 %.

Sécher le culot à la SpeedVac et resuspendre dans 20-50 μ l de TE. Stocker à -20°C

4. Amplification d'exons 3' à partir d'ADN de YAC.

La procédure générale du système d'exon trapping dont le principe est schématisé à la figure 11, est tiré du manuel d'utilisation accompagnant le kit Exon Trapping System (LIFE TECHNOLOGIES).

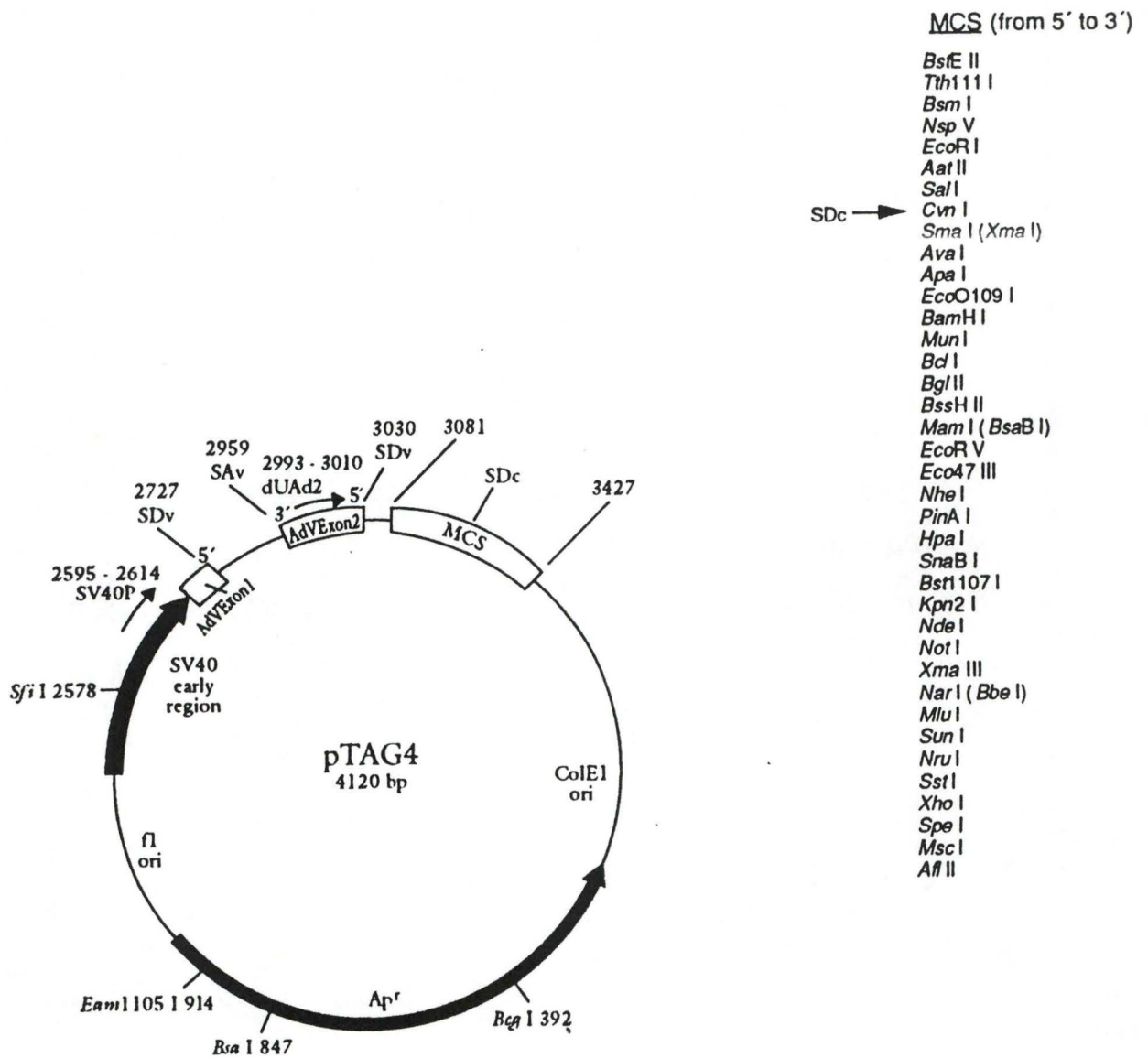


Figure 12 : Carte de pTAG4. Introns, exons et site multiple de clonage (MCS) sont indiqués sur la partie supérieure de la carte circulaire. Le panneau de droite représente les enzymes qui restreignent à l'intérieur du MCS. Le site criptique donneur (SDc) est indiqué également dans le MCS. P=promoteur précoce de SV40, SD_v=site donneur de splicing vecteur, et SA_v= site accepteur de splicing vecteur.

4.1. Vecteur pTAG4.

Le vecteur pTAG4, développé par D. Krizman (Krizman and Berget, 1992) et commercialisé en kit (LIFE TECHNOLOGIES), est représenté à la figure 12. Il contient une origine de réplication et un marqueur de sélection Amp^r (gène de résistance à l'ampicilline), des séquences de SV40 responsables de la réplication et de la transcription dans les cellules COS-7, des sites d'épissage des exons 1 et 2 de l'adénovirus et un site multiple de clonage situé dans l'intron flanquant l'exon 2 de l'adénovirus. Il s'agit d'un vecteur d'épissage muni d'une unité de transcription partielle (absence d'exon 3'). Ainsi dans les cellules COS-7, sa transcription ne produit un messenger mature que si le fragment incorporé au site de clonage contient un exon 3' terminal dans la bonne orientation c'est-à-dire un site d'épissage accepteur en position 5' et la séquence signal de polyadénylation en 3'. A noter que la stabilité d'un ARNm nécessite après le phénomène d'épissage non seulement l'addition de la coiffe en 5' mais également de la queue poly(A), dépendante de la présence du signal de polyadénylation.

4.2. Ligation d'ADN de YAC à pTAG4.

L'ADN de YAC est digéré par 20 U de *Bam*HI (5'-G/GATC C 3') et 20 U de *Bgl*III ((5'-A/GATC T-3') par mg d'ADN pendant 4 heures à 37°C. 100 à 200 ng de cette digestion sont ligués à 100 ng de pTAG4 préalablement digéré par *Bam*HI et déphosphorylé selon les recommandation de la firme (LIFE TECHNOLOGIES).

4.3. Transformation de *E. coli*. DH5 α .

Le produit de la réaction de ligation est utilisé pour transformer *E. coli* DH5 α par électroporation (2 000 volts ; R : 200 Ω ; C : 25 mF) dans une cuvette glacée (chambre 0,2 cm). Un ml de milieu SOC (2 % bactotryptone ; 0,5 % bacto yeast extract ; 10 mM NaCl ; 2,5 mM KCl ; 10 mM MgCl₂ ; 10 mM MgSO₄ ; 20 mM glucose) glacé est ajouté aux bactéries immédiatement après électroporation. Après 1 heure d'incubation à 37°C, un aliquot de la transformation (50 μ l) est étalé sur boîte pour tester l'efficacité de clonage tandis que le reste de la transformation est inoculé dans 10 ml de milieu de culture LB avec ampicilline.

Le lendemain, l'ADN plasmidique de la culture liquide est isolé par lyse alcaline si l'efficacité de la ligation de pTAG4 + insert est au moins dix fois supérieure à celle du plasmide reliqué sans insert.

4.4. Transfection des cellules COS-7.

Si le critère d'efficacité de clonage est satisfait, 5 à 10 μ g de la préparation d'ADN plasmidique sont utilisés pour transformer des cellules COS-7, par électroporation.

Protocole

Propager les cellules COS-7 (American Type Culture Collection) dans du milieu DMEM (Dubelcco's modified Eagle's medium, LIFE

TECHNOLOGIES) avec 10 % de FCS (sérum de veau foetal, LIFE TECHNOLOGIES) et de la gentamycine (50 mg/ml, LIFE TECHNOLOGIES).

Eliminer le milieu, le remplacé par une solution 0,25 % trypsine (LIFE TECHNOLOGIES) jusqu'à ce que les cellules se détachent (au besoin, les cellules peuvent être dissociées mécaniquement à l'aide d'une pipette stérile).

Ajouter du milieu frais distribuer la suspension de cellules dans de nouvelles bouteilles.

Trypsiniser les cellules et les collecter par centrifugation avant de les laver dans du milieu DMEM

Après comptage des cellules, centrifuger à nouveau et resuspendre dans du milieu DMEM à une concentration d'environ 5×10^6 cellules/ml.

Combiner 1 ml de la suspension cellulaire à de l'ADN (5 à 10 μg) dans une cuvette d'électroporation glacée (chambre 0,4 cm, Bio-Rad)

Exécuter deux chocs électriques de 350 V à l'aide d'un appareil Bio-Rad Gene Pulser (C = 25 mFD ; R = 200 Ω) et placées sur glace pendant 10 minutes.

Transvaser les cellules dans de petites bouteilles contenant 10 ml de milieu DMEN+FCS à 37°C.

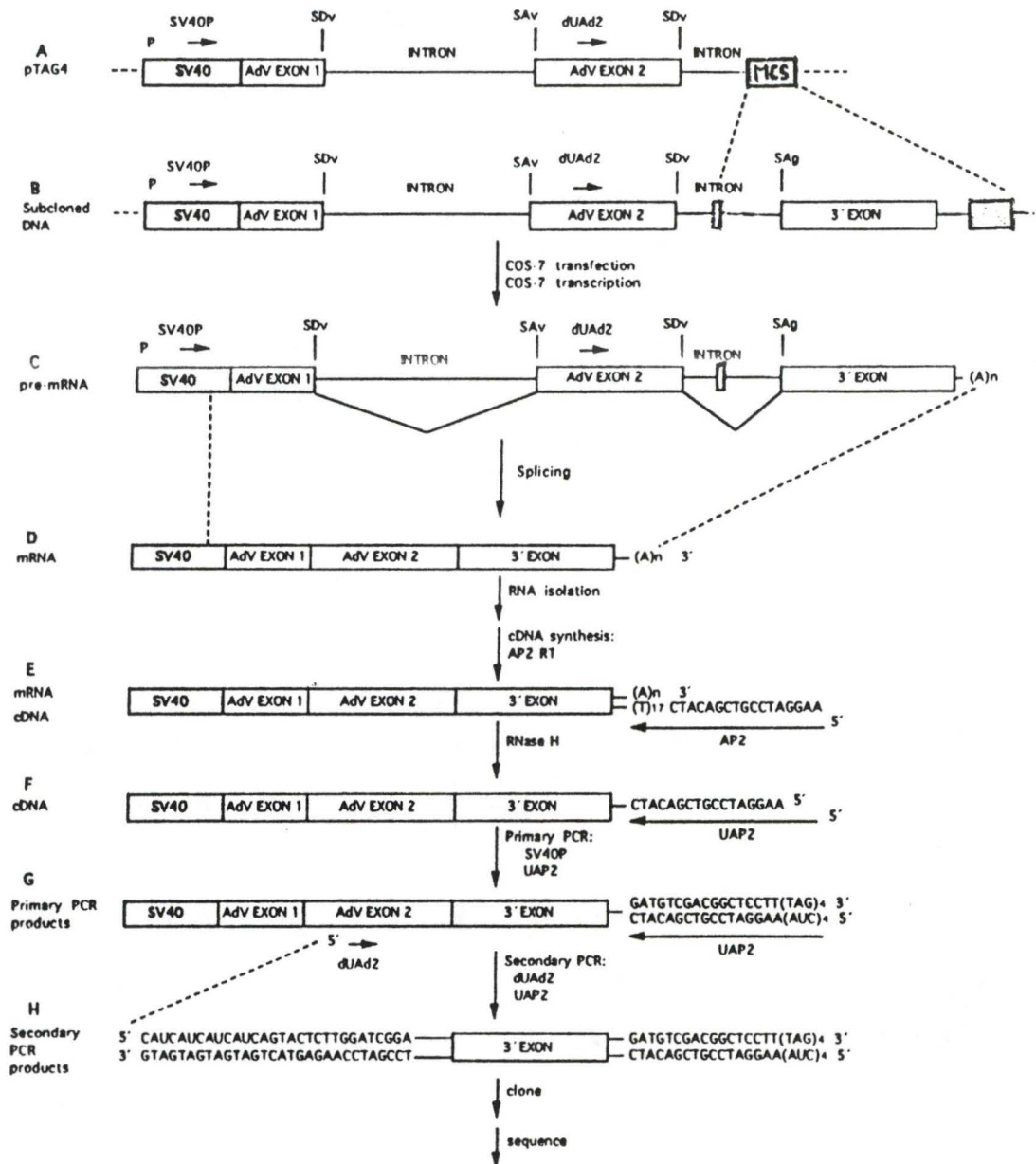


Figure 13 : Schéma du principe de la capture des exons par RT-PCR. Le vecteur pTAG4 (A) contient une origine de réplication et le promoteur de SV40, deux exons de l'adénovirus (AdV) et un site multiple de clonage(MCS). L'ADN génomique contenant un exon 3' dans la bonne orientation est sous-cloné dans le MCS (B), la construction obtenue est transfectée dans les cellules COS-7 où le pré-ARNm (C) est produit. Le mécanisme d'excision / épissage génère l'ARNm (D) qui est utilisé pour la synthèse de l'ADNc (E) à l'aide de l'amorçage de l'oligodT/adapteur (AP2). L'ARN est digéré par la RNase H (F), et une première PCR (G) est réalisée avec les amorces SV40P, et UAP2. La deuxième PCR(H), au lieu de SV40P utilise une amorce 5'(dUAd2) plus proche de l'exon capturé. Les extrémités des produits de 2nde PCR contiennent des résidus uracile permettant le clonage à l'UDG (voir § 4.2.4 de M&M). P=promoteur précoce de SV40, SDv=Site de splicing donneur (vecteur), SAv=site de splicing accepteur (vecteur), et SAg=site de splicing accepteur (génomique). Les flèches horizontales indiquent les sites d'amorçage des oligonucléotides.

4.5. Procédure d'amplification d'exons par RT-PCR.

La procédure d'amplification d'exons par RT-PCR est schématisée à la figure 13. L'ARN total de cellules COS transfectées est isolé, puis rétrotranscrits à l'aide d'une amorce oligod(T)/adapteur. L'ADNc simple brin ainsi obtenu, après un traitement à la RNase H sert de template à une première PCR. Une deuxième PCR est nécessaire avant le clonage des produits amplifiés et leur séquençage. A noter que les deux étapes PCR sont adaptées à la "nested PCR" et que des amorces utilisées au cours de la 2^{ème} PCR contiennent des résidus uraciles.

4.5.1. Extraction d'ARN de cellules COS.

Décanner le milieu de culture des cellules COS.

Ajouter 2 ml de PBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline) à chaque boîte.

Répéter deux fois de le lavage par PBS.

Trypsinizer les cellules contenues dans les puits de 3,5 cm en ajoutant 1 ml de trypsine-EDTA (0,25% trypsine, 1 mM EDTA). Attendre 5 minutes à température ambiante avant de secouer la boîte pour détacher les cellules. Arrêter la digestion en ajoutant 1 ml de milieu complet par boîte

Transférer les cellules dans un tube stérile et mettre sur glace.

Centrifuger à 4°C pendant 8 minutes à 300 X g.

Placer les tubes sur glace, laisser décanter et retirer le surnageant.

Resuspendre les cellules dans 40 μ l du tampon TKM (10 mM Tris-base, 10 mM KCl, 1 mM $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, pH 7,5) et placer sur glace pendant 5 minutes.

Ajouter 2 ml de Triton X-100 10%, mélanger doucement et, mettre sur glace pendant 5 minutes.

Centrifuger à 4°C pendant 5 minutes à 450 X g.

Transvaser le surnageant dans un nouveau tube sur glace, ajouter 3 μ l de SDS 5%, 40 μ l de tampon Tris/phénol. Mélanger et centrifuger pendant 5 minutes à 4°C.

Transvaser la phase aqueuse dans un nouveau tube contenant 40 μ l de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25 : 24 : 1), bien mélanger pendant 3 minutes et centrifuger 3 minutes à température ambiante.

Transvaser la phase aqueuse dans un nouveau tube sur glace, ajouter 2 μ l de NaCl 5 M, 750 μ l d'éthanol absolu, mélanger au vortex

Placer 10 minutes sur place.

Centrifuger à 4°C pendant 15 minutes à 1400 X g.

Éliminer le surnageant et ajouter 500 μ l d'éthanol 70% pour laver le culot.

Sécher le culot et le resuspendre dans 50 μ l d'eau DEPC.

4.5.2. Synthèse du premier brin d'ADNc.

La synthèse du premier d'ADNc est catalysée par la transcriptase inverse Superscript II RNase H⁻. Cette enzyme a été modifiée pour éliminer l'activité RNase H (toujours présente dans les transcriptases inverses) responsable de la dégradation de l'ARNm lors de la synthèse du premier brin. L'amorce utilisée, caractéristique de l'exon trapping 3', est composée de deux régions : une région 3' de 17 oligo(dT) qui s'hybride

avec la queue poly(A) des ARNm et une région 5' adaptateur de 17 bases.

La séquence de cette amorce(AP2=Adapteur primer) est :

AAG GAT CCG TCG ACA TC(T)₁₇

Procédure

Ajouter dans un tube eppendorf les réactifs suivants :

2 µl de primer adaptateur AP2 (10 uM) ;

1-3 µg d'ARN total extrait de cellules COS ;

ajouter d'eau DEPC jusqu'à 12 µl.

Incuber 5 minutes à 70°C, mettre sur glace, collecter l'échantillon par une brève centrifugation et ajouter les réactifs suivants :

4 µl de first strand buffer ;

2 µl de DTT 0,1 M ;

1 µl du mélange de dNTP mix 10 mM.

Mélanger et collecter l'échantillon par une brève centrifugation.

Incuber 2 minutes à 42°C.

Ajouter 1 µl (200 U/µl) de Superscript, mélanger doucement et incuber 30 minutes à 42°C.

Incuber 5 minutes à 55°C.

Ajouter 1 µl de RNase H, mélanger doucement et, incuber 10 minutes à 55°C.

Collecter le mélange réactionnel de la transcription inverse par une brève centrifugation et, le placer sur glace.

4.5.3. Première PCR.

les séquences des amorces utilisées sont:

AGC TAT TCC AGA AGT ACT GA (Oligonucleotide SV40P)

CUA CUA CUA CUA AAG GAT CCG TCG ACA TC (Universal Amplification Primer=UAP2)

Elles s'hybrident respectivement avec une région du promoteur SV40 et, avec la région "adapteur" de l'amorce/adapteur (AP2).

Procédure

Ajouter dans un tube de 0,5 µl les réactifs suivants :

- 1 µl de mélange réactionnel de la transcription inverse ;
- 5 µl de tampon-PCR 10X ;
- 1 µl de mélange de dNTP 10 mM de chaque
- 2,5 µl oligonucléotides SV40P (10 µM) ;
- 2,5 µl UAP2 (universal amplification primer; 10µM) ;
- 37,5 µl eau stérile ;
- 0.5 µl (=2.5 U) Taq DNA polymerase.

Agiter et couvrir avec 50 µl d'huile PCR

Placer le tube dans le cycleur thermique (MJ Reseach Inc) à 94°C.
Incuber 5 minutes.

Exécuter 10 fois le cycle d'amplification PCR suivant :

45 secondes à 94°C de dénaturation

45 secondes à 55°C d'annealing

1 minute à 72°C d'extension

Incuber 10 minutes à 72°C et mettre à 4°C.

4.5.4. Deuxième PCR.

Cette deuxième PCR permet de garantir la spécificité des exons amplifiés. Parce que l'amorce de gauche (Oligonucleotide SV40P) de la 1^{ière} PCR est substituée par une autre (Oligonucleotide dUAd2) beaucoup plus proche de l'exon capturé, l'amorce de droite (UAP2) est maintenue. La séquence de la nouvelle amorce de gauche est :

CAU CAU CAU CAU CAG TAC TCT TGG ATC GGA (Oligonucleotide dUad2)

procédure

Ajouter dans un tube de 0,5 ul les réactifs suivants :

1 µl de réaction de première PCR ;

5 µl de tampon-PCR 10X ;

1 µl de mélange de dNTP 10 mM de chaque ;

2 µl de UAP2 (10uM) ;

2 µl d'oligonucleotide dUAd2 (10uM) ;

38,5 µl d'eau distillée ;

0,5 ul (=2,5 U) de Taq DNA polymérase.

Agiter et couvrir de 50ul d'huile PCR.

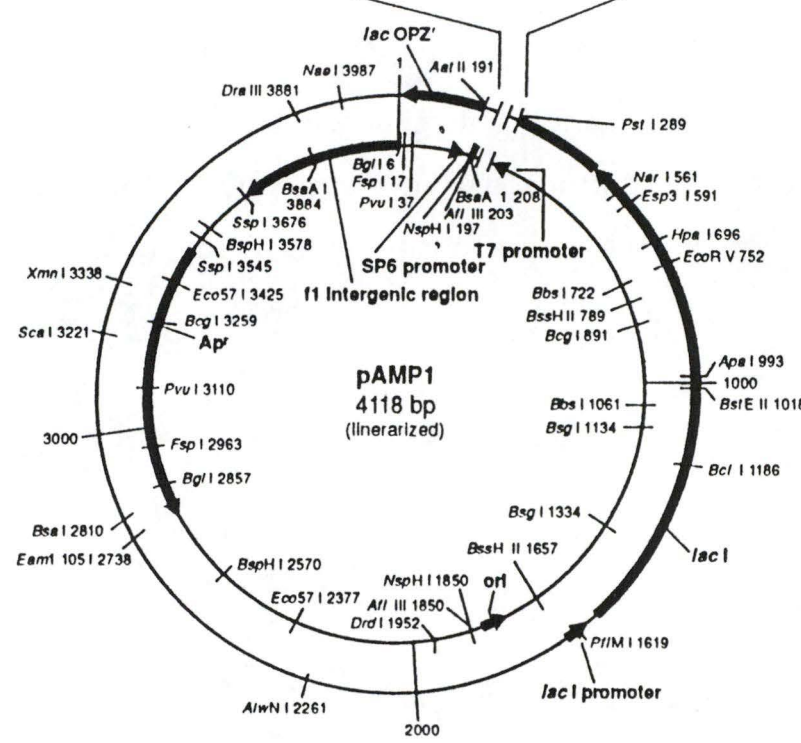
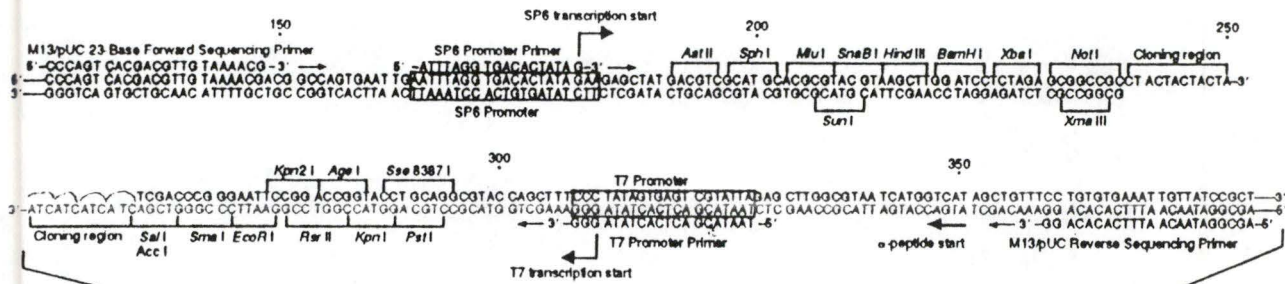


Figure 14 : Carte de pAMP1

Placer le tube dans le cycleur thermique (MJ Reseach, Inc) à 94°C.
Incuber 5 minutes.

Exécuter 30 fois le cycle d'amplification PCR suivant :

- 45 secondes à 94°C de dénaturation
- 45 secondes à 55°C d'annealing
- 1 minute à 72°C d'extension

Incuber 10 minutes à 72°C et mettre à 4°C.

4.5.5. Clonage des produits de la deuxième PCR.

Le vecteur pAMP1 (figure 14) permet le clonage de produits PCR sans passer par les étapes de ligation et purification. La présence de résidus uraciles au niveau des régions 3' et 5' des produits de la seconde PCR, permet de générer des extrémités simple brin grâce à l'activité de l'UDG (uracil DNA glycosylase) qui enlève les résidus uraciles conduisant à un retrécissement de la séquence d'un des deux brins d'où un mésappariement. La complémentarité entre Ces extrémités simple brin des produits amplifiés et celle de pAMP1 (figure 15) permet la formation de molécules chimériques qui sont prêtes pour la transformation.

Procédure

Ajouter dans un tube de 0,5 µl les réactifs suivant :

- 2 µl (100 ng) de produits PCR ;
- 2 µl de vecteur pAMP1(25 µg/ml) ;
- 1 µl de tampon-PCR 10X ;
- 1 µl (1 U/µl) de uracil DNA glycosylase(UDG) ;
- 4 µl de H₂O stérile.

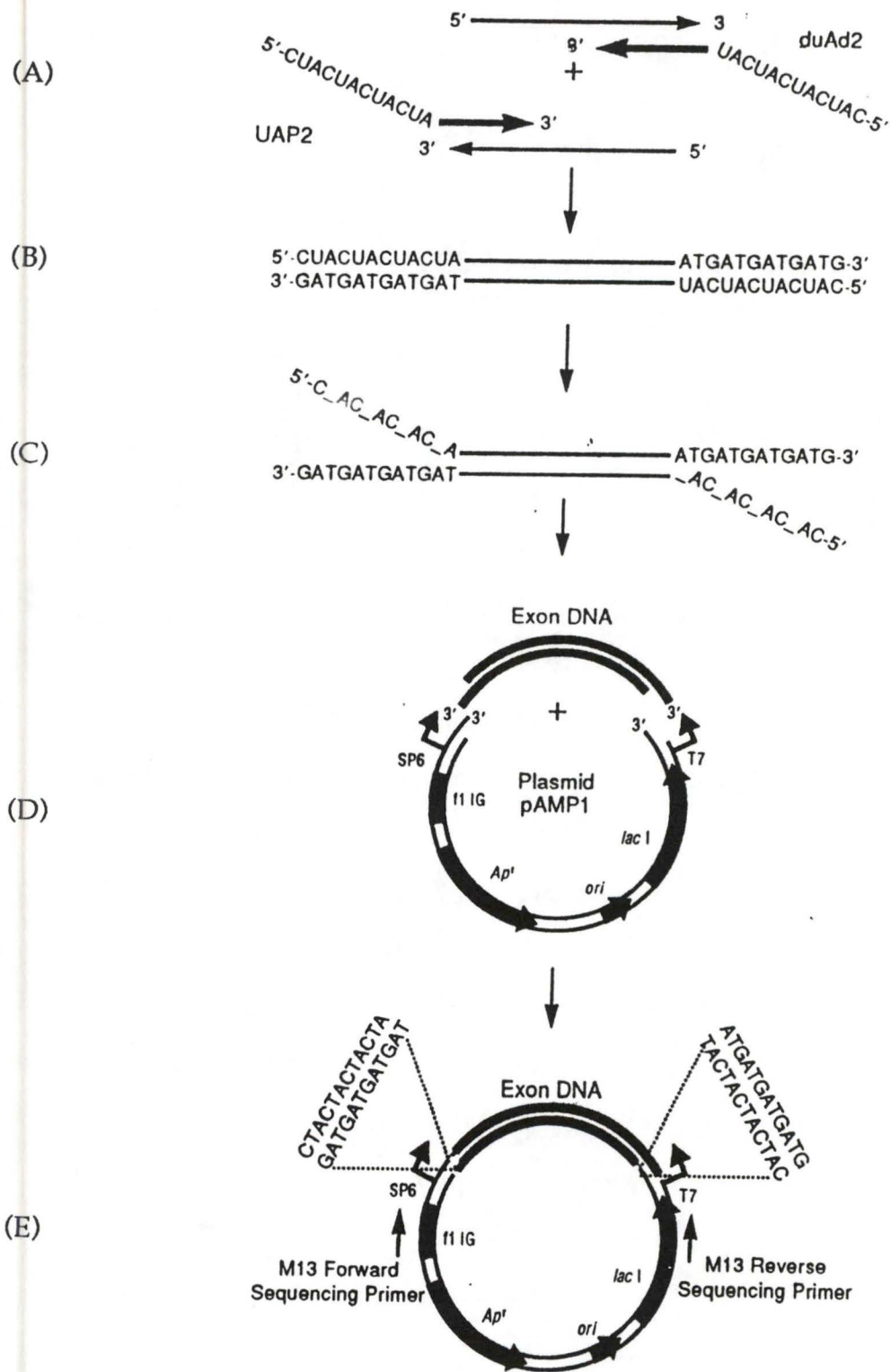


Figure 15 : Clonage des produits amplifiés dans pAMP1.

(A) Amplifier les produits de la 1^{ière} PCR par amorçage des oligonucléotides contenant des résidus uracile. (B) Générer des extrémités cohésives en incubant les produits de 2^{ème} PCR en présence de l'Uracil DNA Glycosidase qui permet de disrupter l'appariement des bases en enlevant des résidus uracile. (C) Appairer des bouts cohésifs complémentaires entre produits amplifiés et vecteur pAMP1 pendant une incubation de 30 minutes. (E) Après la transformation de cellules compétentes, séquencer en amorçant, avec l'oligonucléotide M13 reverse (ou bien T7) pour générer une séquence sens, ou bien avec l'oligonucléotide M13 forward pour générer une séquence antisens.

Mélanger et incuber 30 minutes à 37°C.

Utiliser 5 µl du mélange réactionnel pour transformer 100 µl de cellules compétantes DH5α par électroporation.

4.5.6. Evaluation des transformants par PCR.

Au moyen d'une réaction PCR réalisée directement sur les colonies pAMP1 résultant du clonage des candidats exons, il est rapidement possible de préciser les clones qui contiennent des inserts de taille suffisante. La limite fixée est de ≥ 100 bp.

procédure

Pour chaque colonie obtenue, mettre 50 µl du mélange suivant dans un tube stérile de 0,5 µl :

2 µl de UAP2(10 µM) ;

2 µl de oligonucleotide dUAd2(10 µM) ;

1 µl de mélange de dNTP 10 mM de chaque ;

5 µl de tampon-PCR 10X ;

39,5 µl de H₂O stérile ;

0,5 µl (=2,5 U) de Taq DNA polymerase.

Transférer une portion de chaque colonie dans les 50µl du mélange précédant. Agiter convenablement.

Couvrir chaque échantillon de 50 µl d'huile PCR

Placer les échantillons dans le cycleur thermal (MJ Reseach, Inc).

Exécuter le programme suivant :

5 minutes à 94°C de dénaturation ;

30 fois le cycle d'amplification :

45 secondes de dénaturation à 94°C

30 secondes d'annealing à 55°C

1 minute d'extension à 72°C,

10 minutes d'extension supplémentaire à 72°C avant de mettre sur glace.

Analyser 5 µl de chaque réaction par électrophorèse en gel d'agarose 2% coloré au bromure d'ethidium. L'utilisation d'un marqueur de poids moléculaire de 100 en 100 bp est recommandée.

5. Analyse des candidats exons.

5.1. Séquençage.

La première étape de la caractérisation des candidats exons retenus, consiste à déterminer leur séquence.

Nous procédons par le Séquençage cyclique (Cycle Sequencing). Le vecteur pAMP1 qui contient des exons potentiels offre deux possibilités d'amorçage au cours de l'étape d'amplification du séquençage cyclique (voire figure 14). Nous avons utilisé l'amorce M13 reverse qui permet de générer une séquence sens (orientée de 5' à 3') à partir du vecteur pAMP1 contenant l'exon potentiel. Sur base de la séquence, une paire

d'amorces est définie et synthétisée de manière à contribuer à la mise en évidence par RT-PCR de l'expression de l'exon candidat.

5.2. Comparaison des séquences aux banques de données.

Les séquences sont introduites dans le programme Geneworks (IntelliGenetics) et comparées aux séquences des bases de données à l'aide du logiciel BLAST, accessible par E-mail au National Center for Biological Information (NCBI; adresse blast@ncbi.nlm.nih.gov). Deux bases de données sont testées : premièrement, une base de données dite "non redondante", qui reprend en supprimant les duplications les banques GenBank, EMBL et PDB ; deuxièmement la banque DBEST, composée de segments de cDNA. Les séquences sont aussi traitées par le programme logiciel GRAIL de prédiction des segments codants, également accessible par E-mail (grail@ornl.gov).

5.3. Vérification de la région d'origine.

Afin d'éliminer les exons correspondant à des artefacts de clonage, nous vérifions l'origine de chaque exon candidat en réalisant une hybridation par Southern sur du DNA des différents YACs du contig reeler digéré par *EcoRI*. Cette vérification est d'autant plus utile que le YAC FAK-G3, choisi pour effectuer l'exon trapping 3', est chimérique. Les candidats qui proviennent bien de la région *reeler* de FAK-G3 doivent obligatoirement réagir avec FAK-G3, FBE-A6 et FAT-F4, plus

éventuellement avec FEZ-H12, mais pas avec les YACs AAT-C6, FFQ, FFS.

5.4. Zoo blot.

L'hybridation des exons candidats à de l'ADN de différentes espèces (Monaco et al., 1986) permet de définir les espèces qui possèdent un exon apparenté. Dans cette optique, une séquence conservée au cours de l'évolution possède une capacité fonctionnelle, et correspond probablement à une séquence codante. Les candidats isolés au cours de ce travail proviennent bien sûr de souris et sont testés avec de l'ADN de rat, hamster, homme, lapin, boeuf, pigeon et grenouille. Les Southern blots de ces ADN de diverses espèces sont hybridés à l'exon marqué et les filtres sont lavés à faible stringence (SSPE 1X) afin de révéler les hybridations croisées.

5.5. Northern blot.

Afin de vérifier la présence d'un messager contenant l'exon candidat, les exons marqués sont testés en Northern blot sur du RNA poly(A)⁺ de cerveau embryonnaire normal, de cerveau adulte normal, et de testicule. Ces tissus sont en effet réputés pour exprimer une grande variété de gènes. L'intérêt principal du Northern blot est de révéler la présence d'un message et d'en définir la taille ainsi que la multiplicité éventuelle. Malheureusement, cette technique manque notablement de sensibilité, en particulier lorsque le fragment exon marqué est de petite

taille, ce qui est généralement le cas des exons isolés par exon trapping. C'est pourquoi il a été nécessaire, avec la plupart des exons que nous avons étudié, d'analyser leur expression par RT-PCR.

5.6. RT-PCR.

Les méthodes traditionnelles de détection et d'analyse de transcrits, telles que le Northern blot, le dot blot et, le slot blot exigent des quantités en ARN total dépassant plusieurs microgrammes. Ce manque de sensibilité nécessite de recourir à des méthodes plus sensibles, telles que la RT-PCR ou le RNase protection assay (RPA) La RT-PCR est la technique la plus sensible et c'est celle que nous avons utilisée, selon le protocole détaillé au § 2.5.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Résultats.

1.1. Isolement d'exons 3' terminaux.

Avec la collaboration des laboratoires des Drs. E .Green et D. Krizman, plusieurs exons ont été isolés à partir du chromosome artificiel de levure ou YAC FAK-G3. Ces exons ont été obtenus en utilisant la variante de la technique d'amplification d'exons appelée "exon trapping 3'", telle que nous l'avons décrite dans la section Matériels et Méthodes. L'ADN du YAC FAK-G3 est purifié, digéré et

sous-cloné dans le vecteur pTAG4. Ce dernier diffère du vecteur pSPL3 de l'exon trapping classique par l'absence de l'exon 3' terminal au sein de l'unité transcriptionnelle du gène rapporteur. Le produit de ligation (vecteur-fragment de FAK) est introduit par transfection dans les cellules COS-7, où la transcription du vecteur se réalise sous le contrôle du promoteur SV40. Si le fragment de DNA cloné dans pTAG4 contient un exon 3' terminal, la maturation du transcrit procède jusqu'à la formation d'un ARN messager mature, y compris l'addition d'une queue poly(A). L'ARN est isolé des cellules COS-7, et converti en ADNc simple brin par la transcriptase inverse (SUPERScript II ; LIFE TECHNOLOGIES) à l'aide d'une amorce poly(dT)₁₇-adapteur qui s'hybride à la queue poly(A). Une première PCR de 10 cycles réalisée à l'aide d'une amorce complémentaire de l'adapteur et d'une amorce vecteur, est suivie d'une seconde PCR "nichée" ("nested") de 30 cycles. Les produits d'amplification sont ligués au vecteur pAMP1. La séquence des inserts est déterminée par "Cycle sequencing" à partir d'une amorce (M13 reverse) selon les recommandations de la firme (LIFE TECHNOLOGIES), permettant d'obtenir la séquence sens de l'exon capturé.

Parmi les nombreux clones exons 3' obtenus, 4 fragments possèdent une structure typique d'exon 3' terminal, en particulier la présence d'un site consensus de polyadénylation à une distance de 10 à 30 bp de la queue de poly(A). Ces fragments, dénommés FAK12, 19, 25 et 55 ont été sélectionnés en vue d'une analyse plus poussée.

- (A) TACCGGTCCGGAATTCCCGGGTCGACATCATCATCATCATCAGTACTCT
 TGGATCGGAAACCCGCTGGCCTCCGAACGGNACTTGTGGAGATGGTGAA
 AGCCAAGAAAGCTGCTCAGGNGCAAGTGCTGAATGCAAGCAGAGCCAGGNA
 ATAATGCAGGCAANCCTGGTTGTGTGTGCACTTTTATAATAAAAACTGNA
 AATACTGTACAC (A)₁₇
- (B) 5'ACTTGTGGAGATGGTGAAAGC 3' (FAK19-5', T_m=62°C)
 5'AAGTGCACACACAACCAGG 3' (FAK19-3', T_m=58°C)

Figure 16 : (A) Séquence du fragment génomique amplifié FAK19 : séquence de l'amorce FAK19-5'(gras) ; séquence complémentaire de l'amorce FAK19-3'(gras) ; la séquence signal de polyadénylation (soulignée). (B) Séquences des amorces définissant le STS (Sequence Tagged Site ; Olson, 1990) FAK19.

1.2. Analyse de l'exon 3' FAK19.

Le séquençage a montré que le fragment FAK19 présente une séquence de 347 bases renfermant un signal de polyadénylation (AATAAA) situé à 18 bases de l'extrémité 3'. Il s'agit d'une caractéristique clef d'un exon 3'. Cette séquence indiquée à la figure 16 a été débarrassée des bras de vecteur. Nous en avons défini un STS de 102 pb spécifique du fragment FAK19, en sélectionnant une paire d'amorces :

5'ACT TGT GGA GAT GGT GAA AGC 3' (FAK19-5' , T_m=62°C)

5'AAG TGC ACA CAC AAC CAG G 3' (FAK19-3' , T_m=58°C)

T_m=température de fusion

Les recherches d'homologie pratiquées au moyen du logiciel BLAST, n'ont mis en évidence aucune séquence homologue de la séquence FAK19 dans les bases de données Genbank, EMBL ni dans la base DBEST. Ce qui montre que le fragment FAK19 appartiendrait probablement à un nouveau gène.

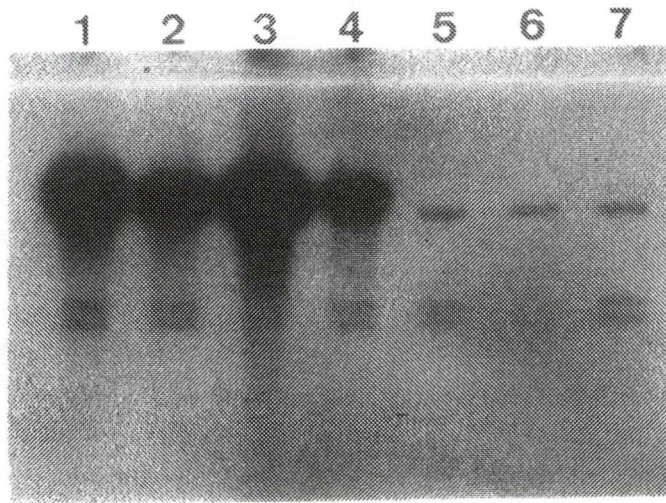


Figure 17 : Détection par la sonde FAK19 d'un fragment commun aux YACs du contig *reeler*. L'ADN de YACs est digéré par *EcoRI* et séparé par électrophorèse en gel d'agarose (0,8% d'agarose) avant d'être transféré sur filtre Hybond-N⁺ (AMERSHAM) et hybridé avec la sonde FAK19 marquée (RadPrime DNA Labeling, LIFE TECHNOLOGIES). Les conditions de lavage sont : 2 fois 10 minutes avec 2XSSPE, 0,1% (w/v) SDS à 65°C ; 15 minutes avec 1XSSPE, 0,1% (w/v) SDS à 65°C ; 2 fois 10 minutes dans 0,1XSSPE, 0,1% (w/v) SDS à 65°C. Le film a été exposé pendant 3 jours. Les pistes 1 à 7 indiquent les YACs : FAT-F4; FEZ-H12 ; FBE-A6 ; FAK-G3 ; AAT-C6 ; FFQ ; FFS.

1.2.1. Confirmation de l'origine dans la région génomique d'intérêt.

En vue d'exclure le clonage d'artéfacts, nous avons vérifié l'origine génomique du fragment FAK19, par Southern blot sur de l'ADN de YACs digéré par *EcoRI*. Cette vérification est d'autant plus importante que le YAC FAK-G3 contient un fragment d'ADN qui ne provient pas de la région *reeler* (chimérisme). L'autoradiogramme de la figure 17 montre que la sonde FAK19 marquée s'hybride à un fragment commun aux 4 YACs suivant : FAK-G3 ; FAT-F4 ; FBE-A6 ; FEZ-H12. Il s'agit des YACs contenant le microsatellite *D5Mit61*, ce qui confirme la localisation du fragment FAK19 dans la région *reeler* (cf carte figure 3).

1.2.2. Conservation entre espèces.

Nous avons tenté de réaliser la cross-hybridation de la sonde FAK19 avec l'ADN de diverses espèces, digéré par *EcoRI* (technique de "zoo blots"). Le résultat de cette analyse ne nous a pas permis d'évaluer la conservation du fragment FAK19. En effet l'autoradiogramme obtenu est de qualité médiocre, montrant uniquement un signal très étalé non spécifique ("smear"), et ce malgré l'incubation de la sonde avec l'ADN total pour bloquer les séquences répétées.

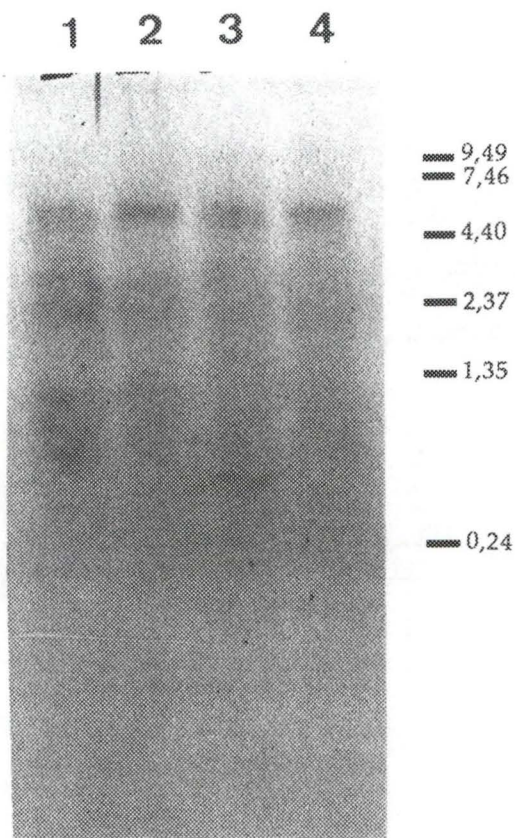


Figure 18 : Expression du gène du récepteur de la transferrine (cDNA reçu de F. Ruddle). 2 μ g d'ARN poly(A)⁺ sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose/formaldéhyde (1% d'agarose, 0,66M de formaldéhyde), transférés sur filtre Hybond-N (AMERSHAM) et hybridés (cf § 2.4 de M&M) avec la sonde marquée (RadPrime DNA Labeling, LIFE TECHNOLOGIES) de l'ADNc du récepteur de la transferrine. Les conditions de lavage sont : 2 fois 15 minutes avec 2XSSC, 0,1% (w/v) SDS à température ambiante ; 15 minutes avec 0,2XSSC, 0,1% (w/v) SDS à 42°C. Le film a été exposé pendant 3 jours. Les pistes 1 à 4 indiquent les tissus : cerveau embryonnaire normal; cerveau adulte normal; cerveau adulte *rOrl/rOrl*; testicule normal. A droite, est représenté le marqueur de poids moléculaire (0,24-9,5 Kb RNA Ladder, LIFE TECHNOLOGIES).

1.2.3. Northern blot.

Nous avons tenté de prouver l'expression de l'exon 3' FAK19 en réalisant un Northern blot (voir § 2.4 de M&M) à partir de l'ARN poly(A)⁺ de testicule, de cerveau embryonnaire, de cerveau adulte et de cerveau adulte *reeler* homozygote (*rl^{Orl}/rl^{Orl}*). Le cerveau et le testicule sont en effet connus pour exprimer la presque totalité des messages. Nous n'avons détecté aucun signal. Le contrôle de qualité des préparations de l'ARN et de la procédure du Northern blot a été réalisé par la détection de l'expression du gène du récepteur de la transferrine (figure 18), un messenger de 5 kb présent en nombre de copies réduit. Il semble donc que l'emploi des exons comme sondes soit délicat, un problème qui est discuté plus loin.

1.2.4. RT-PCR.

La RT-PCR nous a permis de détecter l'expression de l'exon 3' FAK19 dans divers tissus. Nous avons procédé comme indiqué au § 2.5 de M&M. Les extraits d'ARN total sont d'abord traités à la DNase afin d'empêcher une amplification à partir de l'ADN résiduel qui les contamine. L'absence de contaminants est vérifiée pour chaque échantillon en réalisant une réaction contrôle où la transcriptase inverse est omise. Le premier brin de l'ADNc est synthétisé en amorçant la transcription inverse sur 1 µg d'ARN total des tissus d'intérêt, avec un mélange d'hexanucléotides de séquence aléatoire. A partir de l'ADNc, une réaction de polymérisation en chaîne de 35 cycles est effectuée à l'aide des amorces définissant le STS FAK19. Un contrôle

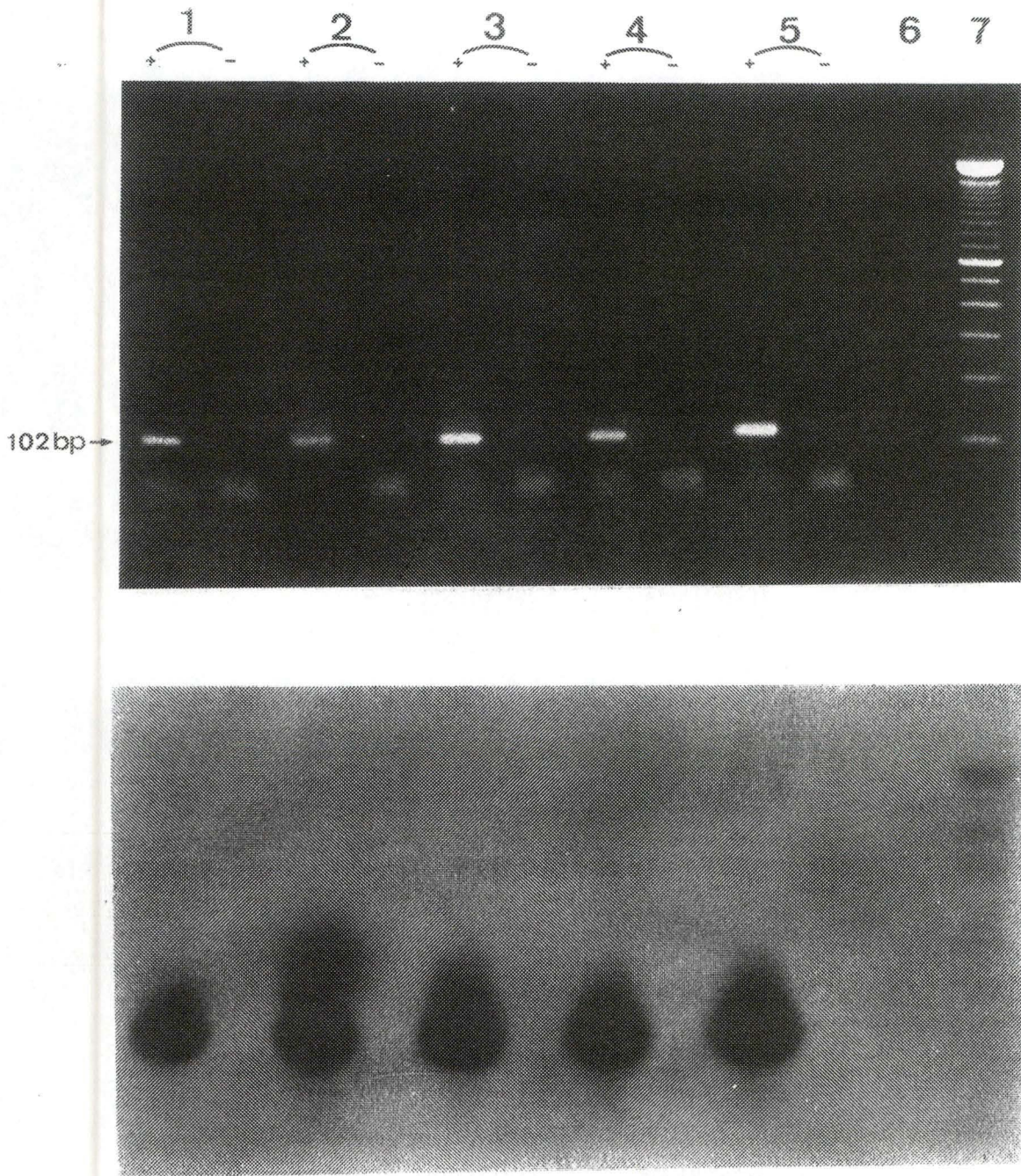


Figure 19 : Détection de l'expression de l'exon 3' FAK19 dans différents tissus.

(A) Gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium des produits RT-PCR. 20 μ l de réaction de la RT-PCR réalisée à l'aide des amorces FAK19.5' et FAK19.3', sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose (1,5% d'agarose, 0,5 μ g/ml de bromure d'éthidium). Les signes + et - indiquent respectivement la présence et l'absence de la transcriptase inverse. Les numéros indiquent les tissus : 1=rein ; 2=testicules ; 3=cerveau adulte ; 4=cerveau embryonnaire ; 5=cerveau embryonnaire *r1Orl/r1Orl*; 6=contrôle négatif de l'étape PCR (H₂O stérile remplace la réaction de la transcription inverse) ; 7=marqueur de poids moléculaire(100 bp DNA Ladder, LIFE TECHNOLOGIES).

(B) Validation des produits RT-PCR par hybridation southern. les produits RT-PCR du gel montré en A sont transférés sur filtre Hybond-N⁺ (AMERSHAM) et hybridés avec la sonde FAK19 marquée (RadPrime DNA Labeling. LIFE TECHNOLOGIES). Les conditions de lavage sont : 2 fois 15 minutes dans 2XSSPE, 0,1%SDS à 65°C ; 2 fois 15 minutes avec 1XSSPE, 0,1% SDS à 65°C ; 1 fois 15 minutes avec 0,1XSSPE, 0,1%SDS à 65°C. Le film a été exposé pendant 6 heures.

négatif de la réaction PCR (le template est substitué par H₂O stérile) est nécessaire afin d'exclure une contamination du matériel utilisé (embouts, pipette etc). L'analyse des produits d'amplification par électrophorèse en gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium (figure 19-A) met en évidence un produit de taille attendue (102 bp) aussi bien dans le rein, le testicule, le cerveau (embryonnaire et adulte) sauvage que dans le cerveau des deux allèles *reeler* que nous détenons au laboratoire (*rl*^{Ed} et *rl*^{Orl}). L'autoradiogramme de la figure 19-B montre la validation par Southern blot que le produit obtenu par RT-PCR est bien le STS FAK19.

1.2.5. Résumé des résultats obtenus avec FAK19.

L'analyse du fragment génomique FAK19 démontre que FAK19 est bien un exon terminal 3' appartenant à un nouveau gène. Bien que la conservation de ce dernier n'ait pas pu être mise en évidence, problème discuté plus loin, son expression est vérifiée par les expériences de RT-PCR aussi bien dans le cerveau (embryonnaire et adulte) normal que *reeler* homozygote *Ed* et *Orl*.

1.3. Analyses réalisées sur l'exon 3' FAK12.

Le séquençage a montré que le fragment FAK12 présente une séquence de 174 bases et un signal de polyadénylation (ATTAAA) situé à 15 bases de l'extrémité 3'. Il s'agit d'une caractéristique clef d'un exon 3'. La figure 20 représente la séquence obtenue du fragment FAK12,

- (A) CCGGAGAGCAGAAAGAGGAGTGTGCGCACAGTGCAGCTCTGCCAGAC
 GCTGCTCCTCCACCAACCACTGAGCCTTCTGGAAAGTTTTCTGCATT
 ATATTTTCAAAGAAGTATGACGGGATGTGTCNCGTAGTTTTAAAATGTA
 AAGCCATAAAACATTAAAAGTGCATTTTGAGNT(A)₁₇
- (B) 5' AAAGAGGAGTGTGCGCACAGTGCAG 3' (FAK12.1, T_m=71°C)
 5' AAACTTTCCAGAAGGCTCAGTGG 3' (FAK12.2, T_m=66°C)

Figure 20 : (A) Séquence du fragment génomique amplifié FAK12 : Séquence de l'amorce FAK12.1 (gras) ; la séquence complémentaire de l'amorce FAK12.2(gras) ; la séquence signal de polyadénylation (soulignée). (B) Séquences des amorces définissant le STS (Sequence Tagged Site; Olson, 1990) FAK12.

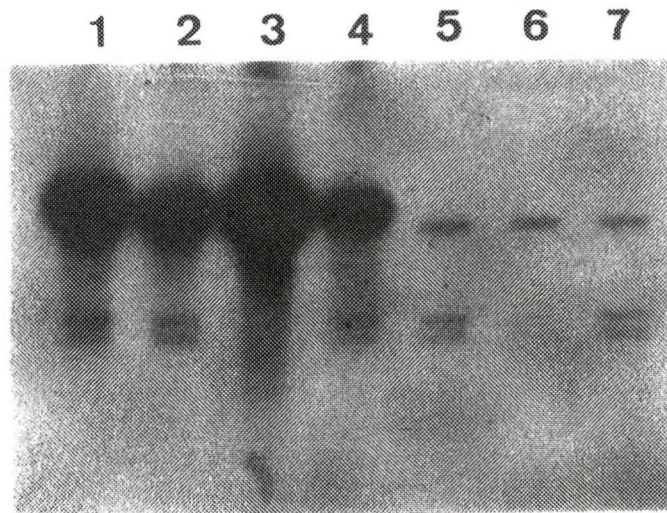


Figure 21 : Détection par la sonde FAK12 d'un fragment commun aux YACs du contig *reeler*. L'ADN de YACs est digéré par *EcoRI* et séparé par électrophorèse en gel d'agarose (0,8% d'agarose) avant d'être transféré sur filtre (Hybod-N⁺, AMERSHAM) et hybridé avec la sonde FAK12 marquée (RadPrime DNA Labeling LIFE TECHNOLOGIES). Les conditions de lavage sont : 2 fois 10 minutes avec 2XSSPE, 0,1% (w/v) SDS à 65°C; 15 minutes avec 1XSSPE, 0,1% (w/v) SDS à 65°C; 2 fois 10 minutes dans 0,1XSSPE, 0,1% (w/v) SDS à 65°C. Le film a été exposé pendant 4 jours. Les pistes 1 à 7 indiquent les YACs : FAT-F4; FEZ-H12 ; FBE-A6 ; FAK-G3 ; AAT-C6 ; FFQ ; FFS.

mais débarrassée de bras de vecteur de pAMP1. Comme pour FAK19, nous en avons défini un STS de 74 bp spécifique du fragment FAK12, en sélectionnant une paire d'amorces :

5' AAA GAG GAG TGT CGC ACA GTG CAG 3' (FAK12.1 , Tm=71°C)

5' AAA CTT TCC AGA AGG CTC AGT GG 3' (FAK12.2 , Tm=66°C)

Les recherches d'homologies dans les bases de données n'ont donné aucun résultat significatif. Ce qui montre que le fragment FAK12 pourrait appartenir à un nouveau gène.

1.3.1. Confirmation de l'origine dans la région génomique d'intérêt.

Comme pour l'analyse de FAK19, nous avons vérifié l'origine du fragment FAK12 en réalisant un Southern blot sur de l'ADN de YACs digéré par *EcoRI*. Rappelons que cette vérification est d'autant plus importante que le YAC FAK-G3 contient un segment d'ADN qui ne provient pas de la région *reeler* (chimérisme). L'analyse de l'autoradiogramme montre à la figure 21 que la sonde FAK12 s'hybride à un fragment commun présent dans 3 YACs contenant le microsatellite *D5Mit61*, c'est-à-dire les YACs FAK-G3, FAT-F4 et FBE-A6, ce qui permet de confirmer la localisation de l'exon FAK12 dans la région *reeler*.

1.3.2. Conservation entre espèces.

Comme pour l'analyse de FAK19, nous avons tenté de réaliser la cross-hybridation de la sonde FAK19 avec l'ADN de diverses espèces, digéré par *EcoR* I (technique de "zoo blots"). Le résultat de cette analyse ne nous a pas permis d'évaluer la conservation du fragment FAK12. En effet l'autoradiogramme obtenu est de qualité médiocre, montrant uniquement un signal très étalé non spécifique ("smear"), et ce malgré l'incubation de la sonde avec l'ADN total pour bloquer les séquences répétées.

1.2.3. Northern blot.

Comme pour l'analyse de FAK19, nous avons tenté de mettre en évidence l'expression de FAK12 en réalisant un Northern blot à partir de l'ARN polyA⁺ de testicule adulte, de cerveau embryonnaire et adulte sauvage, et de cerveau *reeler* homozygote (*r1^{Orl}/r1^{Orl}*). Aucun signal n'a pu être détecté. La qualité des préparations d'ARN et de la procédure de Northern blot a été vérifiée en détectant le messenger codant pour le récepteur de la transferrine, un messenger de 5 kb présent en nombre de copies réduit (cf Figure 18). L'absence de signal par hybridation avec FAK12 n'est donc pas liée à la qualité de l'ARNm ou de la technique, mais à l'utilisation des produits d'exon trapping comme sondes, un problème discuté plus loin.

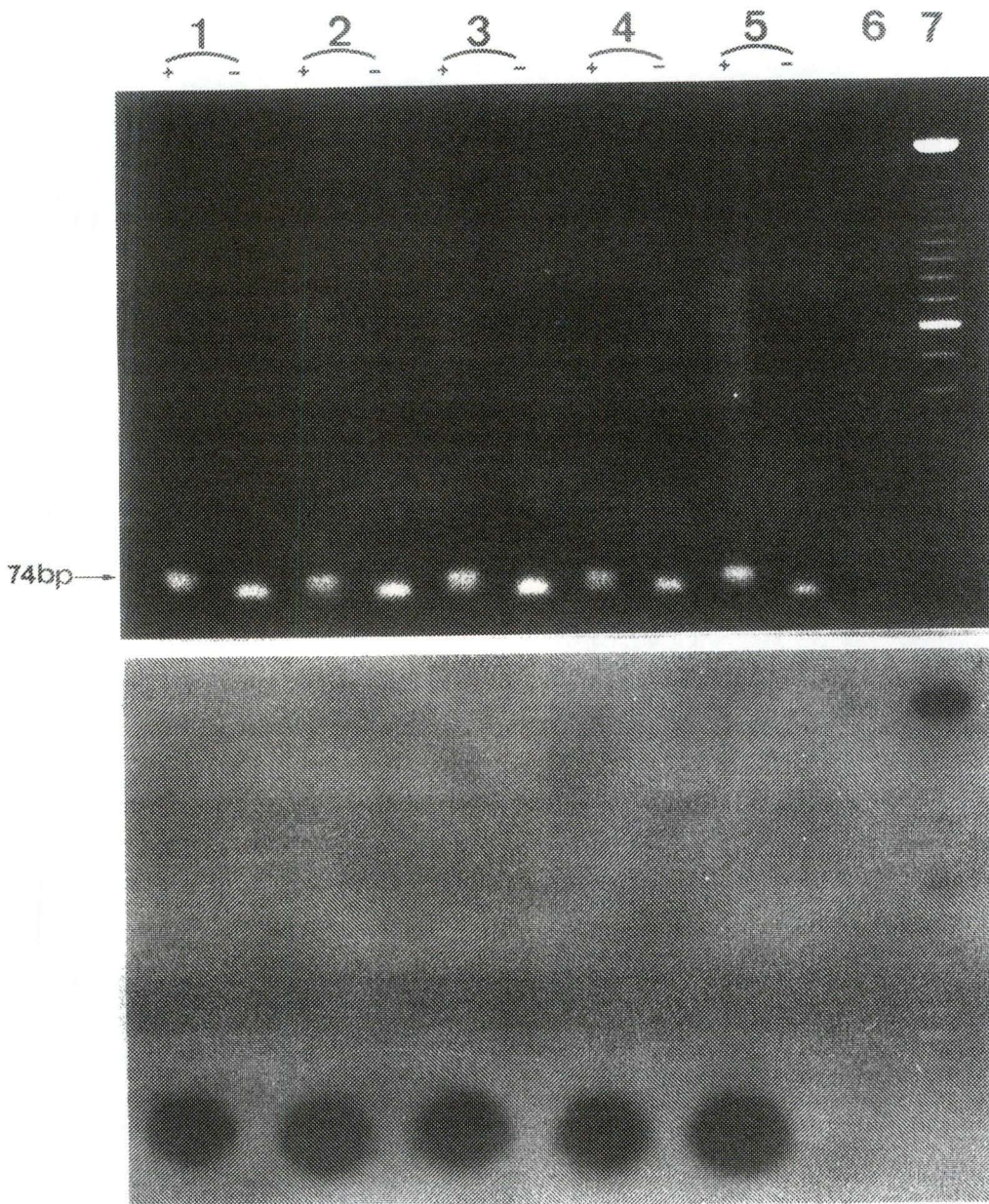


Figure 22 : Détection de l'expression de l'exon 3' FAK12 dans différents tissus.

(A) Gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium des produits RT-PCR. 20µl de réaction de la RT-PCR réalisée à l'aide des amorces FAK12.1 et FAK12.2, sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose (1,5% d'agarose, 0,5µg/ml de bromure d'éthidium). Les signes + et - indiquent respectivement la présence et l'absence de la transcriptase inverse. Les numéros indiquent les tissus : 1=rein ; 2=testicules ; 3=cerveau adulte ; 4=cerveau embryonnaire ; 5=cerveau embryonnaire *r|Orl/r|Orl*; 6=contrôle négatif de l'étape PCR (H2O stérile remplace la réaction de la transcription inverse) ; 7=marqueur de poids moléculaire(100 bp DNA Ladder. LIFE TECHNOLOGIES).

(B) Validation des produits RT-PCR par hybridation southern. les produits RT-PCR du gel en (A) sont transférés sur filtre Hybond-N⁺ (AMERSHAM) et hybridés avec la sonde FAK12 marquée (RadPrime DNA Labeling LIFE TECHNOLOGIES). Les conditions de lavage sont : 2 fois 15 minutes avec 2XSSPE, 0,1%SDS à 65°C ; 2 fois 15 minutes avec 1XSSPE, 0,1% SDS à 65°C ; 1 fois 15 minutes avec 0,1XSSPE, 0,1%SDS à 65°C. Le film a été exposé pendant 6 heures.

B

1 2 3 4



74bp →

Figure 23 : Détection de l'expression de l'exon 3' FAK12

(A) Gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium des produits RT-PCR. 20µl de réaction de la RT-PCR réalisée à l'aide des amorces FAK12.1 et FAK12.2, sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose (1,5% d'agarose, 0,5µg/ml de bromure d'éthidium). Les signes + et - indiquent respectivement la présence et l'absence de la transcriptase inverse. Les numéros indiquent les tissus : 1=cerveau adulte normal (souche de souris BALB/c) ; 2=cerveau adulte *reeler*-Ed (souche de souris C57BI/6) ; 3=contrôle négatif de l'étape PCR (H₂O stérile remplace la réaction de la transcription inverse) ; 4=marqueur de poids moléculaire(100 bp DNA Ladder, LIFE TECHNOLOGIES).

(B) Validation des produits RT-PCR par hybridation southern. les produits RT-PCR du gel en (A) sont transférés sur filtre Hybond-N⁺ (AMERSHAM) et hybridés avec la sonde FAK12 marquée (RadPrime DNA Labeling LIFE TECHNOLOGIES). Les conditions de lavage sont: 2 fois 15 minutes avec 2XSSPE, 0,1%SDS à 65°C; 2 fois 15 minutes avec 1XSSPE, 0,1% SDS à 65°C; 1 fois 15 minutes avec 0,1XSSPE, 0,1%SDS à 65°C. Le film a été exposé pendant 6 heures.

1.2.4. RT-PCR.

La RT-PCR a permis de détecter l'expression de l'exon FAK12 dans divers tissus. Nous avons suivi la même procédure que pour FAK19. L'analyse des produits d'amplification par électrophorèse en gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium met en évidence un produit de taille attendue (74 bp) dans le rein, le testicule, le cerveau (embryonnaire et adulte) aussi bien sauvage que homozygote *reeler-Orl* (figure 22-A). Aucun produit n'est amplifié dans l'ARN de cerveau homozygote *reeler-Ed*. (figure 23-A). Nous avons validé ces résultats par Southern blot à l'aide de la sonde FAK12 marquée comme le montre les autoradiogrammes des figures 22-B et 23-B: le produit amplifié par RT-PCR est clairement révélé par la sonde FAK12 et correspond donc bien au STS FAK12.

1.2.5. Résumé des résultats obtenus avec FAK12.

L'analyse du fragment génomique FAK12 démontre que FAK12 est bien un exon terminal 3' appartenant à un nouveau gène. Bien que la conservation de ce dernier n'ait pas pu être mise en évidence, son transcrit est indétectable par RT-PCR dans le cerveau adulte *reeler-Ed* alors qu'il est bien mis en évidence dans le cerveau *reeler-Orl*. Comme nous le discuterons plus loin, cette absence d'expression est due à la délétion du DNA correspondant au mutant *rl-Ed*.

- (A) ACCACATCACTGAGCTCCTGTCTTTGCTGATGCANTGTCAGCGGCATC
 TGTATACATAGCATCAGACCAACCCCAACAAAGATCCAGCTCTCTTCC
 TCCCCTCAGTAGCCAGGCTGTCCCATGTACCCCACTCAAGGGCTGTACCG
 ACATACAGTGAAGGTCGCTATAGGCTCTTCTCCACAGNAAAGACA
 AGCCTAGTGGAGTAGCTCATATATGCTCATTTTGCTAACGTTGGTTTTTGT
 TTTTATGAGTGGTATAAAGTAANCCTGGAGGCT(A)17
- (B) 5' ACCACATCACTGAGCTCCTG 3' (FAK55.1, Tm=59°C)
 5' TGTGGAGAAGAGCCTATAGCG 3' (FAK55.2, Tm=60°C)

Figure 24 : (A) Séquence du fragment génomique amplifié FAK55 : séquence de l'amorce FAK55.1(gras) ; séquence de l'amorce FAK55.2(gras) ; la séquence signal de polyadénylation (soulignée). (B) Séquences des amorces définissant le STS (Sequence Tagged Site; Olson, 1990) FAK55.

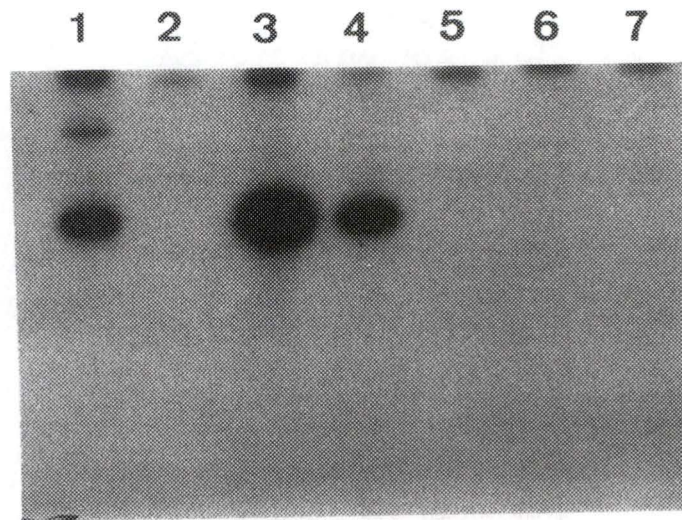


Figure 25 : Détection par la sonde FAK55 d'un fragment commun aux YACs du contig *reeler*. L'ADN de YACs est digéré par *EcoRI* et séparé par gel d'agarose (0,8% d'agarose) avant d'être transféré sur filtre (Hybond-N⁺, AMERSHAM) et hybridé avec la sonde FAK55 marquée (RadPrime DNA Labeling LIFE TECHNOLOGIES). Les conditions de lavage sont : 2 fois 10 minutes dans 2XSSPE, 0,1% (w/v) SDS à 65°C ; 15 minutes avec 1XSSPE, 0,1% (w/v) SDS à 65°C ; 2 fois 10 minutes avec 0,1XSSPE, 0,1% (w/v) SDS à 65°C. Le film a été exposé pendant 3 jours. Les pistes 1 à 7 indiquent les YACs : FAT-F4 ; FEZ-H12 ; FBÉ-A6 ; FAK-G3 ; AAT-C6 ; FFQ ; FFS.

1.4. Analyse de l'exon 3' FAK55.

Le séquençage a montré que le fragment FAK55 présente une séquence de 279 bases et un signal de polyadénylation (AATAAA) situé à 15 bases de l'extrémité 3'. Il s'agit d'une caractéristique clef d'un exon 3'. La figure 24 représente la séquence obtenue du fragment FAK55, mais débarrassée de bras de vecteur de pAMP1. Comme pour FAK19, nous en avons défini un STS de 184 bp spécifique du fragment FAK55, en sélectionnant une paire d'amorces :

5' ACC ACA TCA CTG AGC TCC TG 3' (FAK55.1 , Tm=59°C)

5' TGT GGA GAA GAG CCT ATA GCG 3' (FAK55.2 , Tm=60°C)

Les recherches d'homologies dans les bases de données n'ont donné aucun résultat significatif. Ce qui montre que le fragment FAK55 pourrait appartenir à un nouveau gène.

1.4.1. Confirmation de l'origine dans la région d'intérêt.

Comme pour l'analyse de FAK19, nous avons vérifié l'origine du fragment FAK55 en réalisant un Southern blot sur l'ADN de YACs digéré par *EcoRI*. Rappelons que cette vérification est d'autant plus importante que le YAC FAK-G3 contient un segment d'ADN qui ne provient pas de la région *reeler* (chimérisme). L'analyse de l'autoradiogramme montre à la figure 25 que la sonde FAK55 s'hybride à un fragment commun présent dans 3 YACs contenant le

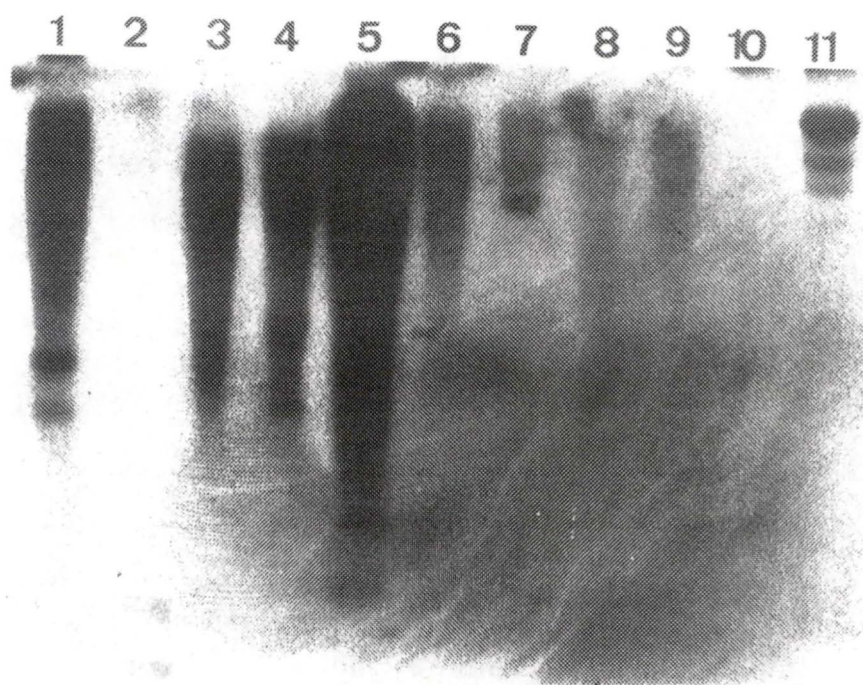


Figure 26 : Vérification de la conservation du fragment FAK55. 10 μ g d'ADN de différentes espèces sont digérés par *Eco*RI, transférés sur filtre (Hybond-N⁺, AMERSHAM) et hybridés avec la sonde FAK55 marquée (RadPrime DNA Labeling. LIFE TECHNOLOGIES). Les conditions de lavage sont : 2 fois 15 minutes à 65°C avec successivement 2XSSPE, 0,1% (w/v) SDS et, 1XSSPE, 0,1% (w/v) SDS . Le film a été exposé pendant 3 jours. Les pistes représentent : 1=souris ; 2=rien ; 3=hamster ; 4=rat ; 5=humain ; 6=lapin ; 7=grenouille ; 8=boeuf ; 9=oiseau ; 10=rien ; 11=Lambda DNA/Hind III fragments, LIFE TECHNOLOGIES).

microsatellite *D5Mit61*, c'est-à-dire les YACs FAK-G3, FAT-F4 et FBE-A6, ce qui permet de confirmer la localisation de l'exon FAK55 dans la région *reeler*.

1.4.2. Conservation entre espèces.

Nous avons évalué par la technique du zoo blot, la conservation du fragment FAK55. L'ADN de différentes espèces est digéré par *EcoRI*, séparé par électrophorèse en gel d'agarose avant d'être transféré sur filtre et hybridé avec la sonde FAK55. Le résultat de cette analyse indiqué par l'autoradiogramme à la figure 26, montre que la sonde FAK55 s'hybride avec l'ADN de grenouille, d'oiseau, de souris, de rat et de lapin. Par contre une trainée (ou smear) est révélée avec l'ADN humain et celui de hamster. FAK55 ne s'hybride pas avec l'ADN de boeuf. Ceci montre que le fragment FAK55 est relativement conservé et donc correspond bien à une séquence codante c'est-à-dire à un exon.

1.4.3. Northern blot.

Nous avons tenté de mettre en évidence l'expression de l'exon 3' FAK55 en réalisant un Northern blot à partir de l'ARN polyA⁺ de testicule, de cerveau embryonnaire et adulte sauvages, et de cerveau adulte *reeler* homozygote (*rl^{Orl}/rl^{Orl}*). Nous n'avons détecté aucun signal. Le contrôle de qualité des préparations de l'ARN et de la procédure du Northern blot a été réalisé par la détection de l'expression du gène du récepteur de la transferrine (cf figure 18), ce qui prouve que

1 2 3 4
+ + -
- - -

184bp→

Figure 28 : Détection de l'expression de l'exon 3' FAK55.

(A) Gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium des produits RT-PCR. 20µl de réaction de la RT-PCR réalisée à l'aide des amorces FAK55.1 et FAK55.2, sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose (1,5% d'agarose, 0,5µg/ml de bromure d'éthidium). Les signes + et - indiquent respectivement la présence et l'absence de la transcriptase inverse. Les numéros indiquent les tissus : 1=cerveau adulte normal (souche de souris BALB/c) ; 2=cerveau adulte *reeler*-Ed (souche de souris C57BI/6) ; 3=contrôle négatif de l'étape PCR (H₂O stérile remplace la réaction de la transcription inverse) ; 4=marqueur de poids moléculaire (100 bp DNA Ladder, LIFE TECHNOLOGIES).

(B) Validation des produits RT-PCR par hybridation southern. les produits RT-PCR du gel en (A) transférés sur filtre Hybond-N+ (AMERSHAM) et hybridés avec la sonde FAK55 marquée (RadPrime DNA Labeling, LIFE TECHNOLOGIES). Les conditions de lavage sont : 2 fois 15 minutes avec 2XSSPE, 0,1%SDS à 65°C ; 2 fois 15 minutes avec 1XSSPE, 0,1% SDS à 65°C ; 2 fois 15 minutes avec 0,1XSSPE, 0,1%SDS à 65°C. Le film a été exposé pendant 6 heures.

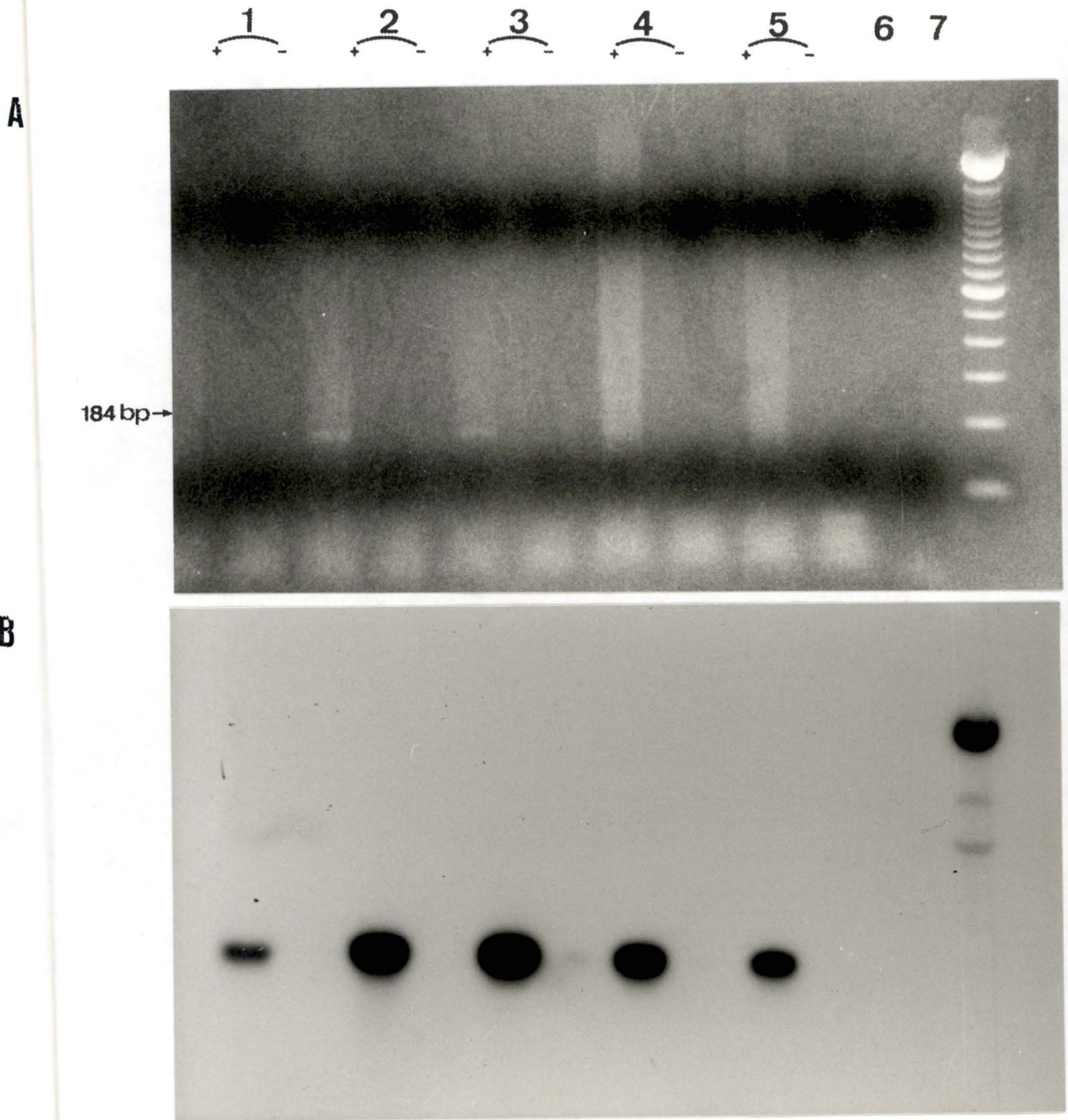


Figure 27 : Détection de l'expression de l'exon 3' FAK55 sur différents tissus.

(A) Gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium des produits RT-PCR. 20µl de réaction de la RT-PCR réalisée à l'aide des amorces FAK55.1 et FAK55.2, sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose (1,5% d'agarose, 0,5µg/ml de bromure d'éthidium). Les signes + et - indiquent respectivement la présence et l'absence de la transcriptase inverse. Les numéros indiquent les tissus : 1=rein ; 2=testicules ; 3=cerveau adulte ; 4=cerveau embryonnaire ; 5=cerveau embryonnaire *rlOrl/rlOrl* ; 6=contrôle négatif de l'étape PCR (H₂O stérile remplace la réaction de la transcription inverse) ; 7=marqueur de poids moléculaire(100 bp DNA Ladder. LIFE TECHNOLOGIES).

(B) Validation des produits RT-PCR par hybridation southern. les produits RT-PCR du gel en (A) transférés sur filtre Hybond-N⁺ (AMERSHAM) et hybridés avec la sonde FAK55 marquée (RadPrime DNA Labeling LIFE TECHNOLOGIES). Les conditions de lavage sont : 2 fois 15 minutes avec 2XSSPE, 0,1%SDS à 65°C ; 2 fois 15 minutes avec 1XSSPE, 0,1% SDS à 65°C ; 1 fois 15 minutes avec 0,1XSSPE, 0,1%SDS à 65°C. Le film a été exposé pendant 6 heures.

l'absence de signal par hybridation avec la sonde FAK55 n'est donc pas liée à la qualité de l'ARNm ou de la technique, mais à l'utilisation des produits d'exon trapping comme sondes, comme discuté ci-dessous.

1.4.4. RT-PCR.

Comme pour FAK19 la technique de RT-PCR nous a permis de détecter l'expression de l'exon FAK55 dans divers tissus. Nous avons suivi la même procédure que pour FAK19. L'analyse des produits d'amplification par électrophorèse en gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium a mis en évidence un produit de taille attendue (184bp) dans le rein, le testicule, le cerveau (embryonnaire et adulte) aussi bien normal que homozygote *reeler-Orl* (figure 27-A). Aucun produit n'est amplifié dans l'ARN de cerveau homozygote *reeler-Ed*. (figure 28-A). Nous avons validé ces résultats par Southern blot à l'aide de la sonde marquée comme le montre les figures 27-B et 28-B: le fragment de 184 bp amplifié est clairement révélé par la sonde FAK55 et correspond donc bien au STS FAK55.

1.4.5. Résumé des résultats obtenus avec l'exon FAK55.

L'analyse du fragment génomique FAK55 démontre que FAK55 est bien un exon 3' appartenant à un nouveau gène dont le transcrit est indétectable par RT-PCR dans le cerveau adulte *reeler-Ed* alors qu'il est bien mis en évidence dans le cerveau *reeler-Orl*. Comme nous le

GACGGAGATTAAAGTGTTGCACANAAGCTGGTATGTTTGCAATCCGAGC
 ACGGANGAAAANTGCTACAGAGAAGGACTTCTTAGAAGCTGTAAATA
 AGGTCATCAAGTCTTACGCCAAATTCAGCGCTACTCCCCGCTACATNAC
 ATACAATTGAGCCCCAGGGCTCTGAGTGAAAGAAGCTTCCTGTGCTTTTGT
 AACTTGTTGCCACCGCACAAAAATAAAAGATTTAAAAACTG(A)17

Figure 29 : Séquence du fragment génomique amplifié FAK25. La séquence signal de polyadénylation est soulignée.

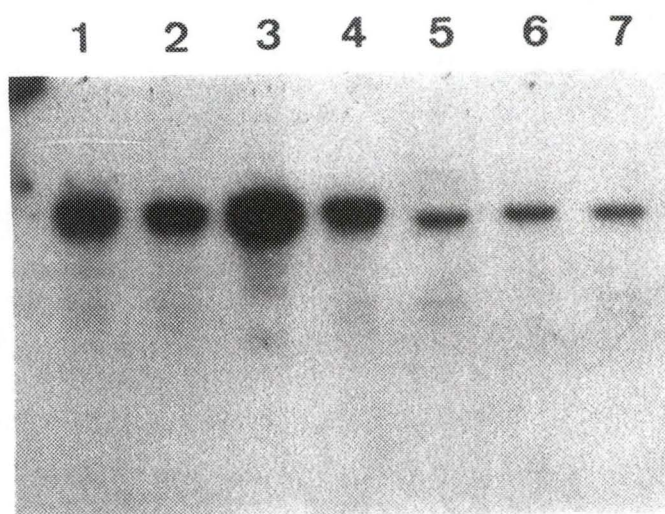


Figure 30 : Détection par la sonde FAK25 d'un fragment commun aux YACs du contig *reeler*. L'ADN de YACs est digéré par *EcoRI* et séparé par électrophorèse en gel d'agarose (0,8% d'agarose) avant d'être transféré sur filtre (Hybond-N+, AMERSHAM) et hybridé avec la sonde FAK25 marquée (random priming. LIFE TECHNOLOGIES). Les conditions de lavage ont été: 2 fois 10 minutes avec 2XSSPE, 0,1% (w/v) SDS à 65°C; 15 minutes avec 1XSSPE, 0,1% (w/v) SDS à 65°C; 2 fois 10 minutes avec 0,1XSSPE, 0,1% (w/v) SDS à 65°C. Le film a été exposé pendant 3 jours. Les pistes 1 à 7 indiquent les YACs : FAT-F4 ; FEZ-H12 ; FBE-A6 ; FAK-G3 ; AAT-C6 ; FFQ ; FFS.

discuterons plus loin, cette absence d'expression est due à la délétion du DNA correspondant au mutants *rl-Ed*.

1.5. Analyses réalisées sur l'exon 3' FAK25.

Comme pour FAK19, le séquençage nous a permis de montrer que le fragment FAK25 présente une séquence de 236 bases et un signal de polyadénylation (AATAAA) situé à 14 bases de l'extrémité 3'. Il s'agit d'une caractéristique clef d'un exon 3'. La figure 29 représente la séquence obtenue du fragment FAK25, mais débarassée de bras de vecteur de pAMP1.

La recherche de similarité à travers des banques de données, a révélé que FAK25 est extrêmement semblable (86% de similarité) et très probablement homologue d'un fragment du transcrit du gène humain MSS1.

1.5.1. Confirmation de l'origine dans la région d'intérêt.

Comme pour l'analyse de FAK19, nous avons vérifié l'origine du fragment FAK25 en réalisant un Southern blot sur l'ADN de YACs digéré par *EcoRI*. Rappelons que cette vérification est d'autant plus importante que le YAC FAK-G3 contient un segment d'ADN qui ne provient pas de la région *reeler* (chimérisme). L'analyse de l'autoradiogramme montre à la figure 30 que la sonde FAK25 s'hybride à un fragment commun présent dans 4 YACs contenant le

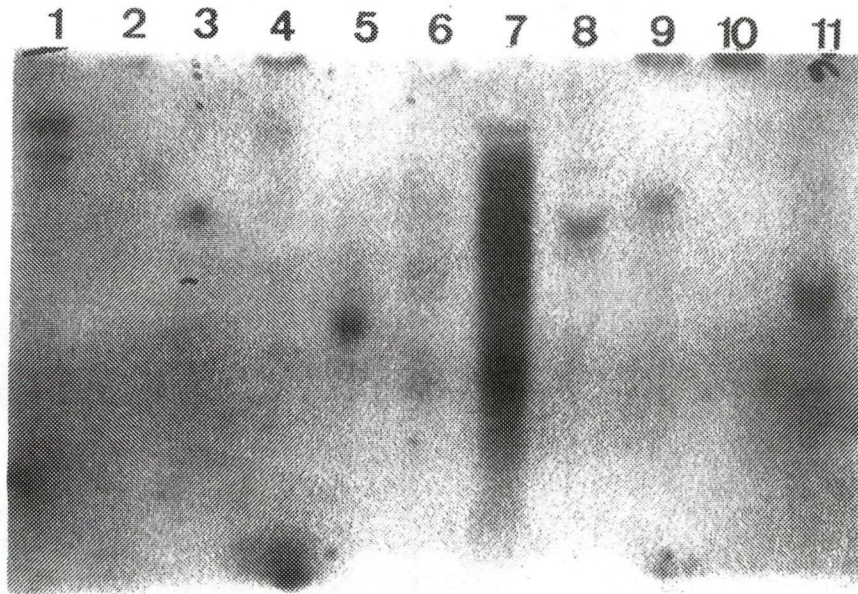


Figure 31 : Vérification de la conservation du fragment FAK25. 10 μ g d'ADN de différentes espèces ont été digérés par *EcoRI*, transférés sur filtre (Hybond-N+, AMERSHAM) et hybridés avec la sonde FAK25 marquée (RadPrime DNA Labeling, LIFE TECHNOLOGIES). Les conditions de lavage ont été : 1 fois 15 minutes à 65°C avec successivement 2XSSPE, 0,1% (w/v) SDS et, 1XSSPE, 0,1% (w/v) SDS . Le film a été exposé pendant 3 jours. Les pistes représentent : 1=Lambda DNA/*Hind* III fragments (LIFE TECHNOLOGIES) ; 2=rien; 3=oiseau ; 4=boeuf ; 5=grenouille ; 6=lapin ; 7=humain ; 8=rat ; 9=hamster ; 10=rien ; 11=souris.

microsatellite *D5Mit61*, c'est-à-dire les YACs FAK-G3, FAT-F4, FBE-A6 et FEZ-H12 ce qui permet de confirmer la localisation de l'exon FAK25 dans la région *reeler*.

1.5.2. Conservation entre espèces.

La conservation de l'exon FAK25 entre diverses espèces a été évaluée par la technique de zoo blot. La procédure est la même que pour FAK55. L'autoradiogramme indiqué à La figure 31 montre que la sonde FAK25 s'hybride avec l'ADN de grenouille, souris, rat, hamster et boeuf. Cette sonde donne une trainée (ou "smear") avec l'ADN humain et ne s'hybride pas avec celui du lapin. FAK25 est relativement conservé, en particulier chez les rongeurs.

1.5.3. Northern blot.

La technique de Northern blot au départ de 10 µg d'ARN total de différents tissus a permis de détecter un transcrit d'environ 1,5 kb. La procédure est rapporté au § 2.4 de M&M. Le resultat de cette analyse indiqué par l'autoradiogramme à la figure 32-A montre que FAK25 est un exon d'expression ubiquiste : il est present dans le cerveau, aussi bien embryonnaire (E14) qu'adulte, normal et *reeler* homozygote *Orl* et *Ed*, ainsi que dans le testicule et le rein normaux. Le niveau d'expression semble relativement variable en fonction des tissus: elle est la plus forte dans le testicule, et nettement plus faible dans le cerveau adulte. Ces données demanderaient à être précisées, car nous

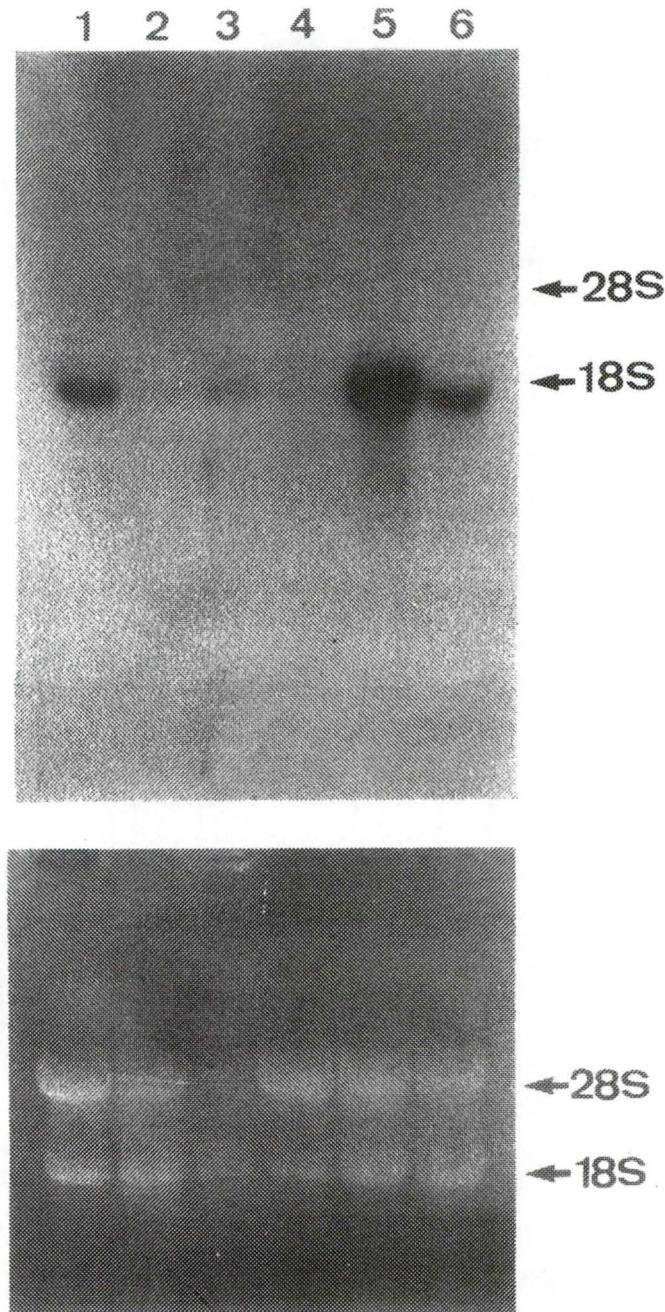


Figure 32 : Expression de l'exon FAK25. (A) 10 μ g d'ARN total sont séparés par électrophorèse en gel agarose/formaldéhyde (1% d'agarose, 0,66M de formaldéhyde), transférés sur filtre Hybond-N (AMERSHAM) et hybridés (cf 2.4 de M&M) avec la sonde FAK25 marquée (RadPrime DNA Labeling, LIFE TECHNOLOGIES). Les conditions de lavage sont : 2 fois 15 minutes avec 2XSSC, 0,1%SDS à température ambiante ; 2 fois 15 minutes avec 0,2XSSC, 0,1%SDS à 42°C. le film a été exposé pendant 3 jours. Les pistes représentent : 1=cerveau embryonnaire BALB/c ; 2=cerveau adulte BALB/c ; cerveau adulte *reeler-Orl* ; 4=cerveau adulte *reeler-Ed* ; 5=testicule ; 6=rein. (B) Le gel dénaturant coloré au bromure d'éthidium (contrôle de quantité et d'intégrité de l'ARN). 18S et 28S correspondent respectivement aux bandes de l'ARN ribosomique 18S et 28S.

n'avons pas procédé à une quantification rigoureuse de la quantité d'ARN déposé sur nos gels. Nous avons en effet seulement utilisé comme contrôle de qualité et comme estimation grossière de la quantité d'ARN total utilisé, la présence et l'intensité, sur le gel coloré au bromure d'ethidium, des deux bandes d'ARN ribosomiaux 18S et 28S(figure 32-B).

1.5.4. Résumé des résultats relatifs à l'exon FAK25.

L'analyse du fragment génomique FAK25 démontre que FAK25 est bien un exon terminal 3' appartenant au gène de souris homologue au gène MSS1 humain. La détection de son expression par analyse en Northern blot, démontre que le gène MSS1 encode un transcript de 1,5 kb exprimé aussi bien dans le cerveau (embryonnaire et adulte) normal que *reeler* homozygote *Ed* et *Orl*. Ce résultat permet de préciser la localisation chromosomique du gène *Mss1* de souris, qui devient le gène connu le plus proche de *reeler*. Le fait que le gène MSS1 ne soit pas délété dans les souris *reeler-Ed* suggère très fortement que *reeler* n'est pas identique à MSS1. Le gène MSS1 humain a été récemment localisé au niveau de la bande 7q22 du chromosome 7 (E. Green et al., non publié), de sorte que cette bande du chromosome 7 contient probablement le gène humain homologue de *reeler*. Ces données sont discutées plus en détail dans la rubrique discussion générale.

2. Discussion générale et conclusion.

Dans ce travail, nous avons appliqué la technique de clonage d'exons 3' à partir de l'ADN isolé de chromosomes artificiels de levures de la région *reeler* du chromosome 5 de souris. Parmi de nombreux clones isolés, 4 semblent bien correspondre à de véritables exons et ont été analysés en détails. Dans cette discussion, nous envisagerons les points suivants qui nous paraissent les plus importants: i) aspects techniques à propos des résultats obtenus en Northern blots et en RT-PCR; ii) problèmes posés par le clonage de cDNA complets à partir des exons; iii) mapping du gène *Mss1* de souris; iv) problèmes d'identification des exons provenant du gène *reeler*.

2.1. Aspects techniques du Northern et de la RT-PCR.

Les exons 3' isolés par la technique utilisée sont de petite taille, généralement inférieure à 300 bp. Ceci est déjà supérieur à la taille des exons isolés par exon trapping classique, par exemple dans le vecteur pSPL3 (Buckler et al., 1991), située le plus souvent entre 100 et 200 bp. Dans notre expérience, ces petits fragments de gènes sont généralement incapables de révéler la présence d'un messager en Northern blot,

probablement parce que la petite taille de la sonde par rapport à celle de la cible nécessiterait un marquage d'activité spécifique supérieure à celle qui est atteinte en routine par le procédé de "random priming". De plus, il est possible que la sonde produite par hybridation d'hexanucléotides aléatoires sur une cible de quelque 200-300 bp ne reflète pas parfaitement la séquence de la cible. Certains tests réalisés au laboratoire suggèrent qu'il pourrait être avantageux, avec les petits fragments, de les marquer au départ d'amorces spécifiques, situées à leurs deux extrémités. Nous n'avons pas utilisé cette procédure systématiquement étant donné qu'elle requiert la synthèse de deux oligonucléotides supplémentaires par fragment.

Alors que la technique de Northern souffre d'un manque de sensibilité, la RT-PCR nous a donné entière satisfaction et nous donne même l'impression qu'elle est capable de mettre en évidence une transcription à très bas bruit de gènes les plus tissus-spécifiques, dans toutes les cellules. En raison de cette énorme sensibilité, des analyses contrôles sont nécessaires. Le traitement des préparations d'ARN par la DNase I est indispensable lorsque la RT-PCR est réalisée avec deux amorces provenant du même exon, ce qui est le cas dans notre travail. Les conditions de traitement par la DNase I sont très importantes : la réaction doit être suffisante pour dégrader l'ADN, mais une trop longue incubation résulte en une dégradation de l'ARN. Les conditions décrites (15 minutes à température ambiante) nous ont donné les résultats les plus reproductibles. La principale limitation de la RT-PCR par rapport au Northern blot est qu'elle ne donne aucune indication sur la taille du messager et qu'elle ne se prête que difficilement à une quantification. Nos résultats avec les exons FAK12, FAK19 et FAK55 ne nous donnent donc aucune information sur la taille et, l'expression

des gènes correspondants. Nous pensons cependant que ces exons sont réels et ne résultent pas l'artefacts de clonage ou d'épissage en cellules COS-7. En effet, bien que très sensible, la réaction de RT-PCR n'est amorcée que s'il existe un ARN complémentaire des amorces utilisées; de plus, dans les cas où le résultat était douteux après coloration par le bromure d'éthidium, la présence d'un produit d'amplification spécifique, de taille attendue, a toujours été vérifiée par hybridation.

2.2. Problèmes de clonage de cDNA plus longs.

Comme nous l'avons mentionné plus haut, la technique d'exon trapping isole des exons de petite taille. Il s'agit là d'une limitation intrinsèque de la technique, qui pose la question difficile de l'isolement, à partir d'un exon, de l'ADNc complet ("full length"). Nous n'avons pas eu le temps ni l'opportunité d'isoler les messages correspondant aux exons que nous avons analysés, mais il nous paraît cependant utile d'esquisser brièvement la stratégie qui sera suivie au laboratoire pour ce faire.

La procédure la plus évidente est de cribler, par les exons marqués, des banques d'ADNc qui contiennent les gènes correspondants. Bien qu'évidente, cette technique est ardue par le nombre de filtres à cribler et coûteuse. De plus, elle ne garantit pas l'isolement du messenger complet, car toutes les banques sont biaisées vers des fragments 3'.

Une possibilité est de pratiquer, sur une banque ou sur une préparation d'ADNc double brin une réaction de PCR amorcée par un oligonucléotide spécifique de l'exon et un second spécifique du vecteur ou d'un adaptateur ligué à l'ADNc. Cette procédure est aisément contrôlée car seules les combinaisons d'amorces correspondant à la bonne orientation de l'ADNc donnent un résultat positif comme l'indique la figure 33. Malheureusement, comme la spécificité de la réaction n'est assurée que par l'une des deux amorces, cette procédure se traduit souvent par l'amplification de nombreux produits parmi lesquels il faut cloner le bon. Dans quelques cas, elle peut cependant permettre d'allonger la séquence codante d'un gène à partir d'un fragment.

Une troisième technique est de pratiquer la procédure 5' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). Le principe est basé sur une amplification par RT-PCR de la région 5' inconnue à partir du STS de l'exon connu : le premier brin est synthétisé à l'aide de l'amorce 3' (ou antisens) du STS. L'originalité de cette technique vient de l'addition à l'extrémité 3' de cet ADNc obtenu, d'une séquence oligod(C) qui sert de cible à l'amorce oligo(dG) (=amorce 5') pour amplifier par PCR cette extrémité 5', en plus de l'amorce 3' connu de l'exon (figure 34).

Une variante de la technique 5' RACE est le New RACE, dont le principe consiste à additionner un adaptateur directement à l'extrémité 5' de l'ARNm complet. Une préparation de l'ARN total est d'abord traitée à la phosphatase qui ne déphosphoryle que les extrémités 5' des messagers incomplets (dépourvus de coiffe), afin de les empêcher de se lier à l'adaptateur. Les messagers complets ensuite décoiffés par la pyrophosphatase de tabac avant d'être ligués à un adaptateur par la T4 RNA ligase. Une retrotranscription est amorcée sur cet

ARNm+Adapteur par l'amorce antisens connu de l'exon, suivie d'une PCR, réalisée avec l'adapteur comme amorce 5' et l'amorce antisens (ou amorce 3') de l'exon.

Quoiqu'il en soit, l'isolement du message complet correspondant à un exon reste une tâche très difficile et l'on ne peut pas dire qu'il y ait actuellement une technique qui donne entière satisfaction.

2.3. Le gène MSS1.

L'exon FAK25 possède une très significative homologie de séquence avec le gène MSS1 humain. Ce gène a été placé sur le chromosome 7, au niveau de la bande 7q22, par l'équipe de E. Green. On sait que le chromosome 7 humain possède de larges zones homologues à des zones correspondantes du chromosome 5 de la souris. C'est ainsi que le gène Hepatocyte Growth Factor (*Hgf*) est situé en 7q22 chez l'homme et en position centromérique de *reeler* chez la souris, que le gène Serotonin receptor 5A (*Sr5a*) est localisé en 7q36 chez l'homme et en position distale par rapport à *reeler* chez la souris, tout comme le gène *Engrailed-2*. Les données de cartographie du gène *reeler* (Beckers et al, 1994) le placent à peu près à égale distance de *Hgf* et de *Sr5a*, de sorte que la zone homologue chez l'homme pouvait se situer avec une probabilité à peu près égale en 7q22 ou 7q36. Notre observation que *Mss1*, très proche de *reeler*, est situé dans la bande 7q22 chez l'homme suggère fortement que le gène humain homologue de *reeler* sera situé

dans cette même région 7q22. La zone 7q21-22 de l'homme est pratiquement clonée sous forme de YACs contigus et de nombreux messages en ont déjà été isolés ou le seront très prochainement, par les équipes de Toronto (Rommens et al, 1994) et de E. Green. Il est donc tout à fait possible que l'ADNc humain correspondant à *reeler* soit déjà isolé mais pas caractérisé. Ces données auront bien sûr une utilité évidente lorsque la question du clonage et de l'étude du gène *reeler* humain se posera. Rappelons en effet que *reeler* est un modèle de certaines malformations cérébrales humaines, en particulier de la maladie de Zellweger, dont certains variants ont été cartographiés aussi sur le chromosome 7 (Naritomi et al, 1991).

Si le clonage de l'exon terminal du gène MSS1 est intéressant en soi, ce gène ne correspond probablement pas à *reeler*. MSS1 encode la sous-unité 7 du protéasome 26S isolé des érythrocytes humains (Dubiel et al, 1992). Il s'agit donc d'une protéine que l'on peut cataloguer d'ubiquiste, puisque le protéasome 26S est présent dans pratiquement toutes les cellules eucaryotes où il intervient dans des fonctions aussi diverses que la régulation mitotique - probablement en dégradant des cyclines, la présentation antigénique, ou encore l'activation de facteurs transcriptionnels. De plus, en Northern blot réalisés avec une sonde MSS1 (fournie par le Dr K. Irie), nous n'avons mis en évidence aucune différence entre des tissus de souris normales et *reeler*.

Etant donné que notre travail nous a amené à localiser le gène *Mss1* de la souris, il nous paraît intéressant de rappeler les données principales le concernant. Le gène humain MSS1 a été identifié en 1992 (Shibuya et al, 1992) comme un gène codant pour un facteur qui coopère avec le facteur transcriptionnel Tat du virus HIV. La protéine

MSS1 partage une homologie de 42% avec la protéine TBP-1 qui se lie *in vivo* à la protéine Tat mais qui supprime l'activation transcriptionnelle induite par Tat. Des études biochimiques contemporaines (Dubiel et al, 1993) ont montré l'identité entre MSS1 et la sous-unité 7 du protéasome 26S des globules rouges humains. Le protéasome 26S (revue par Peters, 1994) est un complexe protéolytique ubiquiste spécialisé dans la dégradation des protéines conjuguées à l'ubiquitine, bien que des protéines non ubiquitinylées puissent aussi être dégradées par lui (Murakami et al., 1992). Le protéasome 26S est composé d'un noyau protéolytique appelé protéasome 20S et de sous-unités périphériques qui en restreignent la spécificité et qui sont peut-être différentes selon les tissus, bien que ce point ne soit pas bien connu. Alors que le complexe 20S possède une activité protéolytique qui ne requiert pas d'ATP, l'action du protéasome 26S dépend de l'ATP et certaines des composantes périphériques du complexe sont des ATPases. Une hypothèse suggérée pour rendre compte de ces observations est que les protéines périphériques seraient impliquées dans la reconnaissance et dans le déploiement ATP-dépendant des protéines destinées à entrer dans un barril protéolytique central constitué du complexe 20S. Au cours des 2 dernières années, un rôle essentiel a été attribué au protéasome 26S dans de nombreux processus biologiques importants. Ainsi que nous l'avons rappelé plus haut, la protéine Mss1 a été découverte par son stimulation de l'activation transcriptionnelle du facteur Tat. Il est intéressant de remarquer qu'un rôle du protéasome 26S dans l'activation transcriptionnelle a récemment été bien démontré et analysé pour le facteur NF- κ B (Palombella et al., 1994). Un rôle essentiel du protéasome 26S, particulièrement des sous-unités 4 et 7, a été démontré dans la mitose

chez la levure (Gordon et al, 1993; Ghislain et al, 1993), indiquant que la dégradation protéique par le protéasome est essentielle, non pas pour l'initiation de la mitose, mais plutôt pour son achèvement. Une autre fonction importante du protéasome 26S concerne le processing antigénique. Il a été démontré récemment que les gènes LMP2 et LMP7, nécessaires à la formation des peptides antigéniques formés à partir des antigènes internes de la cellule et destinés à s'accoler aux antigènes d'histocompatibilité de classe I, sont en fait des composantes du protéasome 26S (Rock et al., 1994).

2.4. Le clonage positionnel du gène *reeler*.

Comme nous l'avons vu plus haut, les exons 3' terminaux FAK12 et FAK55 sont absents dans l'ARN des animaux homozygotes pour la mutation *reeler*-Edinburgh, mais présents dans les préparations d'ARN des animaux *reeler*-Orléans. De plus, lorsque ces clones exons FAK12 et FAK55 sont testés en Southern blot avec de l'ADN de souris normales et des deux types d'allèles *reeler*, un résultat analogue est observé: ces deux exons sont absents dans l'ADN des animaux homozygotes pour la mutation *rl^{Ed}*. Ce résultat était tout-à-fait inattendu car aucune autre donnée de cartographie ne suggèrait que la mutation *Ed* soit liée à une délétion. Sur base de ces observations, les exons FAK12 et FAK55 ont été localisés sur la carte physique du contig (I. Bar, travail soumis pour publication) dans une zone qui est de fait déléetée dans les animaux homozygotes *rl^{Ed}*. En gel en champ pulsé, la taille de la délétion a été

estimée à ≈ 150 kb et située en position distale par rapport à *D5Mit61* mais proximale par rapport au marqueur *D5Mit72*. L'existence de cette délétion est intéressante car elle fournit un test rapide de criblage des nouveaux exons candidats obtenus par exon trapping. Comme les deux exons placés dans la délétion sont des exons 3' terminaux, il est bien possible que l'un d'entre eux fasse partie du gène *reeler*, mais aucun de nos résultats ne permet d'avancer cette hypothèse.

2.5. Conclusion.

Nos résultats ont permis de mettre en évidence une délétion de 150 kb entre les marqueurs *D5Mit61* et *D5Mit72*. Les efforts futurs de clonage positionnel et d'isolement d'exons ou de fragments d'ADNc tireront parti de cette observation et seront focalisés sur le YAC FAK-G3 qui couvre presque entièrement cette délétion. Les deux autres mutants *reeler* que nous étudions (Orléans et DBA/2) représentent des mutations d'une autre nature, puisque aucun des clones à présent isolés n'est absent dans l'ADN de ces animaux. A ce stade, nous ignorons si ces allèles représentent des délétions plus petites ou des délétions situées dans une autre région du gène ou encore un autre type de mutation, par exemple une mutation ponctuelle.

CHAPITRE 4

Bibliographie

Ausubel F.M. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley (Ed) New York

Ausubel F.M. (1984) *Current Protocols in Molecular Biology*, Green publishing Associates/Wiley-Interscience New York.

Beckers M.C., Bar I. & Goffinet A.M. (1993) *Arch. Int. Physiol. Bioch.* 101: 3-

Beckers M.C., Bar I., Huynh-Thu T., Dernoncourt C., Brunialti A. L., Montagutelli. X., Guénet J-L & Goffinet A. (1994) *Genomics* 23 : 685-690.

Bird A.P. (1987) *Trends Genet.* 3 : 342-346.

Buckler A.J., Chang D.D., Graw S.L., Brook J.D., Haber D.A., Sharp P.A. & Housman D.E. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 88 : 4005-4009.

Chomczynski P. & Sacchi, N. (1989) *Anal. Biochem.* 162 : 156-159.

Dernoncourt C., Ruelle D. & Goffinet A.M. (1991) *Genomics* 11 : 1167-1169.

Dietrich W., Lander E.S.,Katz H., Licoln S.E., Shin H.S., Friedman J. & Dracopoli N.(1992) *Genetics* 131 : 423-448.

Dubiel W., Pratt G., Ferrell K. & Rechsteiner M. (1992) *J. Biol. Chem.* 267 : 22369-22377.

Dubiel W. et al, (1993) *FEBS Lett.* 323 : 276-278.

Falconer D.S. (1951) *J. Genet.* 50 : 192-201.

Frankel W., Stoye J., Taylor B. & Coffin J. (1989) *J. Virol.*:63 : 1763-1774.

Gardinner-Garden M. & Frommer M. (1987) *J. Mol. Biol.* 196 : 261-282.

Ghislain M., Udvardy A. & Mann C.(1993) *Nature* 366 : 358-361.

Goffinet A.M. (1984) *Brain Res. Rev.* 7 : 261-296.

Goffinet A.M. (1992) *Int. J. Dev. Biol.*, 36 : 101-107.

Gordon C., McGurk G., Dillon P., Rosen C. & Hastie D.N. (1993) *Nature* 366 : 355-357.

Green E.D. & Olson M.V. (1990) *Science* 250 : 94-

Kawasaki, E. S. (1991) Amplification of RNA. In: *PCR Protocols, A Guide to Methods et Applications*, Innis et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego, CA, pp. 21-27

Korn B., Lehrach H., Sedlacek Z., Manca A., Kioschis P., Konecki D. & Poustka A.M. (1993) *Human Molecular Genetics* 1 : 235-242.

Krizman D.B. & Berget S.M. (1993) *Nucleic Acids Research* 21 : 5198-5202.

Krizman D.B. & Berget S.M. (1994) *Focus* 15 : 106-108.

Love J., Knight A., McAleer M. & Todd J. (1990) *Nucleic Acids Research* 18 : 4123-4130.

Monaco A.P., Neve R.L., Colletti-Feener C., Bertelson C.J., Kurnit D.M. & Kunkel L.M. (1986) *Nature* 323 : 646-650.

Mount S.M. (1982) *Nucleic Acids Research* 10 : 459.

Murakami Y., Matsufuji S., Kameji T., Hayashi S., Igarashi K., Tamura T., Tanaka K. & Ichihara A. (1992) *Nature* 360 : 597-599

Naritomi K. et al. (1989) *Hum. Genet.* 84 : 79-80.

Ohshima Y. & Gotoh Y. (1987) *J. Mol. Biol.* 195 : 247-

Olson M.V. & Green E.D. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 : 1213-1217.

Padgett R.A., Grabowski P.J., Konarska M.M., Seiler S. & Sharp P.A. (1986) *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 1119-

Palombella V.J., Rando O. J., Goldberg A.L. & Maniatis T. (1994) *Cell* 78 : 773-785.

Peters J-M (1994) *Trends in Biochem. Sci.* 19 : 377-382.

Rock K.L., Gramm C., Rothstein L., Clark K., Stein R., Dick L., Hwang D. & Goldberg A.L. (1994) *Cell* 78 : 761-771.

Rommens J., Iannuzzi M., Kerem B., Drumm M., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Col J., Kennedy D., Hidaka N., Zsiga M., Buchwald M., Riordan J., Tsui L. & Collins F. (1989) *Science* 242 : 1059-

Rothstein R. *DNA Cloning*, II, 44-65. Glover D.M.) IRL Press : Oxford, 19.

Sharp P.A. (1994) *Angew. Chem. Int. Engl.* 33 : 1229-

Shibuya H., Irie K., Ninomiya-Tsuji J., Goebel M., Taniguchi T. & Matsumoto K. (1992) *Nature* 357 : 700-702.

Simmer M.C., Cox R.D & Avner P. (1991) *Genomics* 10 : 375-753.

Shimozawa N., Tsukamoto T., Suzuki Y., Orii T., Shirayoshi Y., Mori T. & Fujiki Y. (1992) *Science* 255 : 1132-1134.

Snell R.G., Lehrach H., Doucette-Stamm L.A., Gillespie K.M., Taylor S.A.M., Riba L., Bates G.P., Althen M.R., Mac Donald M.E., Gusella J.F., Warmuth J.J., Housman D.E., Harper P.S. & Shaw D.J. (1993) *Human Molecular Genetics* 2 : 305-309.

Tagle D., Swaroop M., Lovett M. & Collins F. (1993) *Nature* 361 : 751-753.

The Huntington's Disease Collaborative Research Group (1993) *Cell* 72 : 971-983.

Theiler K. (1972) *The House Mouse*, Springer Verlag.

Zbigniew D. & Kole R. (1991) *Mol. Cell. Biol* 11 : 6075-

Liste Des Abréviations

ADN	= Acide Désoxyribonucléique
ARN	= Acide Ribonucléique
ARNm	= ARN messenger
ADNc	= ADN complémentaire
B6	= lignée de souris C57B1/6
C	= lignée de souris BALB/c
cM	= centimorgan
DEPC	= Diéthylpyrocarbonate
dNTPs	= 2'-déoxyribonucléotides 5'-triphosphates
<i>E. coli</i>	= <i>Escherichia coli</i>
E14	= Embryon de 14 jours
Kb	= kilobases
MOPS	= 3-(N-Morpholino)propane-sulfonic acide
MSS1	= Mammalian Suppressor of Sgv1
pb	= paire de base
PCR	= Réaction de Polymérisation en Chaîne
PFGE	= Electrophorèse en champ pulsé (Pulsed field Gel Electrophoresis)
pre-ARN	= ARN immature
RACE	= Rapid Amplification of cDNA Ends
RT-PCR	= Reverse Transcription-PCR
SDS	= Dodécyl Sulfate de Sodium
SA	= Site Accepteur d'épissage 3'
SD	= Site Donneur d'épissage 5'
STS	= Sequence Tagged Site
SNC	= Système Nerveux Central
T _m	= température de fusion
U	= unité enzymatique
UV	= lumière ultra-violette
YAC	= Chromosome Artificiel de Levure (Yeast Artificial Chromosome)