

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Analyse du mutant reeler Albany 1 et cartographie du locus cdk5

MINNER, Frederic

Award date:
1997

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
NOTRE-DAME DE LA PAIX



NAMUR

Faculté des Sciences

**Analyse du mutant *reeler Albany 1*
et cartographie du locus *cdk5***

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

Frédéric MINNER
Juin 1997

Analyse du mutant *reeler Albany 1* et cartographie du locus *cdk5*

MINNER Frédéric

Résumé

Reeler est une mutation autosomique récessive de la souris, caractérisée par des anomalies du développement du système nerveux central (Goffinet, 1984). Le gène *reelin* code pour un ARNm d'environ 12 Kb. Son clonage fut réalisé en 1995 grâce à l'obtention d'un allèle issu d'une insertion transgénique (D'Arcangelo *et al.*, 1995 ; Bar *et al.*, 1995 ; Hirotsune *et al.*, 1995). Les travaux effectués jusqu'à présent ont permis de caractériser 4 des 5 allèles existants. Seule la mutation *Albany 1*, induite par mutagenèse chimique au chlorambucil, reste énigmatique.

Le sujet présenté ici se scinde en trois parties distinctes à savoir: la localisation de la mutation *Reln^{Alb1}*, le séquençage du promoteur de *reeler* et enfin, la cartographie du locus *cdk5*.

- Dans le but de localiser la mutation *Reln^{Alb1}*, des analyses par RT-PCR et par Southern sur gels pulsés ont été effectuées. Elles montrent que l'expression du gène est diminuée chez le mutant mais que le message ne semble pas affecté par la mutation. Malheureusement, la localisation précise de la mutation n'a pas pu être établie.

- La technique de PCR-Vectorette nous a permis de définir une séquence promotrice du gène *reeler* de 494pb. Une analyse brève de cette séquence a été réalisée.

- Les lésions cérébrales des souris knock-out *Cdk5* (Ohshima *et al.*, 1995) présentent une similitude avec celles rencontrées chez les mutants *reeler*. La localisation chromosomique du gène *cdk5* prédit une certaine proximité entre ce gène et le gène *reeler*. La distance séparant ces deux locus a été mesurée et révèle que *cdk5* est le gène connu le plus proche de *reeler*.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 1997

Promoteur: Prof. A. Goffinet

Co-promoteur: V. de Bergeyck

Il est des moments dans la vie, où on est parfois amené à rechercher une aiguille dans une botte de foin et où le temps imparti pour le faire rend la mission pratiquement impossible. Si durant ces quatre mois, je n'ai pu que toucher la paille et avoir eu parfois l'illusion d'effleurer l'aiguille, l'aventure n'en était pas pour autant décevante et je m'en vais de ce pas remercier tous ceux qui y ont contribué.

Je remercie

- En premier lieu mes parents pour la confiance qu'ils me donnent et pour toutes ces heures consacrées simplement à veiller.

- Mr Goffinet de m'avoir soutenu, conseillé et bien sûr si gentiment accueilli dans un laboratoire tellement chargé d'inconnu.

- Béatrice, Bénédicte, Catherine, Christiane, Danielle, Daniel, Inès, Thanh et Vinciane pour leur disponibilité et surtout pour m'avoir fait découvrir, toujours dans la bonne humeur, le travail de recherche.

- Christina et Natalia, collègues du moment, pour leur perpétuelle bonne humeur et leurs encouragements.

- Enfin, pour sa patience et surtout sa présence, c'est à Anne-Pascale que s'arrêtent mes pensées.

Je remercie également Mesdames de Bergeyck, Tibor et Michiels ainsi que Monsieur Poumay pour avoir accepté de lire ce mémoire.

TABLE
DES
MATIERES

Table des matières

I. INTRODUCTION	1
I.1. AVANT-PROPOS.....	1
I.2. L'APPARITION DU SYSTEME NERVEUX.....	2
I.3. LE DEVELOPPEMENT DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL.....	2
I.4. LA MUTATION <i>REELER</i>	4
I.5. LE GENE <i>REELER</i>	5
I.5.1. Clonage du gène et caractérisation de la protéine.....	5
I.5.2. Expression et rôle du gène <i>reeler</i>	6
I.6. LES ALLELES DU GENE <i>REELER</i>	7
I.6.1. Caractéristique des allèles connus.....	8
I.6.1.1. L'allèle Edimbourg.....	8
I.6.1.2. L'allèle Orléans.....	8
I.6.1.3. L'allèle induit par transgénèse.....	8
I.6.1.4. L'allèle Albany 2.....	9
I.6.2. Albany 1 : l'allèle inconnu.....	10
I.7. ETUDE D'UN ALLELE.....	10
I.7.1. L'analyse du messager.....	10
I.7.1.1. Technique de RT-PCR.....	10
I.7.1.2. Single-Stranded Conformational Polymorphisms (SSCP).....	11
I.7.2. L'analyse du promoteur.....	11
I.7.2.1. Recherche d'îlots CpG.....	11
I.7.2.2. L'électrophorèse à champs pulsés.....	12
I.7.2.3. Clonage du promoteur.....	13
I.7.2.3.1. Le YAC AAT-C6.....	13
I.7.2.3.2. La purification d'un YAC.....	14
I.7.2.3.3. Le sous-clonage d'un YAC.....	14
I.8. LA CYCLINE-DEPENDANTE KINASE OU CDK5.....	15
I.8.1. Caractéristiques de Cdk5.....	15
I.8.2. Rôle de Cdk5.....	15
I.8.3. Définition de la distance génétique entre deux loci.....	16
I.8.4. Identification des recombinants.....	17
I.9. LE BUT DE CE MEMOIRE.....	19

II. MATERIEL ET METHODES	20
II.1. SOUCHE ET PLASMIDE.....	20
II.1.1. La souche bactérienne E.coli DH11 α	20
II.1.2. Les vecteurs.....	21
II.1.2.1. Le plasmide pBlueScript II SK (-).....	21
II.1.2.2. Le plasmide pCR TM II.....	21
II.2. MILIEUX DE CULTURE BACTERIENS.....	22
II.3. METHODES RELATIVES A L'ADN.....	23
II.3.1. Extraction et précipitation d'ARN total.....	23
II.3.2. La réaction de transcription inverse.....	25
II.3.3. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	27
II.3.4. La PCR-Vectorette.....	31
II.3.5. Purification d'ADN sur colonne WIZARD.....	32
II.3.6. Quantification de l'ADN.....	32
II.3.7. Extraction d'ADN au phénol-chlorophorme.....	33
II.3.8. Précipitation à l'éthanol.....	35
II.3.9. Préparation d'ADN génomique de haut poids moléculaire en bloc d'agarose.....	35
II.3.10. Les techniques d'électrophorèse.....	36
II.3.10.1. L'électrophorèse d'ADN en gel d'agarose.....	36
II.3.10.2. L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE).....	39
II.3.11. Analyse en Southern.....	39
II.3.12. Purification sur gel d'ADN de YAC.....	40
II.3.13. La réaction de restriction.....	42
II.3.13.1. Digestion d'ADN en solution.....	42
II.3.13.2. Digestion de blocs génomiques.....	43
II.3.14. La déphosphorylation d'un vecteur linéarisé.....	46
II.3.15. La réaction de ligation.....	47
II.3.16. La transformation de bactéries.....	48
II.3.16.1. Préparation de cellules électro-compétentes.....	48
II.3.16.2. L'électroporation.....	49
II.3.17. Technique de mini-prep.....	50
II.3.18. Le séquençage automatique.....	51
II.3.19. Mise en collection de clones d'intérêt.....	53
II.4. ETABLISSEMENT D'UNE CARTE GENETIQUE.....	54
II.4.1. Calcul du pourcentage de recombinaison.....	54

III. RESULTATS ET DISCUSSION	55
III.1. ANALYSE PAR RT-PCR DE L'ADNC DE <i>Reln^{Alb1}</i>	55
III.1.1. Choix des amorces.....	55
III.1.2. Préparation de l'ADNc.....	56
III.1.3. Amplification par PCR de l'ADNc.....	56
III.1.4. Modification des conditions PCR.....	57
III.1.5. Amplification par PCR nichée.....	58
III.2. ANALYSE DU GENE <i>Reln^{Alb1}</i> SUR ADN GENOMIQUE.....	59
III.2.1. Préparation d'ADN génomique en bloc d'agarose.....	60
III.2.2. Digestion de l'ADN génomique.....	61
III.2.3. Hybridation sur ADN génomique digéré.....	62
III.2.3.1. Définition des sondes.....	62
III.2.3.1.1. La sonde Sand1-Sand2.....	62
III.2.3.1.2. La sonde AAT/S.....	63
III.2.3.2. Hybridation proprement dite.....	63
III.2.3.2.1. Hybridation de la sonde Sand1-Sand2.....	64
III.2.3.2.2. Hybridation de la sonde AAT/S.....	64
III.3. CLONAGE DE L'EXTREMITÉ DISTALE DU YAC-C6.....	65
III.3.1. Purification du YAC AAT-C6.....	66
III.3.2. Sous-clonage du YAC AAT-C6 purifié.....	66
III.3.2.1. Restrictions.....	66
III.3.2.2. Ligation.....	67
III.3.2.3. Transformation et analyse des clones recombinants.....	67
III.4. AMPLIFICATION PAR PCR-VECTORETTE ET SEQUENÇAGE DU PROMOTEUR <i>REELER</i>	68
III.5. ESTIMATION DE LA DISTANCE GENETIQUE ENTRE LES LOCUS <i>REELER</i> ET <i>CDK5</i>	69
III.5.1. Préparation de la sonde.....	70
III.5.2. Southern et analyse.....	70
IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	71
IV.1. CONCLUSION.....	71
IV.2. PERSPECTIVES.....	75
V. BIBLIOGRAPHIE	77

INTRODUCTION

I. INTRODUCTION

I.1. AVANT-PROPOS

La compréhension des mécanismes à la base du développement du système nerveux central (SNC) est l'un des défis majeurs de la neurologie. La complexité de pareille entreprise requiert la mise en place de stratégies expérimentales rigoureuses et parmi celles-ci, la Génétique du Développement est l'une des plus en vogue. Cette dernière s'attache à définir les étapes génétiques nécessaires au développement, puis à cloner les gènes impliqués en vue d'élucider leur mécanisme d'action. Une telle approche est facilitée par l'existence de mutations neurologiques. Dans l'étude du développement du SNC des mammifères, la souris est l'organisme le plus étudié et ce, pour trois raisons essentielles. Premièrement, le génome de cet animal est relativement semblable au génome humain et la découverte d'un mécanisme du développement du SNC chez la souris trouve aisément son corollaire chez l'humain. Deuxièmement, l'obtention de mutants neurologiques chez cette espèce est possible par induction. En effet, l'utilisation d'agents mutagènes ou de techniques telles que la recombinaison homologue, l'insertion transgénique ou la mutagenèse aveugle aux rayons X permet d'acquérir un éventail assez large de mutants et ne suscite pas encore, pour l'instant, d'interdiction d'ordre éthique. Enfin, la reproduction de cette espèce est rapide et, ce qui n'est pas négligeable, ne nécessite pas une infrastructure excessivement coûteuse.

Parmi les mutations neurologiques de la souris, la mutation *reeler* est particulièrement intéressante. Elle semble être la seule à perturber le développement du cortex cérébral, la partie la plus évoluée du cerveau, principale composante chez l'homme des comportements et des performances cognitives. Afin de comprendre l'intérêt que représente le modèle *reeler*, nous rappellerons brièvement les principales étapes du développement cérébral chez les mammifères avant de décrire les anomalies de la souris *reeler*.

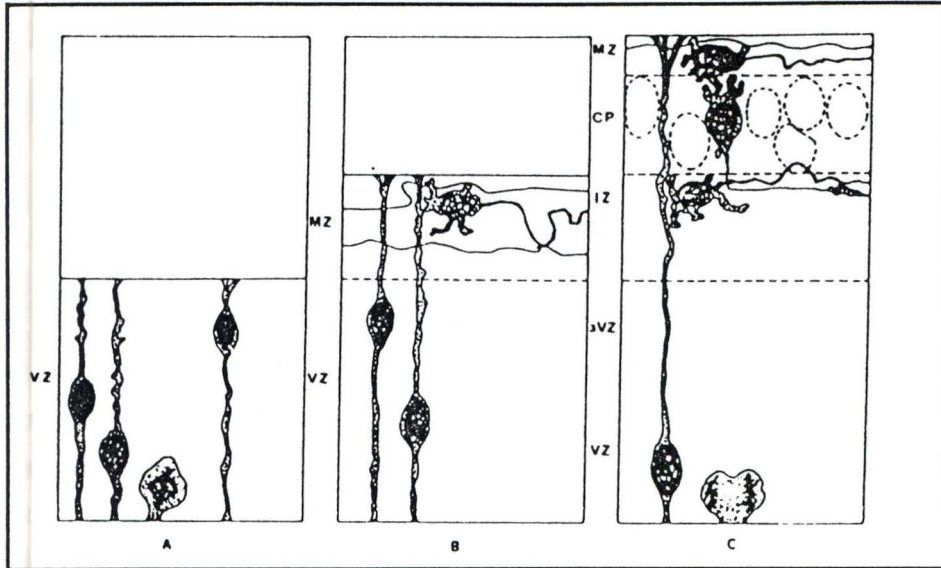


Figure I.3 : Schémas reprenant l'organisation précoce du télencéphale chez l'embryon de souris (d'après Goffinet, 1984).

Le schéma A correspond au neuroépithélium (jusqu'au 12ème jour), composé uniquement de cellules de type épithélial, en division continue. Les cellules en mitose sont arrondies le long des ventricules, alors que les cellules en interphase s'étendent à travers tout l'épithélium. Le schéma B représente l'organisation corticale primitive (12ème et 13ème jour), où les premiers neurones postmitotiques forment un réseau lâche à la partie externe du tissu. Le schéma C représente l'apparition de la plaque corticale, peuplée de cellules orientées radialement et tassées les unes contre les autres.

VZ: zone ventriculaire, sVZ: zone subventriculaire, MZ: zone marginale, IZ: zone intermédiaire, CP: plaque corticale.

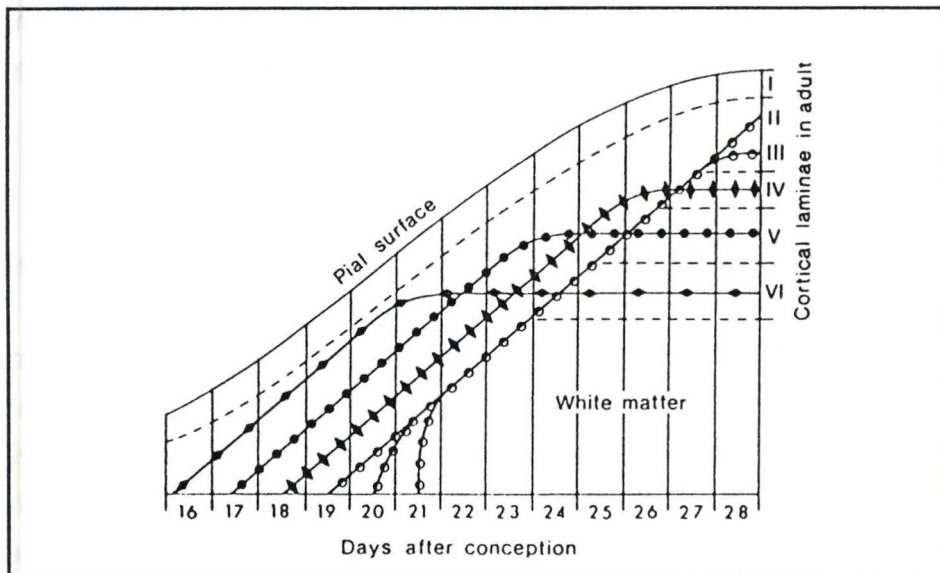


Figure I.4 : Développement en gradient "inside-out" des neurones dans la plaque corticale du cortex cérébral du rat (d'après Jacobson, 1991, page 421).

Le stade de développement est en abscisse et l'épaisseur du télencéphale en ordonnée. On voit que les premiers neurones engendrés sont destinés à la couche corticale la plus interne, alors que les plus jeunes se déposent à des niveaux de plus en plus superficiels.

une couche appelée zone marginale (MZ) (**Figure I.3.b**). Ces neurones précoces se différencient ensuite en neurones de Cajal-Retzius dans la zone marginale proprement dite, ainsi qu'en neurones polymorphes qui s'établissent entre la future plaque corticale (CP) et la zone intermédiaire (IZ) dans ce qu'on appelle la sous-plaque. Le 14^{ème} jour du développement est caractérisé par l'apparition de la plaque corticale, qui donne naissance à la grande majorité des neurones du cortex (**Figure I.3.c**).

En résumé, la prolifération cellulaire s'effectue dans les zones ventriculaires et subventriculaires, la zone intermédiaire est traversée par les cellules en migration et devient la future substance blanche. Au niveau télencéphalique, la zone marginale forme la couche I du cortex, alors que la plaque corticale se transforme en couches II à VIa selon un mécanisme rigoureux exposé ci-après. Enfin, la sous-plaque donne la couche VIb. Ces couches sont traversées par les prolongements cytoplasmiques des cellules neuroépithéliales.

Lors du développement du cortex, les précurseurs neuronaux doivent donc migrer depuis la zone ventriculaire jusqu'au niveau externe. Ces neurones immatures, devenus cellules postmitotiques, se déplacent à travers le tissu vers le futur cortex. Les cellules suivent des voies précises, une chronologie déterminée et s'arrêtent en des localisations bien définies.

Lorsque le réseau lâche, appelé aussi réseau primitif, est formé, les neurones suivants migrent pour former la plaque corticale. Ils traversent ainsi partiellement le réseau primitif divisant ce dernier en deux zones bien distinctes: la couche marginale peuplée des cellules de Cajal-Retzius et la sous-plaque où l'on retrouve les neurones polymorphes. La plaque corticale est formée de cinq couches, les couches II à VIa, qui apparaissent les unes après les autres selon un ordre très particulier. En effet, les cellules les plus jeunes migrent à travers la plaque corticale pour former des couches progressivement plus superficielles et plus proches de la zone marginale. Ce phénomène se traduit par le fait que les neurones de la couche II sont plus jeunes que ceux de la couche III, eux-mêmes plus jeunes que ceux de la couche IV, etc... Ce mécanisme, généralement appelé "gradient corticogénétique inside-out", est typique du développement cortical de tous les mammifères (**Figure I.4**).

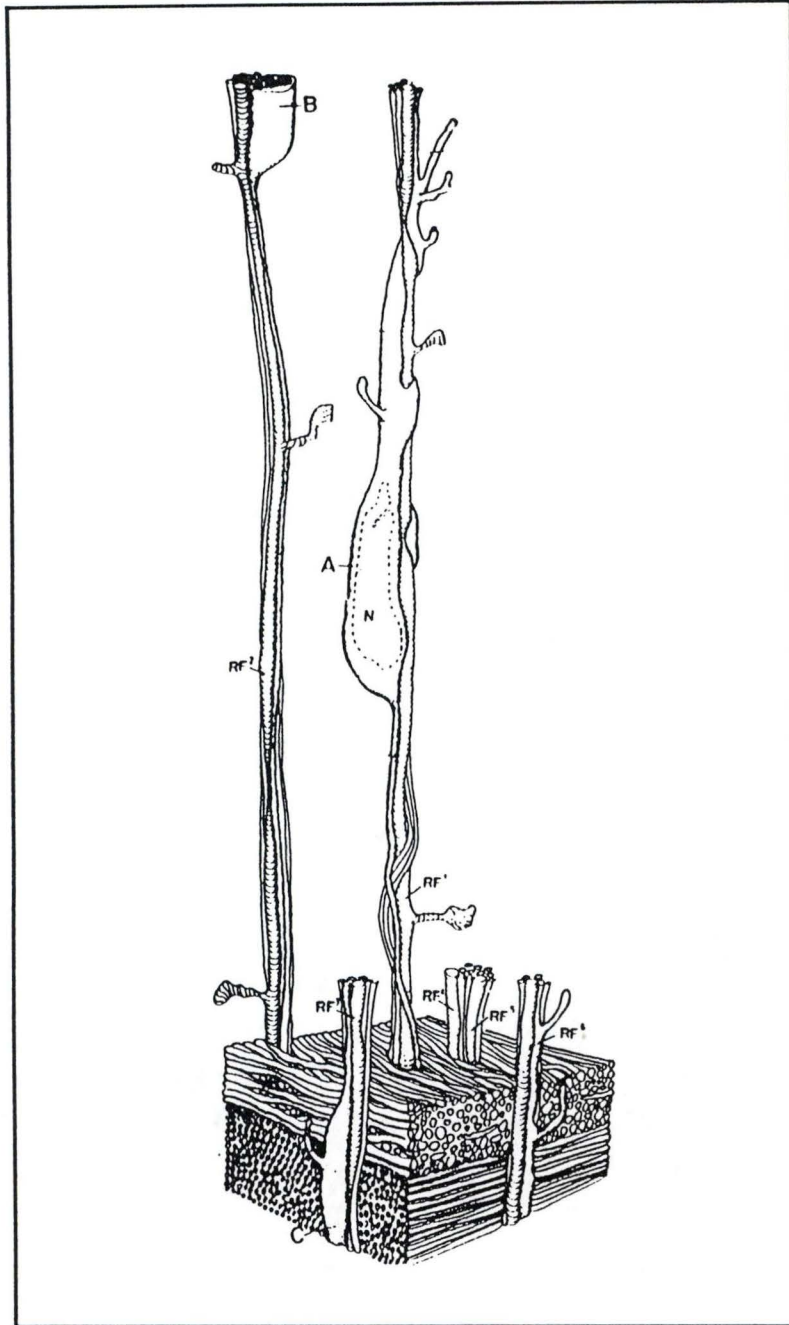


Figure I.5 : Illustration de la migration neuronale le long des fibres gliales radiales, à travers la zone intermédiaire (IZ sur la figure I.3). La IZ contient des plexus d'axones horizontaux (partie inférieure du dessin). Elle est traversée radialement par les prolongements gliaux radiaux (RF). Les neurones postmitotiques immatures (A, B, C) migrent en utilisant ces fibres radiales comme guides avant de gagner leur destination dans le cortex sus-jacent.

Une fois arrivés à destination, les neurones embryonnaires s'organisent en patterns cellulaires précis, nommés "architectonique primaire", et se différencient.

Les mécanismes qui contrôlent la migration cellulaire au sein du cortex ne sont pas encore connus. Cependant, des interactions cellulaires, de types neurones-neurones ou neurones-cellules gliales, jouent un rôle important dans la migration des neurones. Les recherches, notamment de Rakic (1990), ont permis de distinguer deux types de migrations. Dans la majeure partie des cas, les cellules postmitotiques quittent la zone ventriculaire et traversent le parenchyme vers un point situé plus ou moins en face de leur origine. Elles sont guidées par les prolongements radiaires des éléments neuroépithéliaux ou, au stade plus avancé, par les prolongements radiaires des cellules gliales extrêmement allongés qui s'étendent depuis la zone ventriculaire jusqu'à la zone marginale. Cette migration est dite "radiale" ou "gliophile" (Figure L5). Plus rarement, la migration est "tangentielle" ou "neurophile"; les cellules migrent parallèlement à la surface cérébrale perpendiculairement aux prolongements gliaux radiaires. Les interactions des cellules avec les protéines de la matrice extracellulaire sont également à prendre en considération. En effet, Chuong *et al.* (1987) et O'Shea *et al.* (1990) ont montré que des anticorps dirigés contre des protéines de la matrice extracellulaire (ECM), la tenascine et la thrombospondine, peuvent également perturber la migration cellulaire. Aussi, un dysfonctionnement de ces interactions (cellules-cellules et cellules-ECM) pourrait expliquer l'apparition d'anomalies.

I.4. LA MUTATION REELER

Reeler (Reln) est une mutation autosomique récessive localisée sur le chromosome 5 de la souris (Falconer, 1952) et qui fut isolée pour la première fois, en 1948, par Falconer à Edimbourg (Falconer, 1951). Les animaux homozygotes sont reconnus vers le 15^{ème} jour, après la naissance, par la présence d'une ataxie (absence de coordinations des mouvements) et de tremblements dus à une anomalie du système nerveux central (SNC). Des études histologiques révèlent un développement anormal du cortex cérébral et une atrophie cérébelleuse responsable de l'ataxie.

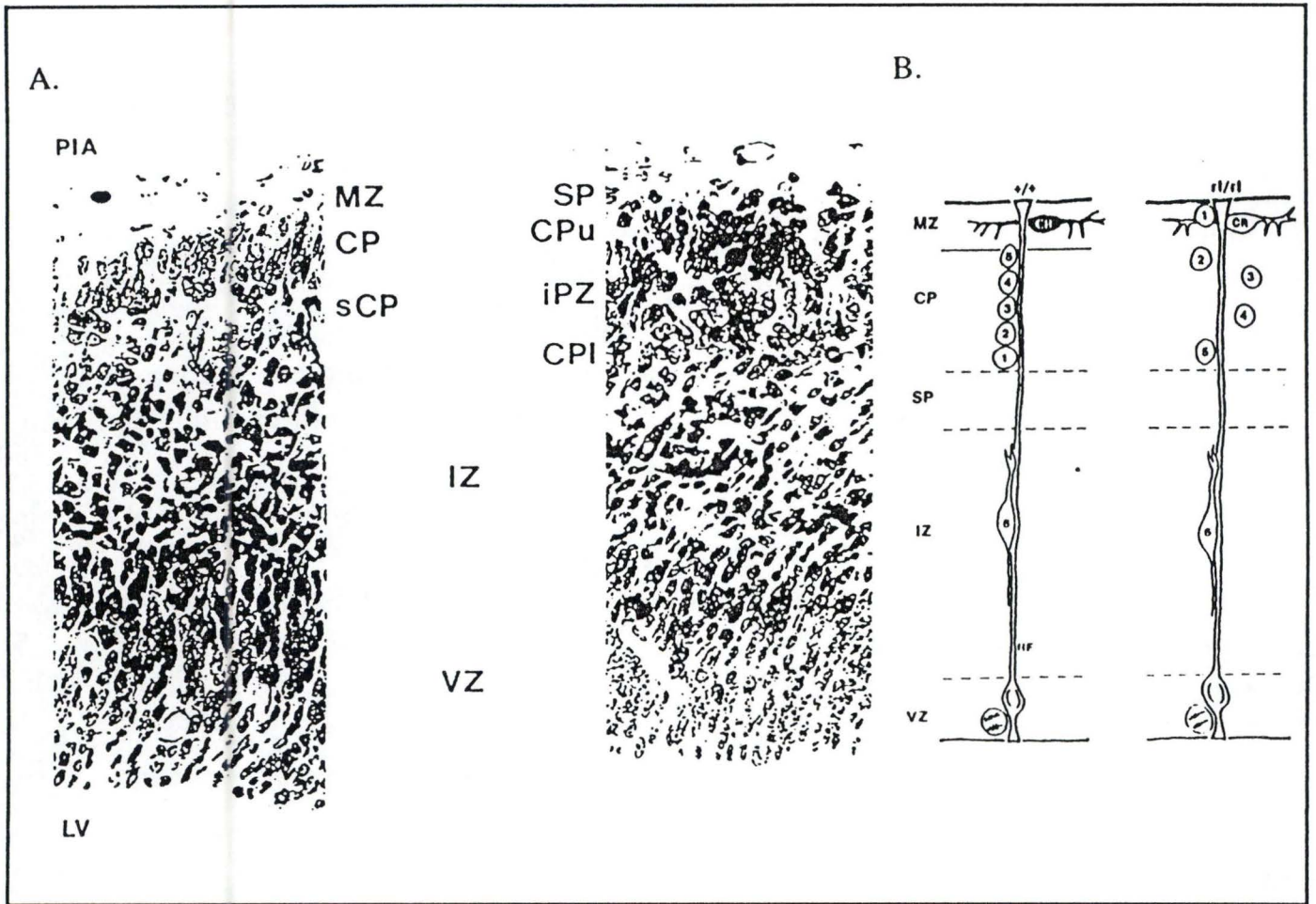


Figure I.6 : (A) Coupes frontales du mur télencéphalique de l'embryon de souris normale (a) et *reeler* (b), au 14ème jour du développement (E14) (Godfraind *et al.*, 1988).

(B) Dessin représentant la migration neuronale dans un cortex normal (+/+) et dans un cortex *reeler* (rl/rl) (Rakic et Caviness, 1995)

On remarque que la plaque corticale, bien organisée chez l'embryon normal, est moins bien définie chez l'embryon *reeler*. En effet, le gradient inside-out de l'embryon normal est un gradient outside-in chez l'embryon mutant. De plus, chez ce dernier, la zone marginale est absente.

PIA = surface piaie; VZ = zone ventriculaire; MZ = zone marginale; IZ = zone intermédiaire; CP = plaque corticale; LV = ventricule latéral; sCP = plaque sous-corticale; CPI = partie inférieure de la plaque corticale; iPZ = zone plexiforme intermédiaire; CPu = partie supérieure de la plaque corticale; SP = superplaque; RF = fibres gliales radiaires; CR = cellules de Cajal-Retzius.

La mutation *reeler* affecte donc une étape importante du développement du cerveau chez les mammifères et est un excellent modèle d'étude du développement cérébral.

Chez l'embryon *reeler*, les neurones sont engendrés en nombre, et selon une chronologie normale, et migrent le long des fibres gliales radiales comme chez les embryons normaux. Cependant, arrivés près de leur destination, les neurones en migration se comportent comme s'ils avaient perdu la capacité de s'ordonner selon les agencements architectoniques normaux. En effet, lorsque la plaque corticale se met en place, on ne retrouve pas le gradient inside-out typique de tous les mammifères, où les neurones formés en dernier lieu migrent vers la surface corticale en traversant les couches déjà formées. Au contraire, chez les souris mutantes, les neurones qui naissent en dernier migrent moins loin que les précédents, créant un gradient outside-in, de sorte que les souris *reeler* possèdent une lamination corticale plus ou moins inversée (Figure I.6).

L'ensemble des observations morphologiques ont conduit à l'hypothèse selon laquelle la mutation *reeler* affecterait la capacité des neurones à se stabiliser en fin de migration (Goffinet, 1984).

I.5. LE GENE REELER

I.5.1. CLONAGE DU GENE ET CARACTERISATION DE LA PROTEINE

Depuis la découverte du premier allèle de la mutation, nommé *Reln*, cinq autres allèles ont été isolés. Deux de ces allèles sont dus à des mutations spontanées: l'allèle *Orléan*, *Reln^{Orl}*, et un allèle identifié au Jackson Laboratory mais non conservé. Deux autres allèles ont été produits par mutagenèse au chlorambucil: *reeler Albany 1*, *Reln^{Alb1}*, étudié dans le cadre de ce mémoire, et *reeler Albany 2*, *Reln^{Alb2}*, (Flaherty *et al.*,1992) caractérisé récemment (Royaux *et al.*,1997).

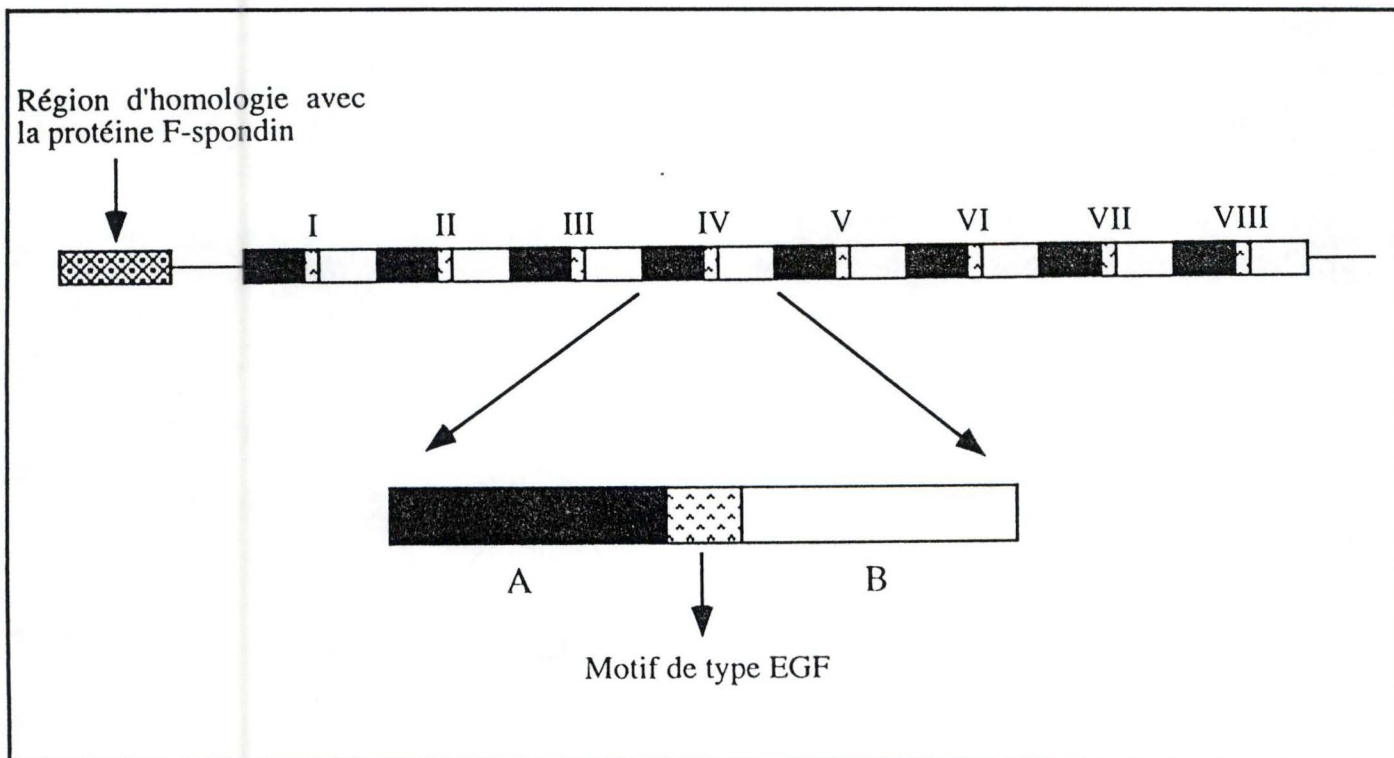


Figure I.7 : Représentation schématique de la structure de la protéine Reelin (D'Arcangelo et al., 1995)

Enfin, le sixième allèle de *reeler* a été produit par insertion d'un transgène et est noté *ReIn^{Tg}* (Miao *et al.*, 1994). C'est à partir de cette insertion que fut cloné, en 1995, le gène *reeler* (D'Arcangelo *et al.*, 1995).

Le gène *reeler* code pour un message d'environ 12 Kb, avec une phase ouverte de lecture de 10383 pb, correspondant à 3461 acides aminés. La protéine Reelin a une masse estimée de 388 KDa. D'après la carte de restriction, établie en 1995 (Bar *et al.*, 1995), le gène s'étend sur environ 450 Kb. Aussi, le nombre élevé des mutations qui ont affecté Reelin peut probablement se comprendre en raison de cette grande taille.

La séquence de la protéine (Figure I.7), déduite du cDNA, débute par un segment hydrophobe, typique d'un peptide signal. Ensuite, on trouve successivement un segment similaire (~25%) à la F-spondine, une séquence anonyme, puis une série de 8 répétitions de 350 à 390 résidus. Chacune de ces répétitions est composée de deux domaines de taille à peu près identique, séparés par un motif EGF-like (Epidermal Growth Factor -like) similaire à ceux de la tenascine et de l'intégrine β . La protéine se termine par un court segment riche en arginine et donc positivement chargé. À part les similitudes mentionnées, la Reelin ne ressemble à aucune protéine décrite. D'après D'Arcangelo *et al.* (1995), la protéine Reelin possède des caractéristiques d'une protéine sécrétée et incorporée dans la matrice extracellulaire.

I.5.2. EXPRESSION ET ROLE DU GÈNE REELER

Les premières analyses par hybridation *in situ*, permettant la mise en évidence du message de la Reelin, démontrent une expression extrêmement forte dans des cellules localisées à la périphérie de la zone marginale du télencéphale embryonnaire, qui correspondent aux neurones de Cajal-Retzius (D'Arcangelo *et al.*, 1995). Cependant, aucun signal significatif n'est détecté dans la plaque corticale embryonnaire, ce qui est quelque part surprenant. Ces résultats font apparaître un paradoxe.

En effet, les cellules qui expriment le transcrit et probablement la protéine Reelin, telles que les cellules de Cajal-Retzius, sont disposées à peu près normalement dans le cerveau embryonnaire *reeler*, alors que d'autres éléments, en particulier les cellules de la plaque corticale, qui sont très anormalement ordonnées chez le mutant, n'expriment pas le gène *reeler*.

Une solution évidente consiste à postuler une action indirecte des cellules de Cajal-Retzius sur le développement de la plaque corticale. En d'autres termes, les neurones de Cajal-Retzius, via la sécrétion de Reelin dans la matrice extracellulaire locale de la zone marginale, influenceraient le développement du cortex. La Reelin agirait sur les neurones de la plaque corticale et/ou sur l'écheveau des fibres gliales radiaires qui guident la migration neuronale. Cette protéine pourrait ainsi aider les neurones en fin de migration à s'ordonner en une structure correcte, en stabilisant des interactions de type neurone-neurone et neurone-matrice.

I.6. LES ALLELES DU GENE REELER

Comme nous l'avons montré aux points précédents, *reeler* est un gène clé du développement cérébral chez l'embryon. Les recherches effectuées jusqu'ici ont mené à l'isolement et à la caractérisation presque complète du gène. Cependant, aucune anomalie biochimique significative n'a pu être détectée chez les souris *reeler* et les mécanismes à la base du phénotype *reeler* sont encore inconnus.

L'étude approfondie du gène et de la protéine est donc indispensable et fait appel à de nouvelles approches. Parmi celles-ci, la caractérisation des différents allèles du gène permet de déterminer des zones importantes pour la fonction de la protéine.

Les travaux effectués jusqu'à présent ont permis de caractériser 4 des 5 allèles existants à savoir: *Reln*, *Reln^{Orl}*, *Reln^{Tg}*, et *Reln^{Alb2}*. Seule la mutation *Albany 1*, notée *Reln^{Alb1}*, reste énigmatique.

I.6.1. CARACTERISTIQUES DES ALLELES CONNUS

I.6.1.1. L'allèle Edimbourg

Cet allèle, noté *Reln*, est dû à une délétion génomique de 150 Kb affectant la majeure partie du messenger reelin qui est délété en sa partie 3'. Le taux de survie des homozygotes *reeler Edimbourg* est très faible, les mutants mourant généralement vers 3 semaines.

I.6.1.2. L'allèle Orléans

L'allèle *Orléans* est caractérisé par la perte, dans l'ARNm de la Reelin, d'un exon de 220 b codant pour une zone du domaine VIII de la protéine. L'analyse de l'ADN génomique révèle une insertion L1 responsable de cette mutation spontanée (Takahara *et al.*, 1996). Les homozygotes *reeler Orléans* sont moins affectés que les souris homozygotes pour l'allèle *Edimbourg*, avec un taux de viabilité de l'ordre de 50 à 70 %.

I.6.1.3. L'allèle induit par transgénèse

L'équipe du Dr. T.Curran (Roche Institute, Nutley, USA) a produit fortuitement le phénotype *reeler* par insertion d'un transgène, *supfos (sf)* dans le gène *reeler* (Miao *et al.*, 1994). Les descendants homozygotes d'une des quatre lignées de souris transgéniques exprimant *sf* présentaient des troubles moteurs importants.

Les auteurs ont vérifié que ces troubles n'étaient pas liés à l'expression du transgène. Des études histologiques ont montré que le cervelet des souris *sf/sf* de la lignée en question est de taille réduite et ne possède pas une foliation normale. Les cervelets de souris *sf/sf* de cette lignée transgénique sont identiques aux cervelets *rl/rl*. Des tests de complémentation ont montré que la mutation induite par l'insertion de *sf* est allélique de *reeler* (allèle *Edimbourg*). Cette mutation est notée *Reln^{Tg}*. L'ADN flanquant le site d'insertion du transgène a été isolé. La portion d'ADN localisée en 3' du transgène a été localisée par cartographie génétique sur le chromosome 3 de souris. La portion d'ADN localisée en 5' du transgène (*D5Gmr1*) a été cartographiée sur le chromosome 5, dans la région contenant *reeler*.

I.6.1.4 L'allèle Albany 2

Albany 2, tout comme *Albany 1*, est un allèle induit par mutagenèse au chlorambucil (Flaherty *et al.*, 1992). Le chlorambucil est un agent mutagène actif sur la lignée germinale mâle postméiotique, plus spécialement sur les spermatozoïdes. Il induit des réarrangements chromosomiques tels que des délétions ou, plus rarement, des translocations et des inversions (Russel *et al.*, 1989; pour une revue, voir Rinchik *et al.*, 1993). Les délétions peuvent être suffisamment grandes pour être visibles au microscope, ou plus subtiles à détecter, de l'ordre de quelques centaines de kilobases ou moins. Loin de toute attente, la mutation *Albany 2*, caractérisée par Royaux *et al.*, (1997), est due à l'insertion d'un élément IAP (intracisternal A-particle) dans un exon de 85 nucléotides du gène *reeler*. Cette insertion induit, lors de la transcription, la perte de cet exon et une diminution importante de la concentration de l'ARNm de Reelin. A notre connaissance, c'est le premier exemple d'une insertion d'un élément IAP suite à une mutagenèse chimique.

I.6.2. ALBANY 1: L'ALLELE INCONNU

Comme mentionné précédemment, l'allèle *Albany 1* fut induit par mutagenèse au chlorambucil. On s'attend donc, en tenant compte des propriétés de ce mutagène, à découvrir une délétion relativement importante affectant le gène *reeler*. Toutefois, au vu des diverses exceptions rencontrées, dont *Albany 2* est un exemple, nous ne pouvons exclure d'autres formes de mutations.

I.7. ETUDE D'UN ALLELE

Lors de la caractérisation d'un allèle, différentes approches peuvent être employées afin de, premièrement, localiser la mutation et, deuxièmement, d'en établir la nature.

I.7.1. L'ANALYSE DU MESSAGER

I.7.1.1. Technique de RT-PCR

L'étude comparée des messagers de l'allèle mutant et de l'allèle sauvage est, souvent, la première approche effectuée. Elle fait appel à la technique de RT-PCR. Après rétrotranscription des ARNm, un fragment de l'ADNc de chacun des deux allèles est amplifié au moyen des mêmes amorces spécifiques. Après migration sur gel, le produit d'amplification de chacun des allèles est révélé par coloration au Bromure d'Ethidium. Une différence de migration, ou l'absence du produit d'amplification de l'allèle muté, révèle l'existence de la mutation à cet endroit. Si ce n'est pas le cas, la taille des deux fragments étant la même, le procédé est répété pour d'autres fragments avec, bien sûr, d'autres amorces spécifiques.

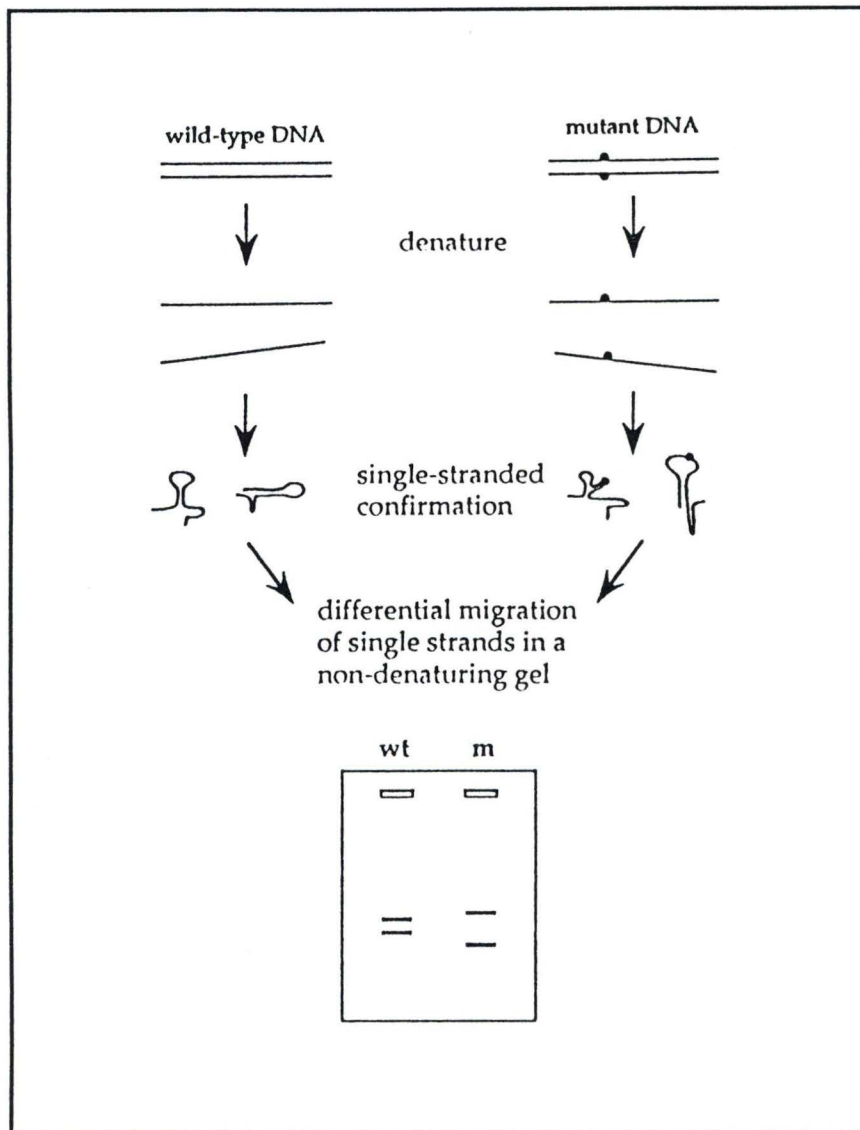


Figure I.8 : Principe de l'analyse en SSCP

L'ADN à tester est amplifié par PCR en utilisant deux amorces marquées radioactivement. La partie supérieure du schéma représente les produits d'amplification obtenus au départ d'ADN normal (wild-type, wt) et mutant (m). L'ADN mutant contient une mutation ponctuelle représentée par un point.

Après amplification par PCR, l'ADN est dénaturé et déposé sur un gel non-dénaturant. Les fragments d'ADN simple-brin adoptent alors une structure tri-dimensionnelle qui dépend de leur structure primaire. Si une différence existe (mutation ou polymorphisme) entre deux ADN (ou deux brins d'un même ADN), la structure tri-dimensionnelle des fragments d'ADN simple brin sera différente, ce qui se traduit par une mobilité différente lors de l'électrophorèse.

I.7.1.2. Single-Stranded Conformational Polymorphisms (SSCP)

Lorsqu'une analyse par RT-PCR ne révèle aucune anomalie, on peut se demander si la mutation n'est pas telle qu'il s'avère impossible de la détecter par cette technique. En effet, une mutation ponctuelle, n'affectant qu'un nucléotide, ne modifie pas suffisamment la taille d'un fragment d'ADNc pour être décelable. A cette fin, la technique de "Single-Stranded Conformational Polymorphisms" (SSCP; Orita *et al.*, 1989) permet de détecter des différences d'une base entre deux fragments d'ADN. Elle détecte 70-90 % des mutations pour des fragments de 200 pb ou moins. La sensibilité de la méthode décroît avec l'augmentation de la taille du produit à analyser.

Cette approche est donc utile pour détecter des polymorphismes ou pour mettre en évidence une mutation ponctuelle entre un ADN mutant et un ADN normal. Cependant, il est à noter que dans le cas d'un mutant induit par mutagenèse au chlorambucil, l'existence d'une telle mutation est relativement invraisemblable. Le principe de cette technique est illustré à la **figure I.8**.

I.7.2. L'ANALYSE DU PROMOTEUR

Lorsqu'il apparaît que la mutation n'affecte pas directement le messager, les investigations se tournent alors vers le promoteur du gène. En effet, une défectuosité au sein de ce dernier ou de toute séquence "enhancer", pouvant même se situer dans les premiers introns, peut réduire fortement, voire stopper l'expression du gène.

I.7.2.1. Recherche d' îlots CpG

Les îlots CpG (ou HTF pour "HpaII tiny fragments") sont définis comme des régions d'ADN de 500 pb à 2 Kb qui ont un pourcentage de guanine + cytosine (G+C) de plus de 50 % et une grande quantité de doublets CpG non méthylés, alors que le reste du génome est caractérisé par un pourcentage de G+C plus faible

Group	Number of CpGs	G + C content	Enzyme ^a	Site	Number of sites per island ^b		Estimated percentage of all sites in islands ^c	Uses and comments
					Expected	Observed		
I	2	8/8	<i>NotI</i>	GCGGCCGC	0.14	0.35	93	Nearly all genomic sites are in islands, but only a minority of islands have a site. Large size of fragments is useful for extending PFGE maps and detection of chromosome breakpoints
			<i>AscI</i>	GGCGCGCC	0.14	0.27		
II	2	6/6	<i>BssIII</i>	GCGCGC	1.68	2.11	76	Most genomic sites are in islands; nonisland sites are often methylated in genomic DNA. Nearly every island should have a site for one of these enzymes. Clusters of these sites are the best indication of the presence of a CpG island
			<i>EagI</i>	CGGCCG	1.68	1.70		
			<i>SstII/SacII</i>	CCGCGG	1.68	1.89		
III	1	6/6	<i>NaeI</i>	GCCGGC	1.68	1.14	41	As for group II, nearly every island will have a site for one of these, but there are many more nonisland genomic sites that can be subject to variable methylation. Therefore, these enzymes are more useful for mapping islands in genomic DNA than in cloned DNA
			<i>NarI</i>	GGCGCC	1.68	1.65		
			<i>SmaI</i>	CCCGGG	1.68	2.14		
IV	2	4/6	<i>MluI</i>	ACGCGT	0.42	0.03	4	Frequency of sites in islands is lower than expected. Most sites are not in islands and are therefore subject to variable methylation. Thus these enzymes are not so useful for defining the position of islands or chromosome breakpoints, but are very useful for establishing physical linkage of markers
			<i>NruI</i>	TCGCGA	0.42	0.11		
			<i>PvuI</i>	CGATCG	0.42	0.08		
			<i>SplI</i>	CGTACG	0.42	0.03		
V ^d	1	4/6	<i>SalI</i>	GTCGAC	0.42	0.14	5	Uses as for group IV
VI	1	4/4	<i>XhoI</i>	CTCGAG	0.42	0.43	26	Fragment sizes too small to be useful for PFGE analysis. Many interisland sites. Used for fine mapping of CpG islands
			<i>HhaI</i>	GCGC	46.2	21.86		
			<i>HpaII</i>	CCGG	46.2	20.35		

^a All enzymes listed are blocked by methylation.

^b Assumes that the average size of islands is 1.4 kb, based on a survey of 37 human CpG islands. This may be an underestimate because many of the islands in Genbank may not be complete.

^c Based on the observed average frequency of island sites for the group. Assumptions about base composition of mammalian genomes are those laid out in W. R. A. Brown and A. P. Bird, *Nature (London)* 322, 477 (1986).

^d There are many enzymes in this group; only the two most commonly used are listed.

Table I.1 : Les différents groupes d'enzymes de restriction utilisés dans la cartographie des génomes de mammifères.

(environ 40 %) et par la méthylation de la cytosine en 5' dans la plupart des doublets CpG (Lindsay et Bird, 1987). Une étude publiée par Larsen *et al.* (1992) a montré que parmi 375 gènes répertoriés dans GenBank, tous les gènes à expression ubiquiste, et environ 40 % des gènes à expression tissulaire plus restreinte contiennent un îlot CpG. Ces îlots couvrent en général la région du promoteur du gène et de un à trois exons. Ils sont plus rarement localisés à l'extrémité 3' ou à l'intérieur même des séquences transcrites. Dans une étude similaire, Antequera et Bird (1993) ont estimé que 55,9 % des gènes humains et 46,9 % des gènes de souris sont associés à des îlots CpG. Ces données montrent que les îlots CpG sont de bons marqueurs pour identifier des gènes. Puisque ces îlots contiennent une forte densité de dinucléotides CpG non méthylés, ils peuvent être détectés en utilisant des enzymes de restriction sensibles à la méthylation et contenant le dinucléotide CpG dans leur séquence.

La **table I.1.** reprend les enzymes de restriction les plus utiles pour la détection des îlots CpG (d'après Bickmore et Bird, 1992). Le groupement de plusieurs sites pour ces enzymes dans une courte région d'ADN (quelques Kb) est une bonne indication de la présence d'un îlot. En pratique, les îlots sont identifiés en construisant une carte de restriction de la région étudiée, analysée par électrophorèse à champs pulsés. La présence d'un îlot CpG à proximité d'une sonde est détectée par le fait que cette sonde reconnaît des fragments de même taille après digestion de l'ADN génomique par des enzymes différents, en particulier ceux cités dans la **table I.1.**

I.7.2.2. L'électrophorèse à champs pulsés

L'électrophorèse en agarose ou polyacrylamide classique permet de séparer des fragments d'ADN grâce au rôle de tamis sur gel. Sous l'action du champ électrique, certaines molécules d'ADN migrent au travers de tous les pores du gel alors que les molécules plus grandes ne peuvent migrer qu'à travers une partie des pores, et mettent donc plus de temps pour effectuer le même trajet. Les molécules d'ADN de taille supérieure à 20 Kb sont plus grandes que tous les pores de résolution du gel.

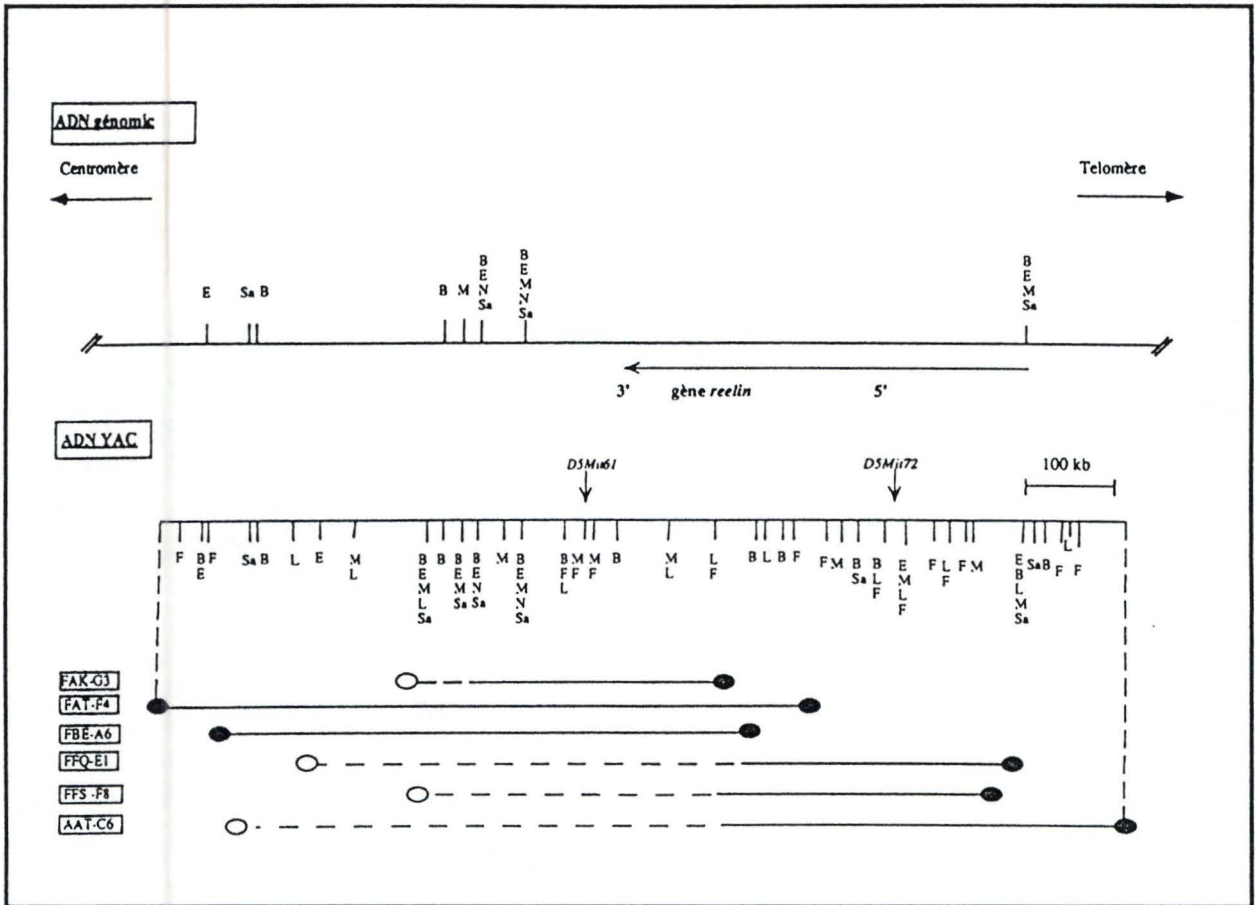


Figure I.9 : Carte de restriction de la région génomique contenant *reeler* et du contig de YAC établie par Bar et al. (1995)

Sous l'action du champ électrique, ces molécules modifient leur conformation de manière à migrer en bloc dans les interstices les plus grands. Ces fragments d'ADN migrent tous à la même vitesse, indépendamment de leur taille: il n'y a plus de séparation. L'électrophorèse à champs pulsés a résolu le problème en modifiant périodiquement la direction du champ électrique appliqué. A chaque changement d'orientation du champ électrique, la molécule doit changer sa conformation et se réorienter parallèlement au champ. Une molécule d'ADN très longue (1000 Kb) a besoin de beaucoup de temps pour se réorienter; elle dispose donc de peu de temps pour migrer. Une molécule plus petite (100 Kb) a besoin de peu de temps pour se réorienter et consacre la plupart du temps à migrer.

Le système le plus utilisé est le système CHEF (contour clamped homogenous field) (Chu *et al.*,1986). Les électrodes sont disposées régulièrement dans un circuit hexagonal. Le champ électrique est uniforme dans l'ensemble du gel et son orientation est périodiquement modifiée de 120°.

Utilisant l'électrophorèse à champs pulsés et tenant compte des caractéristiques des îlots CpG, Bar *et al.*(1995) ont réussi à établir une carte de restriction de la région génomique contenant *reeler*. De plus, suite au clonage, sous forme de chromosomes artificiels de levure ou YAC (yeast artificial chromosome), de fragments d'ADN de grande taille contenant le gène *reeler*, la carte de restriction de ce contig de YAC (figure I.9) a pu être établie.

I.7.2.3. Clonage du promoteur

I.7.2.3.1. Le YAC AAT-C6

Isolé par Bar *et al.*(1995), le YAC AAT-C6 a une taille avoisinant les 1000 Kb et contient le microsatellite et marqueur D5Mit72. L'extrémité gauche de ce YAC est localisée en position distale par rapport à *reeler* et est le seul élément du contig contenant une information génétique suffisante en amont du gène susceptible de

nous renseigner sur le promoteur. Le sous-clonage de cette extrémité distale (environ 100 Kb) contenant le promoteur de *reeler* serait une étape importante pour l'analyse de ce dernier.

I.7.2.3.2. La purification d'un YAC

Extraire et purifier un fragment d'ADN de grande taille, pouvant aller jusqu'à 2000 Kb, n'est pas chose aisée. Les risques de dégrader l'ADN sont énormes et les conditions pour mener à bien cette opération sont également très contraignantes. L'exposition d'un gel aux UV peut être, par exemple, responsable de cassures dans l'ADN, ou encore la faible concentration du YAC au sein des chromosomes de levure rend souvent l'optimisation de son extraction bien difficile. Le protocole (mentionné dans Matériel et méthodes) qui fut mis au point par Schedl *et al.*(1993) et amélioré par Maule *et al.*(1994) combine les avantages de ne pas exposer l'ADN du gel aux UV et de concentrer l'ADN dans un minimum d'agarose, tout en prenant garde de travailler dans des conditions les plus stériles possibles, ce qui résulte en un ADN de meilleure qualité.

I.7.2.3.3. Le sous-clonage d'un YAC

Après purification du YAC, ce dernier est digéré à l'aide d'une enzyme de restriction ayant une fréquence de digestion élevée. Les divers fragments obtenus sont ensuite insérés dans un vecteur. Après transformation, les colonies possédant les inserts de YAC sont sélectionnées.

I.8. LA CYCLINE-DEPENDANTE KINASE 5 OU Cdk5

I.8.1. CARACTERISTIQUES DE Cdk5

Chez tous les eucaryotes, le cycle de division cellulaire est contrôlé par une famille de protéines kinases, les cycline-dépendantes kinases, et leurs sous-unités régulatrices, les cyclines.

Toutefois, clonée par Hellmich *et al.*(1992), la cycline-dépendante kinase 5 (Cdk5), appelée également cdc2-like kinase, semble bien faire exception à cette règle. Cdk5 est détectée lors du développement du cerveau et, chose étonnante pour une protéine sensée réguler la division cellulaire, uniquement dans les neurones postmitotiques. L'activité de cette protéine est décelée lors de la différenciation des cellules neuronales. Cdk5 possède 58 % d'identité avec la séquence d'acides aminés de Cdk1 de souris et 61 % d'identité avec la protéine Cdk2 humaine (Hellmich *et al.*,1992).

I.8.2. ROLE DE Cdk5

Si rien ne laisse penser que Cdk5 intervient dans la régulation du cycle cellulaire, les études réalisées, entre autres, par Sun *et al.*(1996) ont mis en évidence le rôle particulier de cette kinase. En effet, Cdk5 phosphoryle les motifs répétés Lysine-Sérine-Proline (KSP) des sous-unités de masse moléculaire moyenne (NF-M) et lourde (NF-H) des neurofilaments. Ces phosphorylations stabilisent le réseau de neurofilaments dans l'axone et, par voie de conséquence, affectent le transport axonal ainsi que la vitesse de conduction dans les neurones. Ces résultats, ainsi que ceux obtenus par Tsai *et al.*(1993), suggèrent que Cdk5 est une molécule nécessaire à la différenciation neuronale et joue un rôle critique dans l'organisation du cytosquelette neuronal.

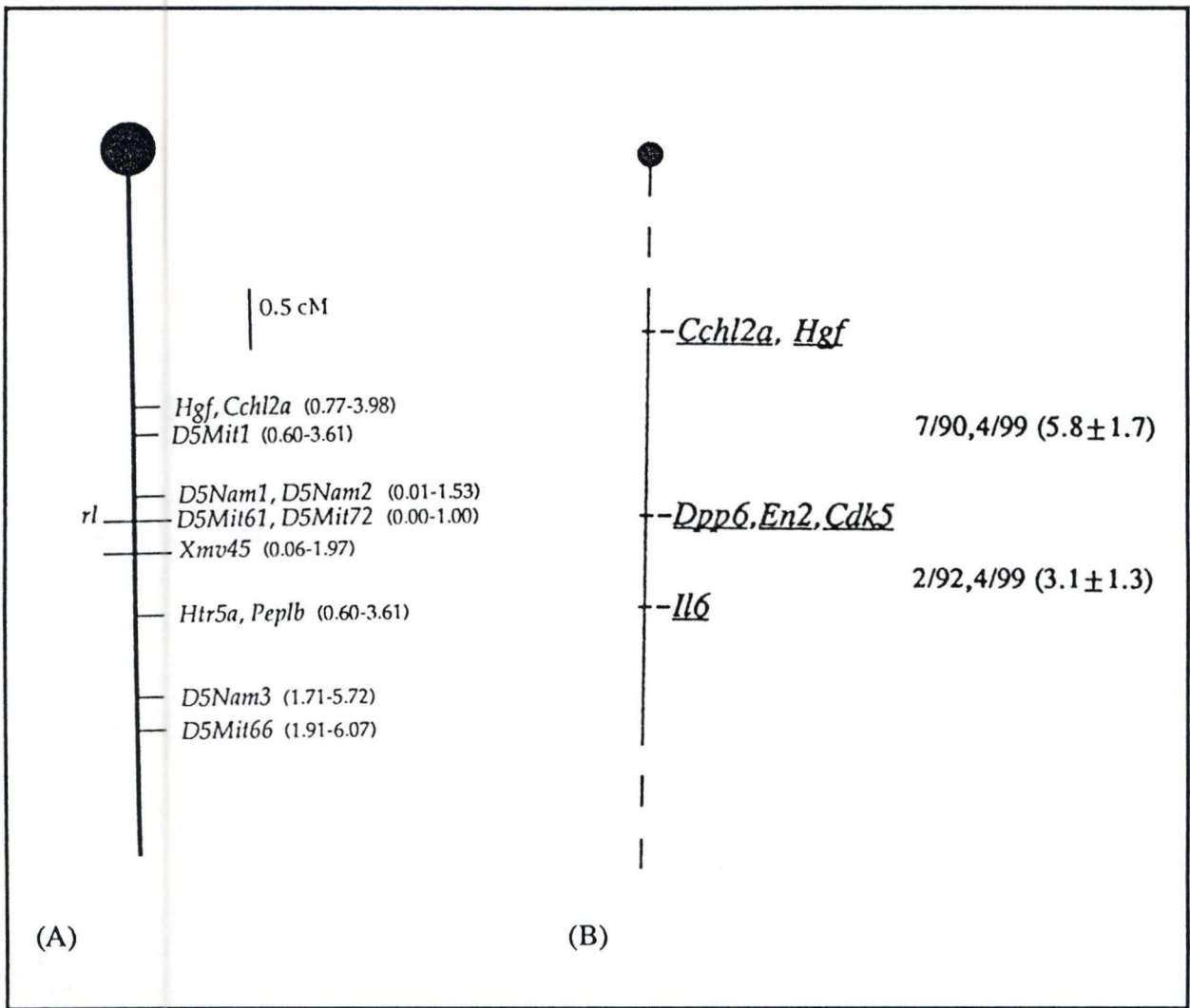


Figure I.10 : (A) Carte génétique de la partie proximale du chromosome 5 de souris contenant *reeler* (Beckers *et al.*, 1994).

(B) Carte génétique de la partie proximale du chromosome 5 de souris contenant *cdk5* (Ohshima *et al.*, 1995).

La production de souris knock-out pour le gène *cdk5*, localisé sur le chromosome 5 de souris, par Ohshima *et al.*(1996) a permis une analyse encore plus poussée de la fonction de la protéine. Alors que le développement des souris hétérozygotes *cdk5* (+ / -) est normal, il n'en est pas de même pour les individus homozygotes *cdk5* (- / -) qui meurent souvent avant terme. En effet, 64 % des souris *cdk5* (- / -) meurent, *in utero*, après 16 jours de développement embryonnaire et la faible quantité d'individus arrivant à terme décèdent, au plus tard, 12 heures après la naissance. L'analyse histologique de ces embryons révèle des lésions dans le cerveau et dans la moelle mais en aucun cas dans d'autres tissus tels que les reins, les poumons, le coeur et le foie.

L'intérêt que nous portons aux souris knock-out *cdk5*(- / -) est lié au fait que les lésions présentent une similitude avec celles rencontrées chez les mutants *reeler*, la plus frappante étant la stratification anormale des neurones du cortex.

Si ce phénotype semble démontrer l'importance de Cdk5 dans la corticogénèse mais également dans le développement normal de l'architecture cytosquelettique des neurones, certaines réserves peuvent encore être émises quant à l'interprétation de ces résultats. La localisation chromosomique du gène *cdk5* établie par Ohshima *et al.*(1995) montre que ce gène est relativement proche du gène *reeler* mappé par Beckers *et al.*(1994) (**Figure I.10**). Aussi, il semble intéressant de s'assurer que la réalisation du knock-out pour *cdk5* n'ait pas affecté le gène de la Reelin ce qui aurait pour conséquence l'apparition du phénotype *reeler*. A cette fin, une estimation plus précise de la distance séparant les deux gènes paraît indispensable.

I.8.3. DEFINITION DE LA DISTANCE GENETIQUE ENTRE DEUX LOCI

La distance génétique séparant un locus d'un autre situé sur le même chromosome est estimée par le pourcentage de recombinaison entre ces 2 loci. L'unité utilisée est le centimorgan (cM) et correspond à 1 pourcent de recombinaison.

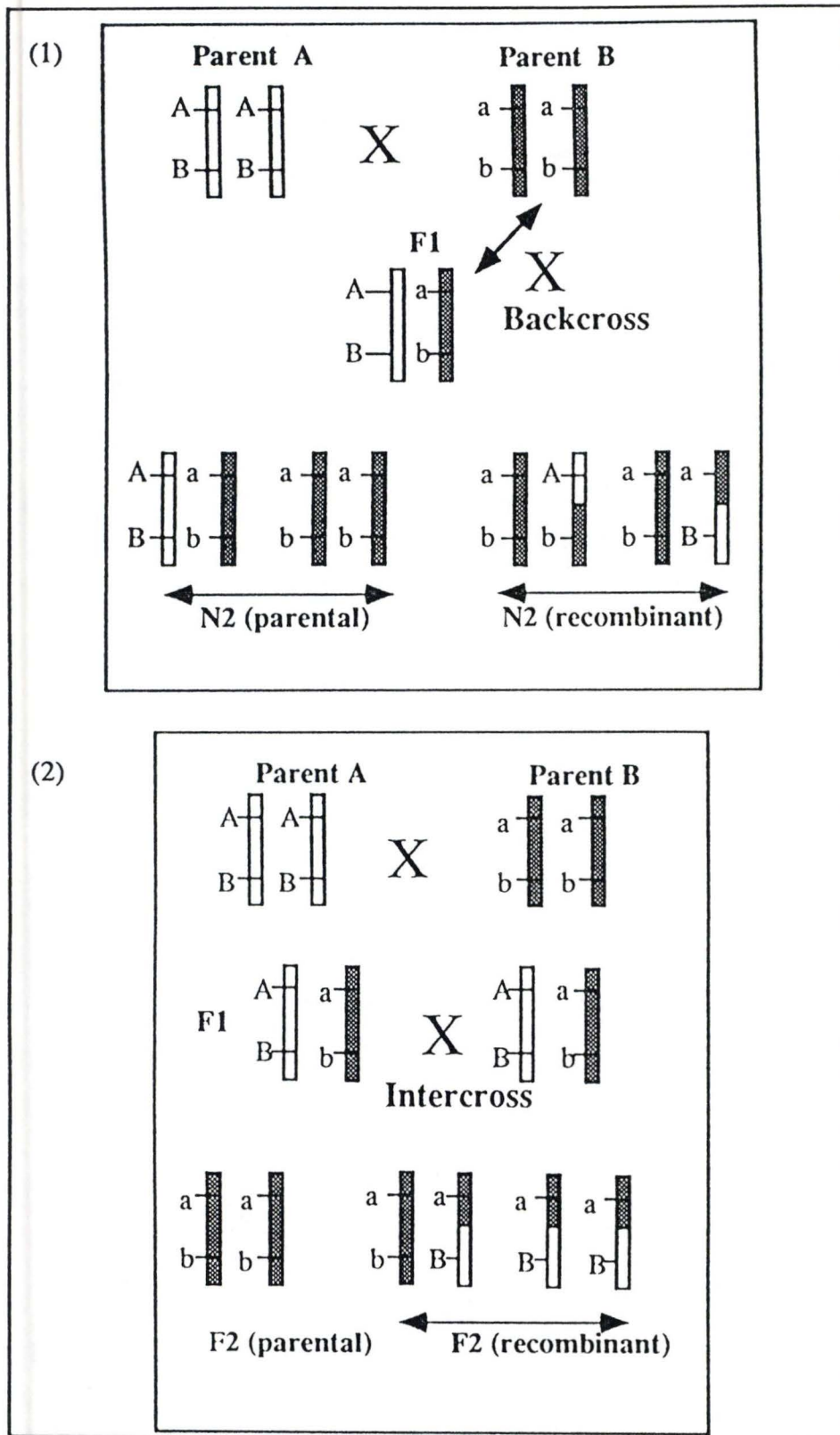


Figure I.11 : Croisements génétiques : backcross (1) et intercross (2).

A et B sont deux gènes liés. A est la gène dont on cherche la localisation. A est la forme non mutée, a est la forme mutée. B et b sont les allèles d'un second gène de localisation connue.

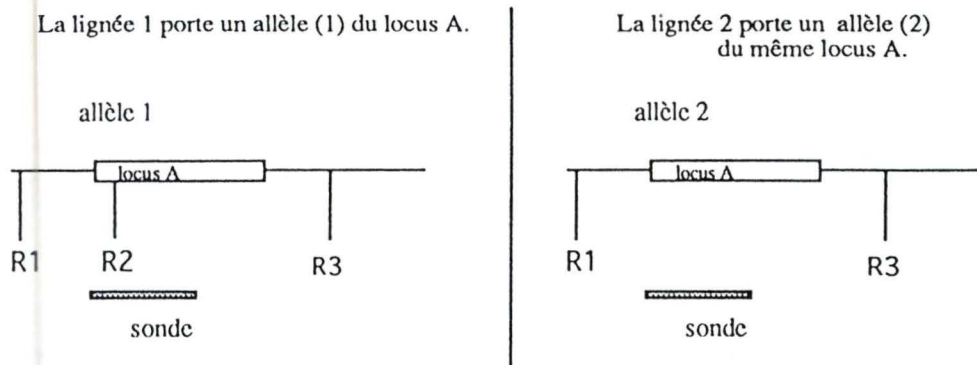
Le pourcentage de recombinaison est une estimation de la fréquence de crossing-over (événement de recombinaison) entre les loci. La relation entre la distance génétique, déterminée par la fréquence de recombinaison, et la distance physique n'est pas toujours linéaire. De plus, des crossing-over multiples peuvent se produire, de sorte que l'on n'observe pas de recombinaison entre les marqueurs étudiés. Il est toutefois admis que la probabilité de doubles crossing-over est pratiquement nulle pour des distances génétiques inférieures à 20 cM (Green, 1981).

I.8.4. IDENTIFICATION DES RECOMBINANTS

L'identification repose sur l'existence de polymorphismes entre 2 lignées de souris utilisées dans les croisements. Deux types de croisements sont généralement utilisés (Green, 1981): les backcross et les intercross. Les principes de ces croisements sont repris à la **Figure I.11**.

Soit A et B deux caractères liés, A/a et B/b étant les allèles. Des individus homozygotes AB/AB sont croisés avec les individus homozygotes ab/ab. Les descendants de première génération, ou F1, ont tous le génotype AB/ab. Les individus F1 sont alors croisés en retour ("backcrossed") avec les parents récessifs ab/ab, donnant les individus de génération dite N2. On peut aussi croiser entre eux les individus F1 pour obtenir les descendants de seconde génération ou intercross F2. Les souches de souris utilisées dans le croisement doivent être choisies pour obtenir un bon compromis entre le polymorphisme et le taux de reproduction. Les croisements intraspécifiques sont facilement mis en oeuvre mais le taux de polymorphisme est faible. Ce problème est résolu en réalisant des croisements interspécifiques. Bonhomme *et al.*(1979,1982) ont mis au point des croisements entre *Mus musculus domesticus* et *Mus spretus*. Bien qu'il s'agisse d'espèces différentes, il est possible d'obtenir des hybrides viables dans les conditions de laboratoire. Etant donné la divergence évolutive entre les 2 espèces, des polymorphismes sont facilement détectés.

Soit deux lignées de souris:



L'allèle 1 est caractérisé par la présence d'un site de restriction R2 supplémentaire.

Après digestion de l'ADN des deux lignées de souris par l'enzyme R, les fragments obtenus sont séparés par électrophorèse puis hybridés à une sonde radioactive spécifique du locus testé. La sonde reconnaît 2 fragments dans la lignée 1 et un seul fragment dans la lignée 2.

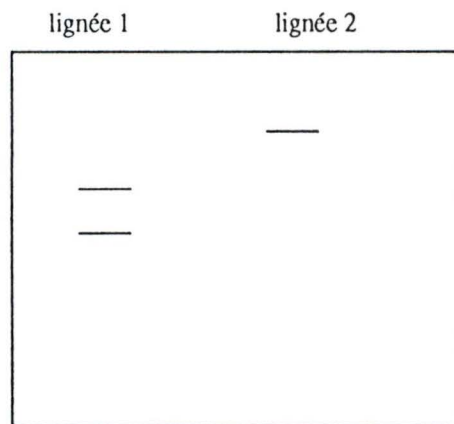


Figure I.12 : Illustration du principe des RFLP.

Les premiers polymorphismes identifiés sont les polymorphismes de restriction ou RFLP (restriction fragment length polymorphism, Botstein *et al.*, 1980).

Les RFLP sont dus à des variations de la séquence de l'ADN, de sorte qu'un site de restriction est absent dans la lignée de souris mais présent dans l'autre. Lors de l'analyse en Southern, une sonde pour le gène analysé révèle des fragments de tailles différentes dans les 2 lignées, identifiant ainsi l'origine de chacun des 2 allèles (**Figure I.12**).

I.9. LE BUT DE CE MEMOIRE

Reeler est une mutation autosomique récessive de la souris, caractérisée par des anomalies du développement du système nerveux central. Le gène *reelin* code pour un ARNm d'environ 12 Kb. Son clonage fut réalisé en 1995 grâce à l'obtention d'un allèle issu d'une insertion transgénique (D'Arcangelo *et al.*, Bar *et al.*, 1995, Hirotsune *et al.*, 1995). Les travaux effectués jusqu'à présent ont permis de caractériser 4 des 5 allèles existants. Seule la mutation Albany 1, notée *Reln^{Alb1}*, induite par mutagenèse chimique au chlorambucil, reste énigmatique.

Le chlorambucil est un agent mutagène induisant des réarrangements chromosomiques tels que des délétions ou, plus rarement, des translocations et des inversions (Russel *et al.*, 1989; Rinckik *et al.*, 1993).

Le premier objectif de ce mémoire était de comparer, par RT-PCR, le message de l'allèle *Reln^{Alb1}* avec celui de l'allèle sauvage afin d'y déceler une anomalie éventuelle.

Si aucune mutation n'était détectée dans le message du gène, le deuxième objectif était d'analyser chez Albany 1, et toujours par comparaison avec l'allèle sauvage, les zones du gène susceptibles d'accueillir une délétion relativement importante. La zone promotrice de *reeler* ainsi que le premier intron d'une taille de 70 Kb focaliseront notre attention. Nous utiliserons la technique de Southern sur gels pulsés pour réaliser ces analyses.

En parallèle à ces expériences, 2 autres objectifs sont également à atteindre:

- l'amplification par PCR-Vectorette et séquençage du promoteur *reeler*
- l'estimation de la distance génétique entre les locus *reeler* et *cdk5* afin de conforter l'hypothèse selon laquelle la réalisation des knock-out pour *cdk5* pourrait affecter le gène *reeler*.

MATERIEL
ET
METHODES

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. SOUCHE ET PLASMIDE

II.1.1. LA SOUCHE BACTERIENNE E.COLI DH11 α

Nous avons utilisé la souche *Escherichia coli* DH11 α possédant le génotype suivant:

F⁻, ϕ 80*lacZ* Δ M15, Δ (*lacZYA-argF*), U169, *deoR*, *rec A1*, *end A1*, *pho A*, *hsdR17*(r κ ⁻, m κ ⁺), *supE44*, -, *thi-1*, *gyr A96*, *rel A1*.

Ses caractéristiques principales étant:

- *rec A1*: réduit la recombinaison au millième de son taux normal, minimisant ainsi la recombinaison entre ADN endogène et exogène.
- *end A1*: améliore le rendement et la qualité des préparations d'ADN plasmidique à petite échelle en diminuant le taux d'endonucléases.
- ϕ 80*lacZ* Δ M15: permet la sélection des colonies contenant un plasmide recombinant par un test coloré bleu-blanc. En effet, Δ M15 est le gène de la galactosidase délété dans sa partie N-terminale et produisant une protéine inactive. Ce fragment du gène *lac Z* donne, par complémentation intragénique avec un plasmide portant un autre fragment du gène *lac Z* (*lac Z'*), une coloration bleue à une colonie en présence du chromogène X-gal. Si au niveau du plasmide, le fragment *lac Z'* est disrupté, la colonie sera blanche en présence de X-gal.

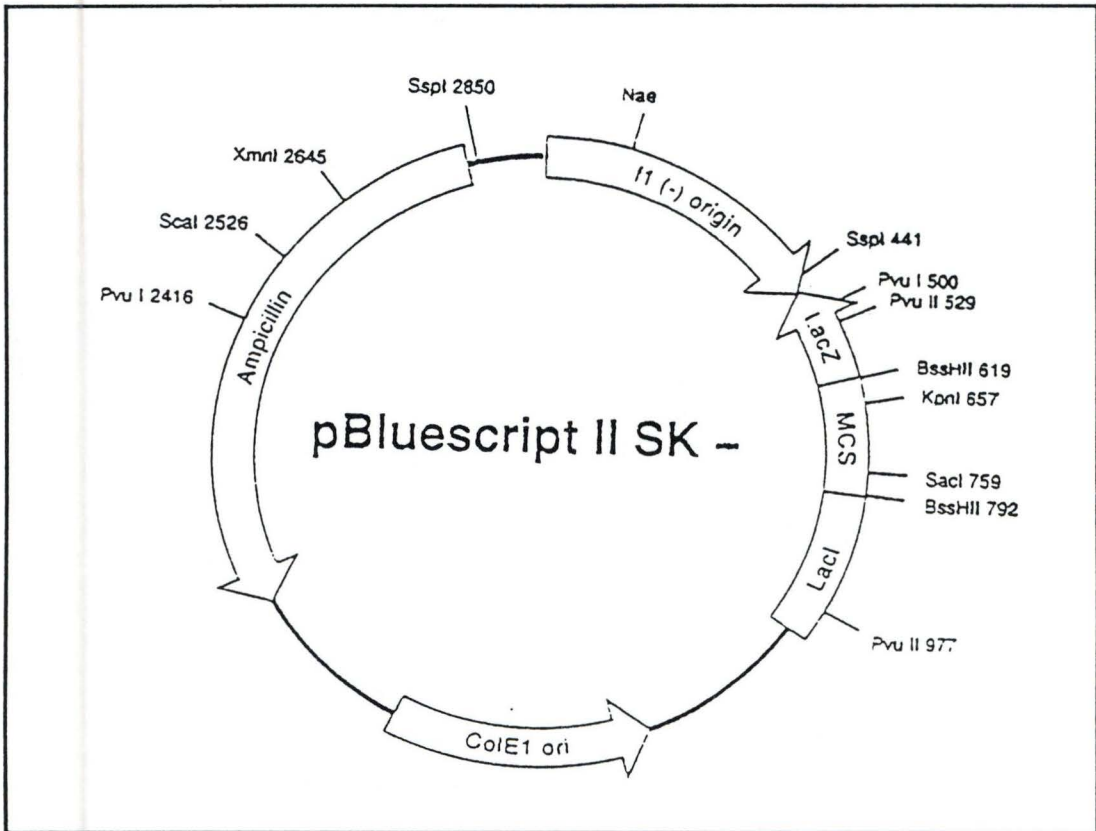


Figure I.1.a : Carte plasmidique de pBlueScript II SK (-).

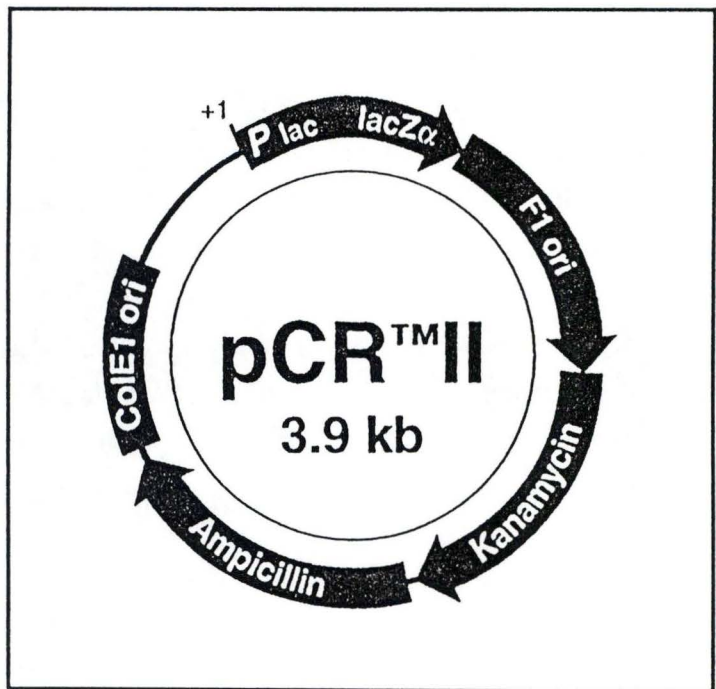


Figure II.1.b : Carte plasmidique de pCRTM II.

II.1.2. LES VECTEURS

II.1.2.1. Le plasmide pBluescript II SK (-)

Le vecteur pBluescript (Figure II.1.a) est un phagémide, c'est-à-dire un hybride entre un plasmide et un phage. Il présente les caractéristiques suivantes:

- Il possède une origine de réplication pour E.coli et l'origine de réplication phagienne F1.
- Il porte le gène de résistance à l'ampicilline.
- Il porte le fragment du gène *Lac Z* (*Lac Z'*), qui complémente l'autre fragment de ce même gène porté par l'épisome F' contenu dans la souche E.coli DH11 α . Cette complémentation intragénique donne une coloration bleue à une colonie en présence du chromogène X-gal.
- Il porte un site multiple de clonage (MSC) dans le gène *Lac Z'*. Le clonage d'un insert disrupte le fragment *Lac Z'* et la colonie sera blanche en présence de X-gal.

II.1.2.2. Le plasmide pCRTMII

Le plasmide pCRTMII (Figure II.1.b) présente les caractéristiques suivantes:

- Il possède une origine de réplication pour E.coli et l'origine de réplication phagienne F1.
- Il porte les gènes de résistance à l'ampicilline et à la Kanamycine.
- Il porte le fragment du gène *Lac Z* (*Lac Z'*), qui complémente l'autre fragment de ce même gène porté par l'épisome F' contenu dans la souche E.coli DH11 α . Cette complémentation intragénique donne une coloration bleue à une colonie en présence du chromogène X-gal.
- Il porte un site multiple de clonage (MSC) dans le gène *Lac Z'*. Le clonage d'un insert disrupte le fragment *Lac Z'* et la colonie sera blanche en présence de X-gal. Remarquons que ce MSC contient, entre deux sites EcoRI, un site de clonage de produits PCR TA-Cloning.

II.2. MILIEUX DE CULTURE BACTERIENS

Le milieu utilisé est un milieu riche et sélectif contenant de l'ampicilline (100µg/ml) à raison de 1ml/Litre. Il existe sous la forme liquide ou solide.

Les cultures liquides sont réalisées dans des bouteille universelles.

Les cultures solides sont effectuées sur boîtes de Pétri; les milieux sont coulés à une température d'environ 55-60°C et séchés à température ambiante. Leur durée de conservation à 4°C dépend de la présence d'éléments labiles comme par exemple les antibiotiques.

Tous les milieux sont autoclavés 20 minutes à 120°C, les éléments thermolabiles sont par ailleurs stérilisés par filtration et rajoutés au milieu liquide quand celui-ci a atteint une température d'une soixantaine de degrés.

- milieu LB liquide

- Bactotryptone (1 %): 10 g/l.

- NaCl (0,5 %): 5 g/l.

- Yeast Extract (0,5 %): 5 g/l.

Porter à volume avec de l'eau distillée.

- milieu LB solide:

De même composition que le LB liquide, ce milieu contient 1,6% d'agar (Gibco BRL).

Ce milieu autoclavé est, après solidification, également conservé à 4°C .

- Solutions stocks

Ampicilline

100 mg d'Ampicilline dans 1 ml d'eau déionisée. La solution est filtrée sur millipore et stockée à -20°C. Pour usage, cette solution est diluée 1000 X afin d'obtenir une concentration de 100 µg/ml.

1M isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)

2,38 g IPTG dans 10 ml d'eau déionisée. Filtrer la solution pour la stériliser et stocker à -20°C.

A utiliser à la concentration recommandée par les protocoles.

X-gal (5-Bromo 4-chloro 3-indolyl β -D-galactoside)

20 mg/ml dans du NN diméthylformamide. Stocker à -20°C.

A utiliser à la concentration de 20 mg/ml.

II.3. METHODES RELATIVES AL'ADN

II.3.1. EXTRACTION ET PRECIPITATION D'ARN TOTAL.

La capacité d'isoler de l'ARN propre et intact est très importante lorsque l'on étudie des gènes ; en effet, l'ARN de n'importe quelle cellule peut être rétrotranscrit *in vitro* en ADN double brin ultérieurement amplifiable par PCR. Le clonage de cet ADN est également possible afin d'obtenir une banque d'ADNc spécifique de chaque type cellulaire.

La difficulté principale dans l'isolation d'ARN est que la majorité des ribonucléases (ou RNases) sont des enzymes très stables et très actives qui n'ont besoin d'aucun cofacteur pour fonctionner. La première étape de toute préparation d'ARN implique de ce fait une lyse cellulaire dénaturant ces ribonucléases. Il faut également prendre certaines précautions afin d'éviter toute contamination par les RNases : l'eau et les solutions utilisées lors de la préparation doivent être traitées au diéthylpyrocarbonate (DEPC), un agent chimique qui inactive les RNases par des modifications covalentes, le matériel utilisé doit être autoclavé et il est absolument nécessaire de porter des gants, les mains étant une source principale de contamination par les ribonucléases.

En pratique :

- tarer un corex avec de la solution dénaturante : minimum 1 ml par 100 mg de tissu.
- disséquer les organes et les mettre dans la solution dénaturante.
- homogénéiser rapidement.
- ajouter 0,1 ml de 2 M NaAc pH 4 (par ml de solution dénaturante).
- mélanger.
- ajouter 1 ml de phénol (par ml de solution dénaturante).
- mélanger.
- ajouter 0,2 ml de CIAA (par ml de solution dénaturante).
- mélanger et incuber 15 minutes à 0°C.
- centrifuger 20 minutes à 9.000 rpm à 4°C (centrifuge 5415C).
- prélever la phase aqueuse contenant le RNA et transvaser dans un corex.
- ajouter 1 volume d'isopropanol.
- mélanger et placer minimum 30 minutes à -20°C.
- centrifuger 10 minutes à 9.000 rpm (centrifuge 5415C) ; éliminer le surnageant.
- repandre le culot de RNA dans du LiCl 4 M, vortexer, centrifuger 10 minutes à 5.000 rpm (centrifuge 5415C), décanter.
- resuspendre les culots de RNA dans 0,3 ml de solution dénaturante (par ml de solution dénaturante de départ).
- répartir dans des Eppendorfs et ajouter 1 volume d'isopropanol, incuber 30 minutes à -20°C.
- centrifuger 10 minutes à 9.000 rpm (centrifuge 5415C), décanter.
- resuspendre le culot de RNA dans EtOH 75% (eau-DEPC), vortexer et incuber 15 minutes à température ambiante (pour éliminer les sels de guanidinium).
- centrifuger 5 minutes à 9.000 rpm (centrifuge 5415C), jeter le surnageant et sécher le culot à l'air.
- dissoudre les culots de RNA dans 0,1 ml/100 mg de tissus de départ d'eau-DEPC.
- stocker à -70°C.

On peut mesurer la DO₂₆₀ sur une dilution 1/100, 1 D0 = 40 mg d'ARN.

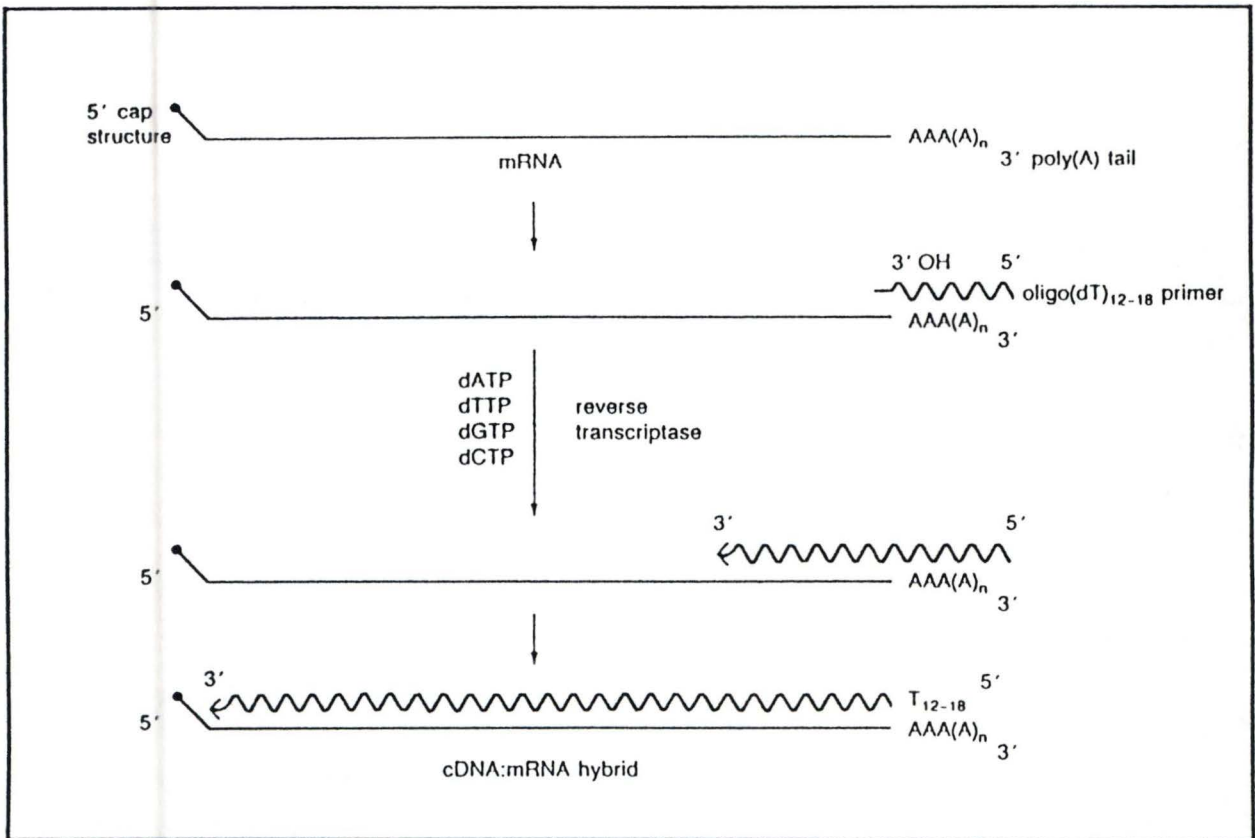


Figure II.2 : Synthèse du premier brin d'ADNc par la Reverse Transcriptase à partir d'un oligo(dT).

<u>Solution dénaturante :</u>	-guanidium thiocyanate :	4 M.
	-citrate de sodium pH7 :	25 mM.
	-eau-DEPC :	293 ml.
	-N-laurylsarcosine 10% :	0,5%.

Cette solution stock se garde 3 mois à température ambiante.

Avant emploi, ajouter 350 ml de 2-mercaptoéthanol par 50 ml de solution stock.

Cette solution peut être gardée 1 mois à température ambiante.

<u>Solution 2 M acétate de sodium :</u>	-eau-DEPC :	40 ml.
	-acétate (anhydre) :	16,42 g.
	-acide acétique glacial :	35 ml.
	-ajuster le pH à 4.	
	-porter à 100 ml avec de l'eau-DEPC.	

II.3.2. LA REACTION DE TRANSCRIPTION INVERSE

La synthèse *in vitro* d'ADN à partir d'ARN-template (Reverse Transcription ou Transcription Inverse) est rendue possible grâce à certaines enzymes (Reverse Transcriptases ; **Figure II.2.**) dérivées de rétrovirus tels que "avian myoblastosis virus" (AMV) ou "Moloney murine leukemia virus" (MMLV) ; c'est cette dernière que nous avons utilisée dans le cadre de ce travail. Ces rétrovirus utilisent de telles enzymes pour produire des copies de leur ARN génomique sous forme d'ADN. L'ADN synthétisé à partir d'ARN est appelé "ADN complémentaire" (ADNc).

En pratique :

1) Traiter le RNA à la DNase.

-placer dans un tube :

RNA total :	2 µg.
tampon DNase 10x :	1 µl.
DNase I (Gibco-BRL) :	1 µl (1 unité).
eau-DEPC :	ad 10 µl.

-incuber 30 minutes à température ambiante.

-ajouter 1 µl d'EDTA 25 mM.

-incuber 10 minutes à 70°C.

-mettre en glace pour inactiver la DNase et dénaturer le RNA.

<u>Tampon DNase 10x (Gibco-BRL) :</u>	-Tris-HCl pH 8,3 : 200 mM.
	-KCl : 500 mM.
	-MgCl ₂ : 25 mM.

2) Synthèse du premier brin.

-réaliser le mix suivant :

first strand buffer 5x (Gibco-BRL) :	4 µl.
DTT (Gibco-BRL) :	2 µl.
dNTP :	1 µl.
random hexamers (Boehringer) :	1 µl
SuperScript II (Gibco-BRL) :	1 µl.

-ajouter 9 µl de ce mix dans le tube de RNA.

-incuber 30 minutes à 37°C, 30 minutes à 42°C et 5 minutes à 95°C.

-mettre en glace.

-amener à 100 µl avec de l'eau.

-stocker à -70°C.

First strand buffer 5x (Gibco-BRL) : -Tris-HCl pH 8,3 : 250 mM.
 -KCl : 375 mM.
 -MgCl₂ : 15 mM.

Enzyme SuperScript II (Gibco-BRL) : ou "RNase H⁻ Reverse Transcriptase", est une DNA Polymérase dérivée du MMLV qui synthétise de l'ADNc à partir d'ARN simple-brin. Cette enzyme possède une mutation au niveau de l'activité RNase H qui supprime la dégradation des molécules d'ARN lors de la synthèse du premier brin d'ADNc sans altérer l'activité polymérase.

II.3.3. LA REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE (PCR)

La PCR est une technique utilisée *in vitro* pour amplifier un segment d'ADN compris entre deux régions de séquences connues. Deux oligonucléotides complémentaires de ces séquences sont utilisés comme " amorces " de la réaction de polymérisation catalysée par une ADN Polymérase. Ces amorces bordent la séquence à amplifier et doivent donc être spécifiques à ces régions.

La réaction implique un certain nombre de cycles qui se définissent en trois étapes :

- l'ADN à amplifier (ADN template) est d'abord dénaturé thermiquement (choc thermique à 92°C) en présence d'un large excès molaire de chacun des deux oligonucléotides et des quatre dNTPs ; c'est l'étape de dénaturation.
- le mélange réactionnel est ensuite refroidi à une température qui permet aux amorces de s'hybrider sur leur séquence cible; c'est l'étape d'hybridation.
- le mélange est ensuite amené à une température propice à la réaction de polymérisation ; cette température est en règle générale située aux alentours de 72°C ; c'est l'étape d'élongation.

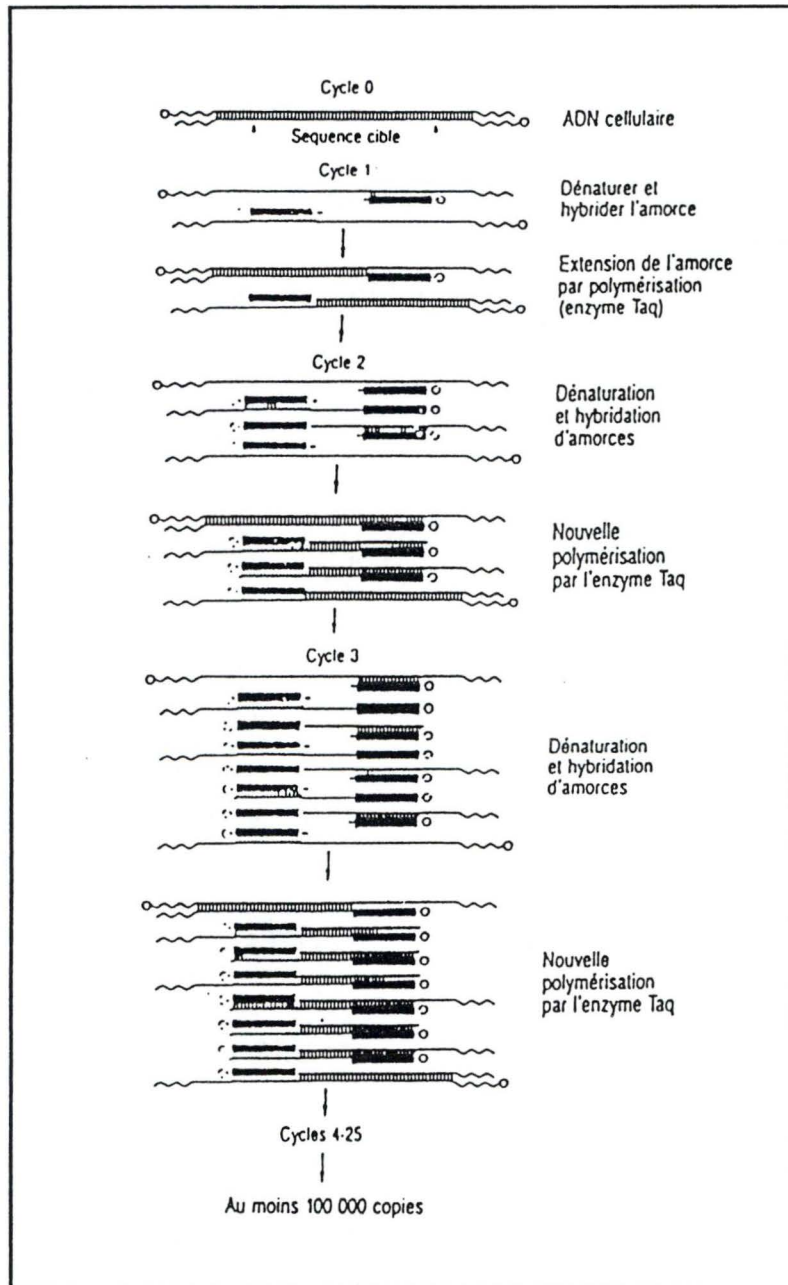


Figure II.3 : Schéma d'une amplification PCR

Ces étapes (**Figure II.3.**) de dénaturation, d'hybridation et de synthèse de l'ADN sont répétées une trentaine de fois. De cette façon, les produits d'un cycle d'amplification servent de matrices aux amplifications suivantes.

Le produit majeur de cette réaction exponentielle est un segment d'ADN double brin dont les extrémités sont définies par les extrémités 5' des deux amorces et dont la longueur est définie par la distance séparant ces deux amorces.

Cette "Polymerase Chain Reaction" étant exponentielle, il est très important d'éviter toute contamination des réactifs par de l'ADN étranger qui pourrait être amplifié.

Les oligonucléotides

Ceux-ci doivent être d'une longueur minimale de 16 nucléotides afin de permettre une hybridation correcte à la matrice. Une concentration en primers de 1 mM est généralement utilisée. Il est à noter qu'une trop forte concentration peut entraîner un amorçage erroné de la polymérisation à des sites non spécifiques.

L'enzyme utilisée

L'enzyme, la Taq DNA Polymerase, a une activité de polymérisation 5'-3' mais ne possède pas d'activité exonucléase 3'-5'. Cette enzyme n'a donc pas d'activité "proof reading" exonucléasique.

Son temps de 1/2 vie est :

- supérieur à 2 h à une température de 92,5°C.
- de 40 minutes à une température de 95°C.
- de 5 minutes à une température de 97°C.

Les dNTPs:

Les concentrations des 4 dNTPs doivent être équivalentes et relativement basses (2 mM), ce qui permet d'augmenter la fidélité de la polymérisation. En effet, une augmentation de la concentration en dNTPs favorise l'élongation au détriment du système correcteur. Cela semble vrai en tout cas pour des concentrations > 1mM.

Le tampon:

- KCl : 50 mM.
- Tris-HCl : 10 mM.
- MgCl₂ : 1,5-2 mM.

Le KCl facilite l'hybridation de la sonde. Quant au magnésium, sa concentration est critique et peut affecter l'activité et la fidélité de l'enzyme assurant la polymérisation.

L'hybridation des amorces:

La température et la durée requise pour l'hybridation des amorces dépendent de leur composition nucléotidique, de leur longueur et de leur concentration. Pratiquement, on applique une température d'hybridation (ou d'annealing) de 5°C inférieure à la température de melting (T_m) des amorces. La température de melting se calcule en règle générale par la formule :

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = (2 \times \text{nombre de nucléotides A et T}) + (4 \times \text{le nombre de nucléotides G et C})$$

Notons que l'amplification est plus efficiente si l'annealing se déroule à basse température (37°C). Mais à cette température, le taux d'hybridation erronée est important. Le choix d'une température d'annealing égale à T_m - 5°C est donc un compromis entre l'efficacité et la spécificité.

Le nombre de cycles:

Le nombre de cycles d'amplification, lui, dépend de la concentration en ADN template dans le mélange réactionnel. Le nombre de molécules cibles doit être de l'ordre de 10^5 à 10^6 molécules. Le nombre de cycles sera donc choisi en fonction du nombre de molécules cibles présentes:

$3 \cdot 10^5$ molécules :	25 à 30 cycles
$1,5 \cdot 10^4$ molécules :	30 à 35 cycles
$1 \cdot 10^4$ molécules :	35 à 40 cycles
50 molécules :	40 à 45 cycles

En pratique :

-placer dans un tube PCR :

Tampon PCR 10x :	2,5 μ l.
Mix dNTPs (2mM) :	2,5 μ l.
Primer 5' (1 mM) :	2,5 μ l.
Primer 3' (1 mM) :	2,5 μ l.
ADN matrice:	20 ng.
Taq Polymerase (1 Unité) :	0,5 μ l.

-porter à un volume de 20 μ l avec de l'eau stérile.

-ajouter environ 20 μ l d'huile minérale dans le tube.

-réaliser le cycle suivant : 1°-Dénaturation 4 minutes à 94°C.

2°-Dénaturation 1 minute à 94°C.

3°-Hybridation 1 minute (température = T_m -5).

4°-Elongation 1 minutes (ou plus) à 72°C.

5°-Répéter les étapes 2°, 3° et 4° : **30 fois.**

6°-Terminaison 10 minutes à 72°C.

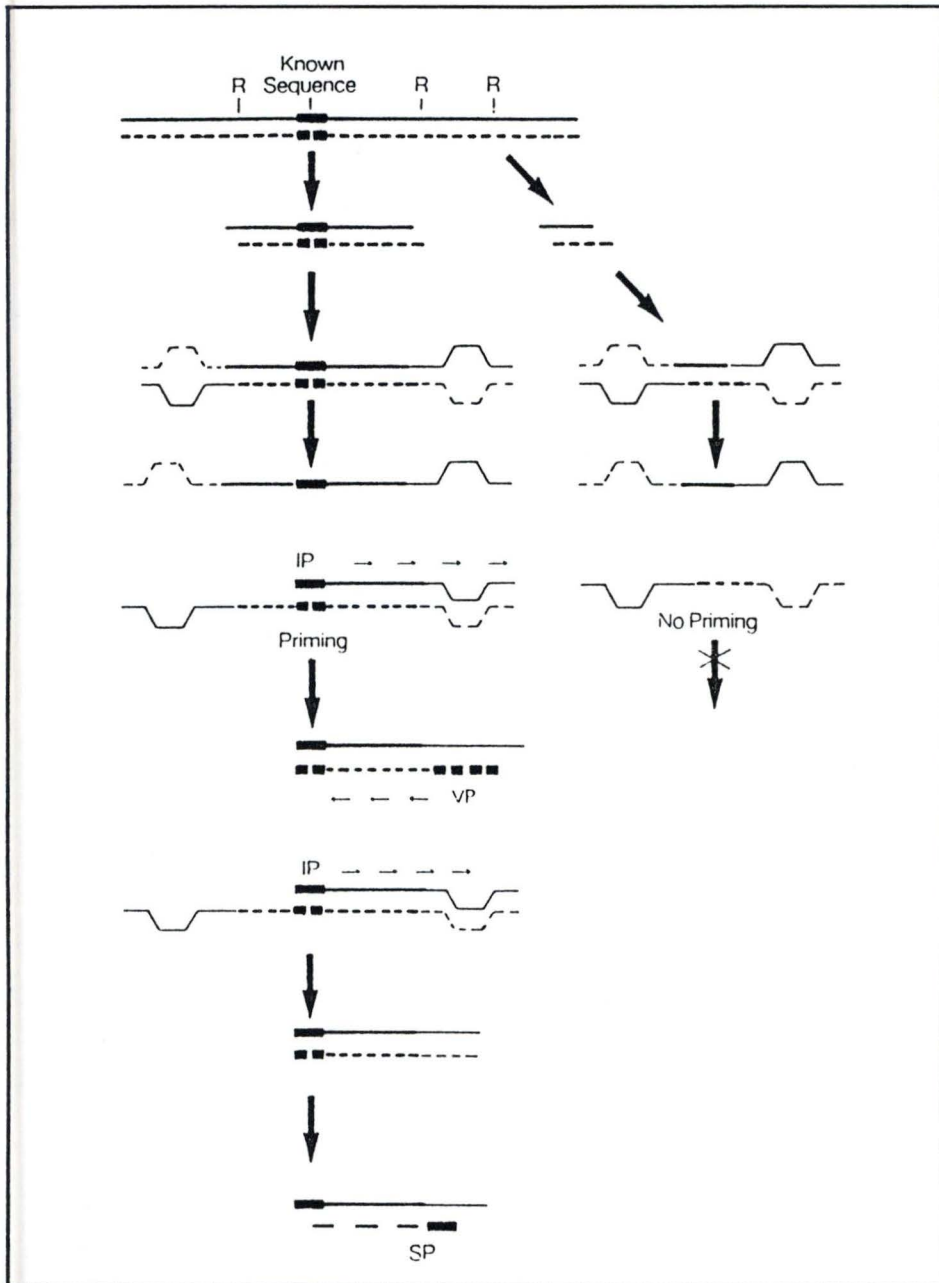


Figure II.4 : Le principe de PCR-Vectorette.

II.3.4. LA PCR-VECTORETTE

(adapté de Riley et al., 1990 et de Green et al., 1993)

Lorsque l'information génétique la plus proche du promoteur n'est autre que l'extrémité 5' de l'ARNm, la technique de PCR-Vectorette est sans doute la plus appropriée pour obtenir les premiers renseignements sur ce promoteur. Cette technique, illustrée à la **Figure II.4**, permet d'amplifier des fragments spécifiques d'ADN alors que seule la séquence d'une seule amorce est connue.

La PCR-Vectorette nécessite 3 étapes essentielles:

- Premièrement, la digestion de l'ADN avec une enzyme de restriction appropriée. L'ADN utilisé ici est de l'ADN total de YAC AAT-C6 digéré par HincII. L'intérêt d'utiliser cet ADN se comprend aisément. En effet, les produits amplifiés par cette méthode sont généralement sous-clonés puis séquencés. Il n'est pas rare de constater lors de l'analyse de ces séquences que le produit obtenu est issu d'une amplification non spécifique. Dans notre cas, si une amplification non spécifique a eu lieu sur ADN de levure, elle sera directement révélée lorsque nous soumettrons sa séquence dans le programme de Blast par exemple. De plus, nous essayons ici d'étudier le promoteur de *reeler* contenu seulement dans le YAC AAT-C6.

- La deuxième étape est la ligation sur l'ADN digéré d'oligonucléotides synthétiques très particuliers appelés vectorettes ou bulles. La vectorette est formée de deux oligonucléotides complémentaires à chaque extrémité, mais non complémentaires entre-eux au centre.

- La dernière étape consiste à réaliser la PCR en utilisant une amorce spécifique connue, issue dans notre cas de l'extrémité 5' de *reeler*, et une amorce issue directement des oligonucléotides synthétiques. Une fois amplifié, analysé sur gel d'agarose et purifié, le fragment peut être séquencé.

La technique de PCR nichée est souvent utilisée afin d'éviter la sélection de produit d'amplification non spécifique. A cette fin, une amorce située à proximité de celle utilisée lors de la première amplification et dont la séquence connue se trouve bien sûr dans le produit déjà une fois amplifié, est utilisée. L'autre amorce est toujours celle utilisée lors de la première PCR et spécifique aux oligonucléotides synthétiques.

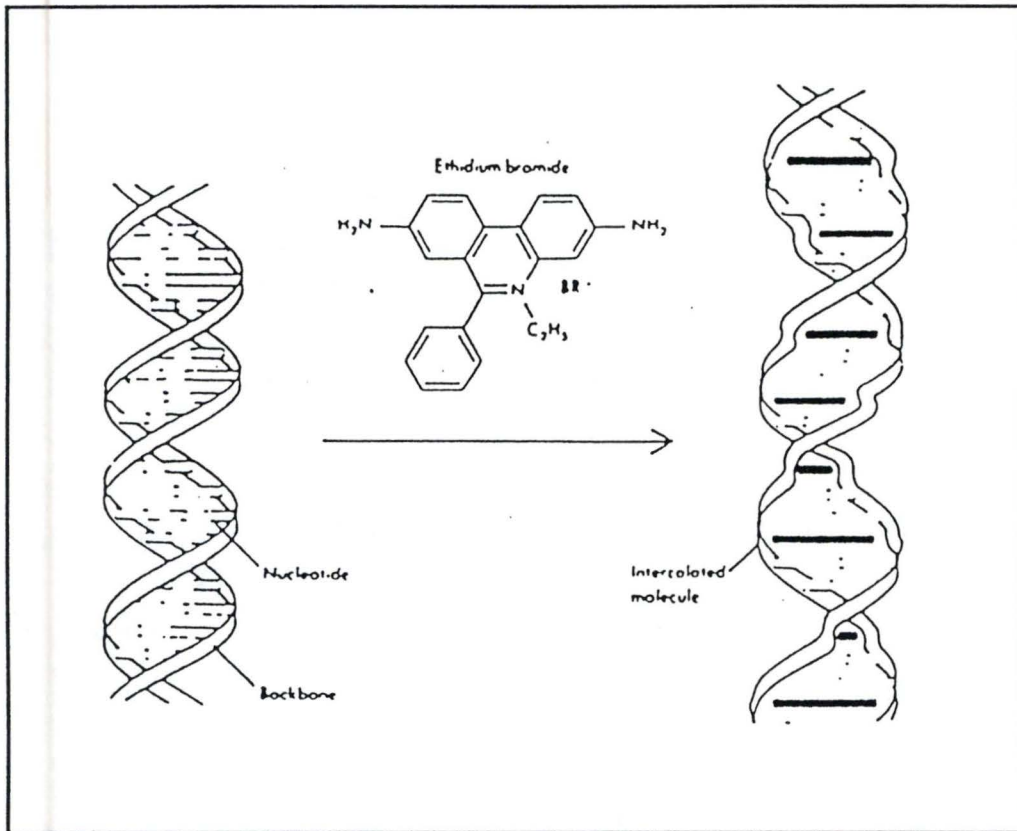


Figure II.5 : Visualisation de la double hélice d'ADN grâce au bromure d'éthidium

Les conditions de la première PCR sont par cycle: - 1 min à 92°C
- 2 min à 62°C
- 2 min à 72 °C =====> 20 cycles.

Les conditions pour la PCR nichée sont par cycle: - 1 min à 92°C
- 1 min à 62°C
- 2 min à 72°C =====> 30 cycles.

II.3.5. PURIFICATION D'ADN SUR COLONNE WISARD

Cette technique a été utilisée dans notre travail pour purifier des fragments d'ADN obtenus par PCR. Le Kit utilisé était le Wizard PCR Preps System, de Promega. Il constitue une voie fiable de purification de double brins d'ADN amplifié par PCR. Le procédé de purification est rapide, simple et performant. Les produits PCR purifiés par cette méthode se voient exempt de tous les déchets issus de l'amplification tels que les amorces restantes, les nucléotides isolés ou les enzymes nécessaires à la PCR.

Le produit de PCR est transféré dans un tube et son volume est porté à 100µl avec de l'eau déionisée. L'échantillon est alors mélangé à un 1 ml de résine appropriée. Après avoir été vortexé, ce mélange est transféré dans une seringue au bout de laquelle est placée une colonne de purification. Ensuite, 1 ml d'isopropanol 80% est versé dans la seringue et traverse la colonne. Cette opération est répétée une deuxième fois. La colonne est centrifugée 20 secondes à 14000 rpm et laissée reposer 3 minutes. Enfin, 50 µl d'eau déionisée sont rajoutés dans la colonne et à nouveau centrifugés. L'ADN purifié se retrouve dans cette eau.

II.3.6. QUANTIFICATION DE L'ADN

Le bromure d'éthidium est une substance qui s'intercale entre les bases de l'ADN (Figure II.5.). Une fois excité par un rayonnement UV, il devient fluorescent.

La technique utilisée ici consiste à comparer la fluorescence de l'échantillon dont la concentration en ADN est inconnue avec la fluorescence d'un étalon constitué de 5 solutions contenant chacune une concentration connue d'ADN.

En pratique:

- sur un papier Glad, déposer 2 µl de chaque dilution de la solution de DNA carrier.
- ajouter 2 µl de bromure d'éthidium à chaque goutte de DNA carrier
- faire la même chose avec différentes dilutions d'ADN dont on désire connaître la concentration (1/10, 1/50, 1/100, ...).
- exposer aux UV et comparer l'intensité des dilutions de l'ADN de concentration inconnue à la courbe standard de DNA carrier.

Exemple: Le spot de la dilution 1/100 de l'échantillon a la même intensité que le point 20 ng de la courbe d'étalonnage; on peut donc estimer la concentration de notre échantillon à $20 \times 100 = 2000$ ng/ml (ou 2 µg/ml).

Solution de DNA carrier : à 1, 2, 5, 10 et 20 ng/ml.

Solution de bromure d'éthidium : à 1 mg/ml (diluer 10.000 x le stock à 1 % dans de l'eau).

II.3.7. EXTRACTION D'ADN AU PHENOL-CHLOROFORME

L'extraction d'ADN au phénol-chloroforme a pour but d'éliminer les sels et les protéines. C'est donc une étape de purification souvent réalisée après une réaction de restriction afin d'éliminer le ou les enzyme(s) ainsi que les sels contenus dans le tampon. L'emploi conjoint de phénol et de chloroforme permet la dénaturation de toutes les protéines.

En pratique :

- porter le volume de la solution contenant l'ADN à 400 µl.
- ajouter 200 µl de solution de phénol et 200 µl de CIAA (chloroforme + alcool isoamylique).
- vortexer 30 secondes.
- centrifuger 5 minutes pour séparer les phases organique et aqueuse (centrifuge 5415 C).
- récupérer la phase aqueuse (phase supérieure) --> environ 400 µl.

Solution de phénol :

-phénol :	50 ml.
-8-hydroxyquinoline:	0,1%.

La 8-hydroxyquinoline est un anti-oxydant qui donne à la solution une teinte jaune permettant d'identifier les deux phases.

Solution de CIAA :

-chloroforme :	48 ml.
-alcool isoamylique :	2 ml.

L'alcool isoamylique facilite la séparation entre le chloroforme et la phase aqueuse.

Solution de phénol-chloroforme :

- mélanger les solutions décrites ci-dessus vol. par vol.
- saturer avec 100 ml de tampon TE pH8.
- centrifuger 5 minutes à 5000 rpm (Rotor GSA Sorvall).
- éliminer le TE.
- recommencer la saturation jusqu'à ce que le pH du phénol soit égal à 8.

Tampon TE :

-Tris-HCl pH 8-7,6 ou 7,4 :	10 mM.
-EDTA pH 8-7,6 ou 7,4 :	1 mM.

II.3.8. LA PRECIPITATION A L'ETHANOL

Cette opération consiste à concentrer une solution d'ADN, elle est classiquement réalisée après une extraction au phénol.

En pratique :

- ajouter à la solution d'ADN à concentrer 1/10 du volume total de NaAc 3M pH5,2.
- ajouter 1 volume d'éthanol absolu.
- mélanger et incuber 1-2 heures à -20°C.
- centrifuger 15 minutes à 14000 rpm en chambre froide pour culotter l'ADN (centrifuge 5415C).
- laver le culot à l'éthanol 70% pour éliminer les solutés piégés dans le culot.
- centrifuger 1 minute à 14000 rpm (centrifuge 5415C).
- éliminer le surnageant, sécher brièvement sous vide et resuspendre dans le volume désiré d'eau stérile.

II.3.9. PREPARATION D'ADN GENOMIQUE DE HAUT POIDS MOLECULAIRE EN BLOC D'AGAROSE (adapté de Herman et al.,1987 et Birren et Lai, 1993)

Après avoir tué la souris par dislocation cervicale et aspergé généreusement la peau d'alcool dénaturé, la rate de l'animal est prélevée à l'aide d'instruments stériles.

Les tissus sont homogénéisés délicatement dans un homogénéiseur de Dounce contenant 10 ml de PBS glacé, le tout sur glace. L'homogénat est transféré dans un falcon de 50 ml. Le Dounce est rincé avec du PBS glacé qui est récupéré ensuite dans ce même falcon. Le volume de PBS est ensuite porté à 50 ml et on laisse décanter, toujours sur glace, les débris cellulaires durant approximativement 10 minutes. Après centrifugation du surnageant pendant 10 minutes, à 4°C, à 2000 rpm, les cellules sont reprises dans 50 ml de PBS glacé.

On détermine le nombre total de cellules présentes dans la suspension (pour la rate, on déduit 40 % du nombre final pour le nombre de globules rouges). Après avoir recentrifugé dans les mêmes conditions les cellules, on reprend ces dernières dans un volume de PBS de sorte que la concentration soit de 10^6 cellules par bloc de 100 ml (correspondant à environ 5-10 mg d'ADN). Les cellules sont mélangées à un volume égal d'agarose Seaplaque GTG 1,5% (préparé dans du PBS et conservé à 50°C) et le mélange est coulé dans des moules. Ayant durcis environ 20 minutes, les blocs sont soumis pendant 48 heures à 50°C, sous agitation modérée, à une solution contenant 0.4 M EDTA, 1% Sarkosyl et 2 mg/ml de protéinase K afin de lyser les cellules. Après digestion, les blocs sont rincés pendant 30 minutes dans du TE (1X) à 50°C, puis dans une solution de TE contenant 0.040 mg/ml de PMSF (2 X 30 minutes à 50°C) pour inactiver la protéinase K. Les blocs sont encore rincés 2 fois dans du TE (1X) à 50°C et finalement conservés à 4°C dans 10 mM Tris pH 7.5, 50mM EDTA pH 7.5.

II.3.10. LES TECHNIQUES D'ELECTROPHORESE

II.3.10.1. L'électrophorèse d'ADN en gel d'agarose

Cette méthode de séparation des fragments d'ADN permet l'évaluation de la taille et de la qualité des fragments. Les groupements phosphates confèrent à l'ADN une charge globale négative. L'ADN migre donc vers l'électrode positive dans un champ électrique. La vitesse de migration des acides nucléiques dans le gel dépend des quatre facteurs suivants:

- Le voltage appliqué. A faible voltage, la vitesse de migration de l'ADN linéaire est proportionnelle au voltage appliqué. En cas de voltage trop important, la résolution diminue.

- La concentration en agarose. Les gels à forte concentration (1,5 - 2 %) permettent de séparer des molécules d'ADN de petite taille (100 à 1500 bp). Les gels à faible concentration (0,8 - 1%) permettent de séparer des molécules de taille supérieure (500 bp à plus de 10 kb).

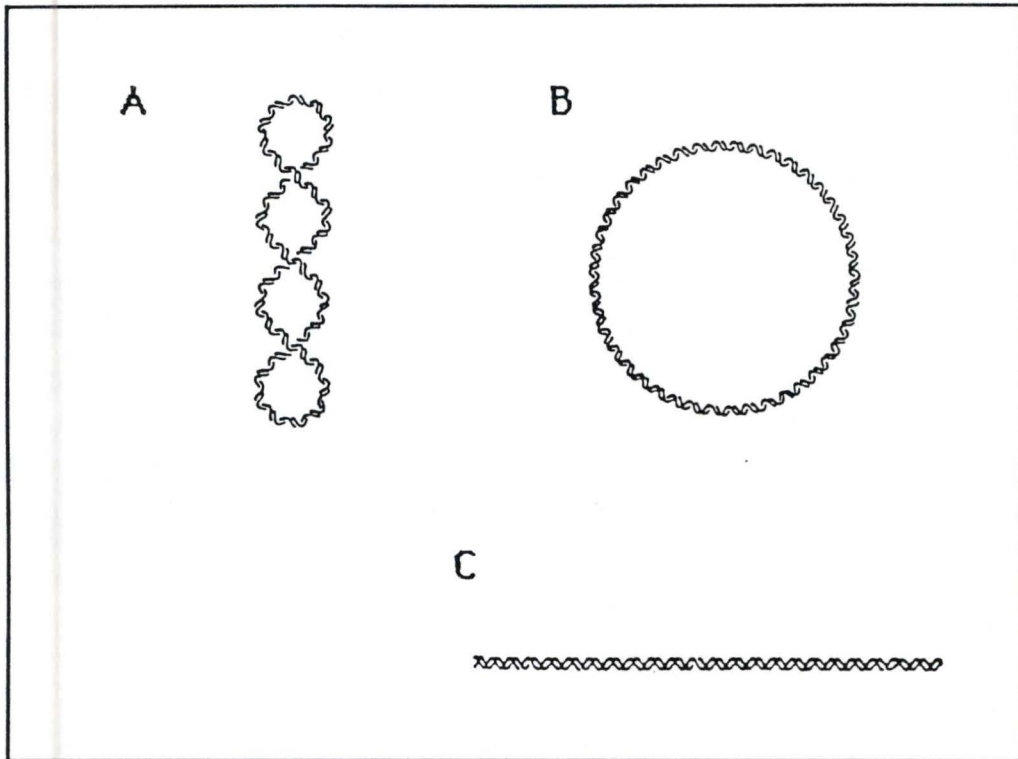


Figure II.6 : Les trois conformations de l'ADN plasmidique:

- (A).laforme CCC
- (B).la forme OC
- (C).la forme OL

- Le poids moléculaire des fragments d'ADN. Les molécules d'ADN double brins linéaires migrent à une vitesse inversement proportionnelle à leur poids moléculaire.

- La conformation de l'ADN (Figure II.6.). Les formes plasmidiques super enroulées ou CCC (Completely Closed Circular), circulaires cassées sur un seul brin (nick) ou OC (Open Circular) et OL (Open Linear) migrent à des vitesses différentes. La mobilité relative de ces bandes dépend de différents facteurs et notamment des tours de superhélicité de la forme CCC; l'ordre de migration sera CCC > OL > OC.

La visualisation des bandes se fera sous UV. Le bromure d'éthidium a la capacité de s'intercaler entre les bases de l'ADN et permet de repérer les bandes d'ADN car il fluoresce en rose-orange sous UV.

En pratique :

- Ajouter l'agarose à du TAE et porter le tout à ébullition puis laisser refroidir à 50°C. Le gel, encore liquide à cette température, est coulé dans un moule en plexiglas.
- Ajouter du bromure d'éthidium à une concentration finale de 0,5 mg/ml.
- Placer un peigne sur le moule en plexiglas permettant de former des puits dans le gel refroidi et solidifié. La taille des dents du peigne est choisie selon le volume des échantillons à déposer sur gel, le plus souvent 15 à 20 µl. Après solidification, retirer le peigne et placer le gel dans une cuve à électrophorèse remplie de TAE.
- Introduire à la micropipette l'échantillon d'ADN, alourdi par l'adjonction de 1/10 du volume final de solution d'alourdisseur, dans un des puits. Le bleu de bromophénol qui migre à la même vitesse que les plus petits fragments visible sur le gel permet de contrôler la migration.
- Appliquer une différence de potentiel de 40 à 100 volts aux extrêmités de la cuve.
- Le gel est ensuite placé sur un transilluminateur UV ($\lambda=302$ nm) pour visualiser les bandes d'ADN et photographié.

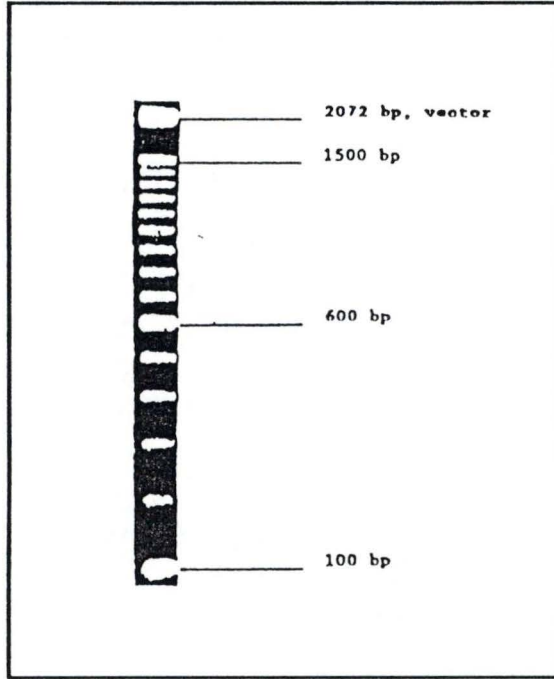


Figure II.7 : Marqueur 100 bp DNA Ladder (Gibco-BRL)

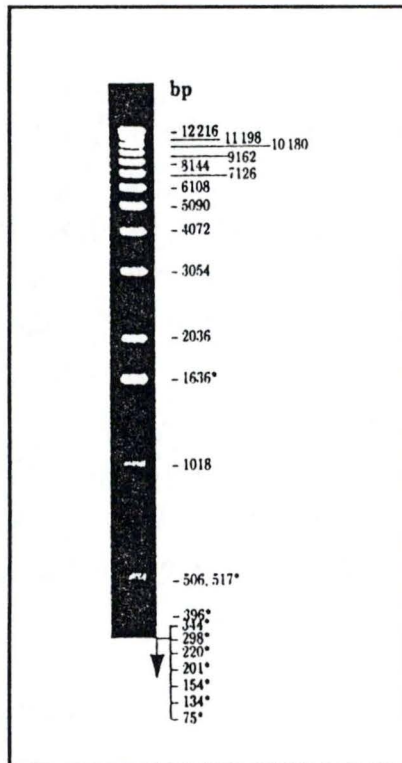


Figure II.8 : Marqueur 1 Kb DNA Ladder (Gibco-BRL)

Deux évaluations peuvent être réalisées:

- La taille des fragments

Dans un des puits du gel, on place un marqueur de taille qui est une molécule d'ADN coupée par un enzyme de restriction générant des fragments de taille connue.

Les marqueurs utilisés dans ce travail sont:

- le 100 bp DNA Ladder (Gibco-BRL) (**Figure II.7.**).
- le 1 Kb DNA Ladder (Gibco-BRL) (**Figure II.8.**).

- La quantité d'ADN dans une bande

La fluorescence étant proportionnelle à la quantité de bromure d'éthidium intercalée dans l'ADN, elle sera d'autant plus intense que les fragments d'ADN d'une bande sont grands et nombreux. La quantité du marqueur étant connue, il sera facile d'estimer par simple comparaison la quantité d'ADN de l'échantillon étudié.

- Solutions stocks :

- | | | |
|---------------|------------------|-------|
| - Tampon TAE: | Tris: | 40 mM |
| | EDTA: | 1 mM |
| | Acétate glacial: | 40 mM |

porter à pH8

- | | | |
|---|---------------------|--------|
| - Solution d'alourdisseur (pour 10 ml): | Bleu de bromophénol | 25 mg |
| | Glycérol | 5 ml |
| | EDTA (1M) | 0,5 ml |

porter à volume avec de l'eau.

- solution de bromure d'éthidium : 10 mg/ml maintenue à l'abri de la lumière.

II.3.10.2. L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE)

Nous utilisons l'appareil CHEF DR II (Biorad) qui produit un champ électrique homogène à partir d'un dispositif hexagonal de 24 électrodes. Les électrodes sont activées de manière à générer en alternance deux champs électriques dont les vecteurs de courant forment un angle de 120° l'un par rapport à l'autre (**Figure II.8 bis**). La concentration en agarose, la concentration et la température du tampon, le voltage, le temps de pulse et la durée totale de l'électrophorèse sont les facteurs affectant l'électrophorèse.

En pratique, les électrophorèses sont réalisées dans de l'agarose Seakem GTG à une concentration de 1%, dans 0.5 TBE. La température du tampon est de 6.5°C , le voltage est de 180 V, le temps de pulse va graduellement de 10 à 110 secondes et la durée totale de l'électrophorèse est de 27 heures.

Nous utilisons comme marqueur de poids moléculaire une échelle de concatémères de phages Lambda allant de 50 Kb à 1000 Kb (Lambda Ladder PFG marker, SIGMA).

Pour l'analyse en Southern, l'ADN est transféré sur membrane Hybond-N+ de la manière suivante: après coloration au bromure d'éthidium, l'ADN est dépuriné dans du HCl 0.25 N pendant 8 minutes, puis neutralisé 30 minutes dans 0.5 M Tris HCl pH 7. Le transfert sur membrane est réalisé dans 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH. Après le transfert, la membrane est neutralisée dans du Tris-HCl 0.5 M, pH 7, puis rincée dans 2X SSC (0.33 M NaCl, 0.03 M $\text{Na}_3\text{citrate} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

II.3.11. ANALYSE EN SOUTHERN

Les marquages radioactifs des sondes au Phosphore-32 sont réalisés en utilisant le Kit RadPrimer DNA Labelling System (Life technologie). Pour chaque marquage, 60 ng de sonde ADN, portés à 21 ml avec de l'eau stérile, est préalablement dénaturé à 100°C pendant 10 minutes.

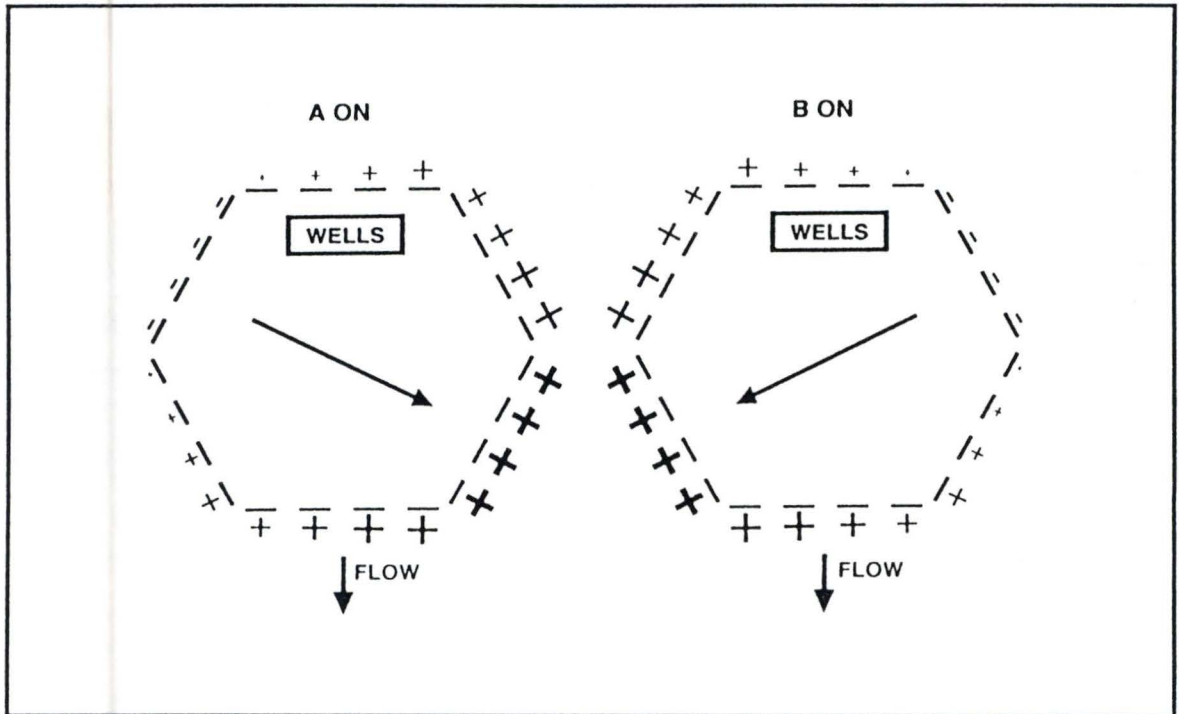


Figure II.8 bis : le système d'électrophorèse CHEF-DRIF.

Sont alors rajoutés à la sonde: 1 µl de dATP
1 µl de dGTP
1 µl de dTTP
20 µl de RadPrimer
1 µl d'enzyme Klenow
5 µl de dCTP radioactif.

Le volume total de 50 ml est soumis pendant 30 minutes à une température de 37°C. Après marquage, les sondes sont purifiées sur "spin colonne" (Current Protocols in Molecular Genetics, 3.4.). Les hybridations sont réalisées à 68°C dans une solution de blocage dans laquelle les membranes à hybrider ont été placées 3 heures au paravant.

Solution de blocage: 1.5 SSPE (3.6 M NaCl, 0.2 M Na₂HPO₄, 0.2 M EDTA)
1% SDS, 0.5% BLOTTO
500 mg/ml D'ADN dénaturé de sperme de saumon.

Les lavages sont réalisés à 68°C dans du 2 à 0.1X SSPE, 0.1% SDS. Les membranes sont placées en cassette avec un film KODAK BioMax MS après séchage sur papier Watman et mise sous plastique SARAN. Après un séjour à -70°C, le film est développé.

II.3.12. PURIFICATION SUR GEL D'ADN DE YAC

Ce protocole combine les avantages de ne pas exposer l'ADN du gel aux UV et de concentrer l'ADN dans un minimum d'agarose, tout en prenant garde de travailler dans des conditions les plus stériles possibles (Maule, Porteous, & Brookes, 1994).

Les blocs d'agarose contenant l'ADN de YAC sont premièrement rinçés dans du tampon TBE 0.5X stérile. Ils sont ensuite placés dans un gel Seakem GTG 0.5 % préparé dans du TBE 0,5X stérile.

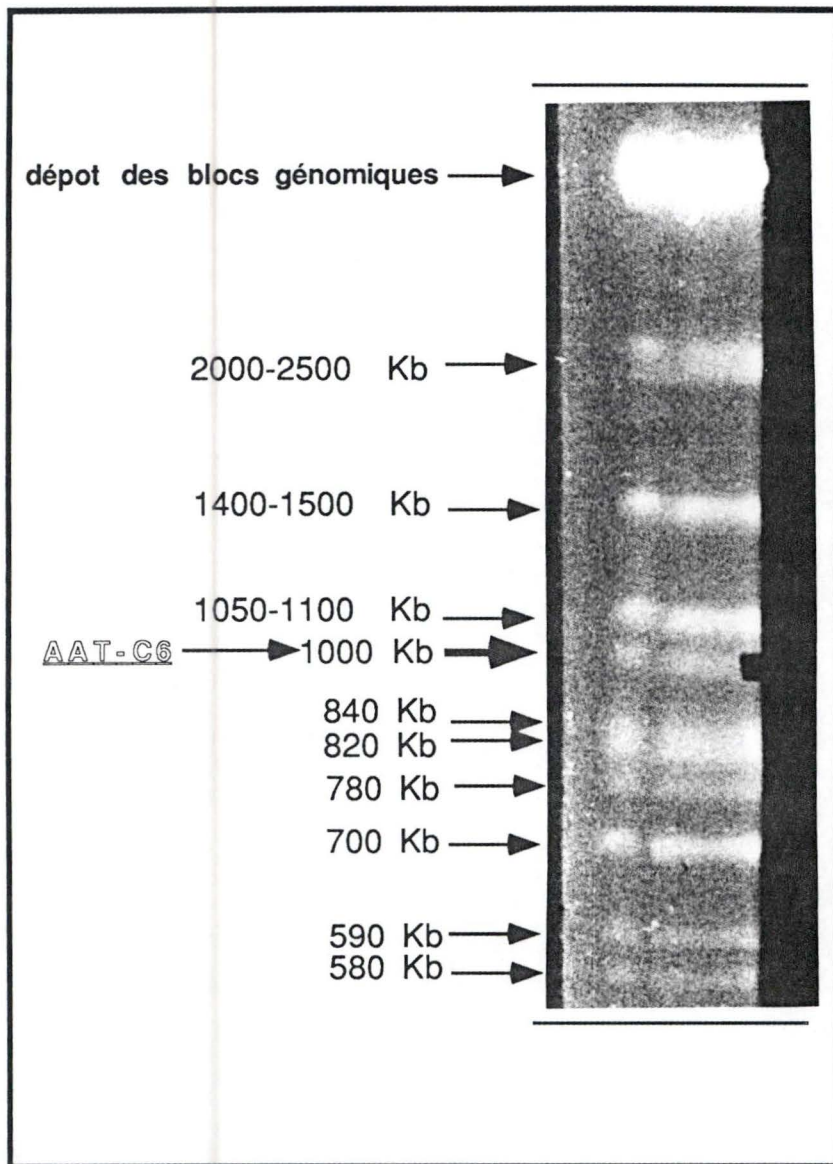


Figure II.9a : Séparation, par électrophorèse à champs pulsés, des chromosomes de la levure AB1380 contenant le YAC AAT-C6 et localisation de ce dernier.

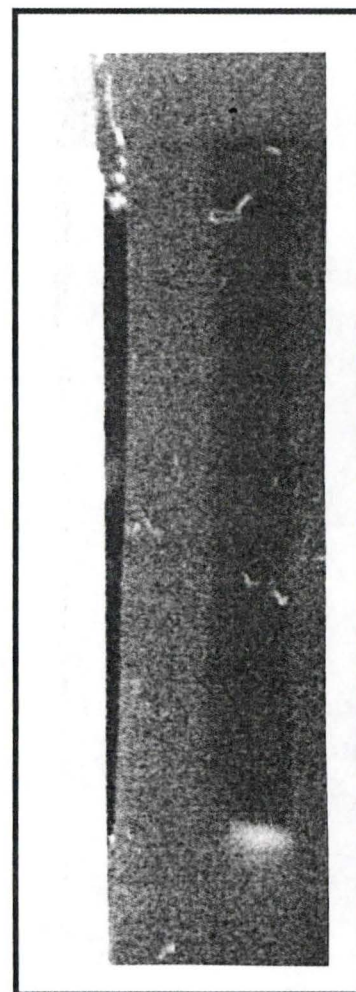


Figure II.9b :

Concentration du YAC AAT-C6 dans le gel NuSieve

L'électrophorèse à champs pulsés est lancée avec un temps de pulse de 60 secondes pendant 15 heures passant ensuite à 90 secondes pendant 8 heures. La température du tampon est de 6,5°C et le voltage de 200V. Ces conditions permettent une bonne séparation du YAC des autres chromosomes de levure.

Lorsque l'électrophorèse est finie, les bords du gel sont découpés avec une lame stérile et colorés au bromure d'éthidium. La position de la bande correspondant au YAC est repérée sous UV, le gel est reconstitué et la bande de YAC est coupée dans la partie non colorée à l'aide d'une lame stérile de façon à avoir une largeur de bande égale tout le long de celle-ci (Figure II.9a).

La bande de YAC est sectionnée afin d'obtenir des morceaux d'égales longueurs ayant 3 à 4 centimètres. Le restant du gel est coloré pour s'assurer que la découpe a été correcte. Une bande de chromosome de levure est prélevée au hasard et servira de contrôle pour la seconde migration.

Après avoir lavé soigneusement un appareil d'électrophorèse pour minigel, les bandes de YAC sont placées sur le support parallèlement au sens du courant électrique de même que la bande de chromosome contrôle. Un gel NuSieve GTG 4% (FMC) en TBE 0,5 X stérile est coulé autour des bandes et mis à migrer toute une nuit à 57 V dans du TBE 0,5 X à 4°C. L'ADN migre ainsi le long des bandes et se concentre dans un faible volume de NuSieve au bout de celles-ci. Ayant coupé la bande contrôle avec le gel NuSieve l'entourant, on peut repérer sous UV la qualité de la migration de même que la distance parcourue par l'ADN dans le NuSieve. L'ADN concentré de YAC est alors excisé du gel NuSieve (Figure II.9b).

Le bloc de NuSieve contenant le YAC est rincé dans une solution 100mM NaCl (2 fois 30 min à température ambiante (RT)). Le bloc est pesé et placé dans un tube de 5ml. Cependant, si le bloc fait plus de 500 mg, il vaut mieux répartir la masse de gel dans 2 tubes plutôt qu'un. le bloc est fondu à 67°C jusqu'à dissolution totale de l'agarose. La température du bain est ensuite abaissée à 40°C et on laisse le tube s'équilibrer à cette température pendant 10 minutes.

La β -agarase 1 de Calbiochem (0,2 U/ μ l) est ajoutée à raison de 10 U par ml de gel et le tout mis à incuber toute la nuit à 40°C.

EcoRI

5' NNNNNG|AATTCNNNNN 3'
3' NNNNNCTTAA|GNNNNN 5'



5' NNNNNG pAATTCNNNNN 3'
3' NNNNNCTTAAp GNNNNN 5'

HaeIII

5' NNNNNNGG|CCNNNNNN 3'
3' NNNNNNCC|GGNNNNNN 5'



5' NNNNNNGG pCCNNNNNN 3'
3' NNNNNNCCp GGNNNNNN 5'

Figure II.10 : Sites de restriction des enzymes EcoRI et HaeIII : le premier génère des "bouts cohésifs" alors que le second génère des "bouts francs".

A la fin de ce traitement, le tube est premièrement placé 10 min sur glace et deuxièmement centrifugé 15 min à la chambre froide pour culoter d'éventuels restants d'agarose. Le surnageant est récupéré. L'ADN de YAC est précipité en rajoutant au surnageant 2 volumes d'alcool absolu ainsi qu'un dixième de volume de NaAc 3M. L'ADN est lavé à l'éthanol 70 %, séché, resuspendu dans 30 μ l de TE 1X et conservé à 4°C.

II.3.13. LA REACTION DE RESTRICTION

Les endonucléases de restriction clivent l'ADN au niveau d'une courte séquence qui leur est spécifique et que l'on nomme "site de restriction". Les extrémités des fragments ainsi générés peuvent être de deux types (Figure 10):

-quand l'ADN est coupé de façon asymétrique, par l'enzyme EcoRI par exemple, on parle de "bouts collants" ou "bouts cohésifs".

-quand l'ADN est coupé de façon symétrique, par HaeIII par exemple, on parle de "bouts francs".

Quoiqu'il en soit, l'ADN possède toujours, après restriction, un groupement phosphate du côté 5'-terminal et un groupement hydroxyle du côté 3'-terminal.

II.3.13.1. Digestion d'ADN en solution

-la réaction s'effectue dans un volume de 50 μ l contenant :

- l'ADN à restreindre.
- le tampon de restriction 10x.
- l'enzyme de restriction : 1 unités par μ g d'ADN à restreindre.
- porter à volume avec de l'eau stérile.

-incuber une heure à la température optimale de l'endonucléase utilisée.

-stopper la réaction de restriction soit en chauffant 10 minutes pour les enzymes thermosensibles, soit en ajoutant un agent chélatant les ions Mg^{++} indispensables à la réaction (EDTA par exemple), soit par une extraction au phénol-chloroforme.

Tampons et enzymes de restriction utilisés dans ce travail:

- **BamHI** (Gibco-BRL) : 5'...G/GATC C...3'
3'...C CTAG/G...5'

à utiliser avec le tampon n°3 (Gibco-BRL) : Tris-HCl : 50 mM, pH 8.
MgCl₂ : 10 mM.
NaCl : 100mM.

- **MboI** (Gibco-BRL) : 5'.../GATC ...3'
3'... CTAG/...5'

à utiliser avec le tampon n°2 (Gibco-BRL) : - Tris HCl : 50 mM, pH 8.
- MgCl₂ : 10 mM.
- NaCl : 50 mM.

Ces deux enzymes sont des **isoschizomères**; leurs bouts collants respectifs pouvant être aisément ligués les uns avec les autres.

II.3.13.2. Digestion de blocs génomiques

La digestion de blocs génomiques nécessite 3 étapes essentielles.

- Les lavage des blocs

Ils sont réalisés 4 x 30 minutes dans du TE 1X (ou TEN 1X en fonction de l'enzyme à utiliser).

- L'équilibrage des blocs

Chaque bloc est équilibré pendant une heure dans le tampon de restriction (1X) spécifique à l'enzyme utilisée lors de la digestion.

- La digestion proprement dite

Chaque bloc est digéré, à la température adéquate, dans 300 µl de solution de restriction.

Cette solution de restriction varie d'une enzyme à l'autre.

Elle est composée: - du tampon adéquat (1X).

- de DDT (1mM).
- de spermidine (si nécessaire).
- de BSA (500 µg/ml) (si nécessaire).
- de l'enzyme de restriction (12 unités/bloc).
- porter à 300 µl avec de l'eau déionisée.

Remarque:

La concentration de spermidine varie en fonction de la concentration en sels du tampon:

- si la concentration en sels est supérieure à 100 mM, la concentration en spermidine nécessaire est de 10 mM.
- si la concentration en sels est inférieure à 100 mM, la concentration en spermidine nécessaire est de 5 mM.

Avant de lancer la digestion, les blocs soumis à leur solution de restriction, sont placés une heure dans la glace. Cette étape permet une diffusion préalable de l'enzyme dans le bloc d'agarose. La digestion est effectuée à la température adéquate (souvent 37 ou 50°C).

Tamppons et enzymes de restriction utilisés dans ce travail:

- **BssHII** (Gibco-BRL) : 5'...G/CGCG C...3'
3'...C GCGC/G...5'

à utiliser avec le tampon n°2 (Gibco-BRL) : - Tris HCl : 50 mM, pH 8.
- MgCl₂ : 10 mM.
- NaCl : 100 mM.

- **EagI** (Biolabs) : 5'...C/GGCC G...3'
3'...G CCGG/C...5'

à utiliser avec le tampon n°3 (Biolabs) : - Tris HCl : 50 mM, pH 7,9.
- MgCl₂ : 10 mM.
- NaCl : 100 mM.
- DTT : 1 mM.

- **MluI** (Biolabs) : 5'...A/CGCG T...3'
3'...T GCGC/A...5'

à utiliser avec le tampon n°3 (Biolabs) : - Tris HCl : 50 mM, pH 7,9.
- MgCl₂ : 10 mM.
- NaCl : 100 mM.
- DTT : 1 mM.

- **SalI** (Biolabs) : 5'...G/TCGA C...3'
3'...C AGCT/C...5'

à utiliser avec le tampon U (Biolabs) spécifique à cette enzyme auquel il faut rajouter du BSA (100µg/ml).

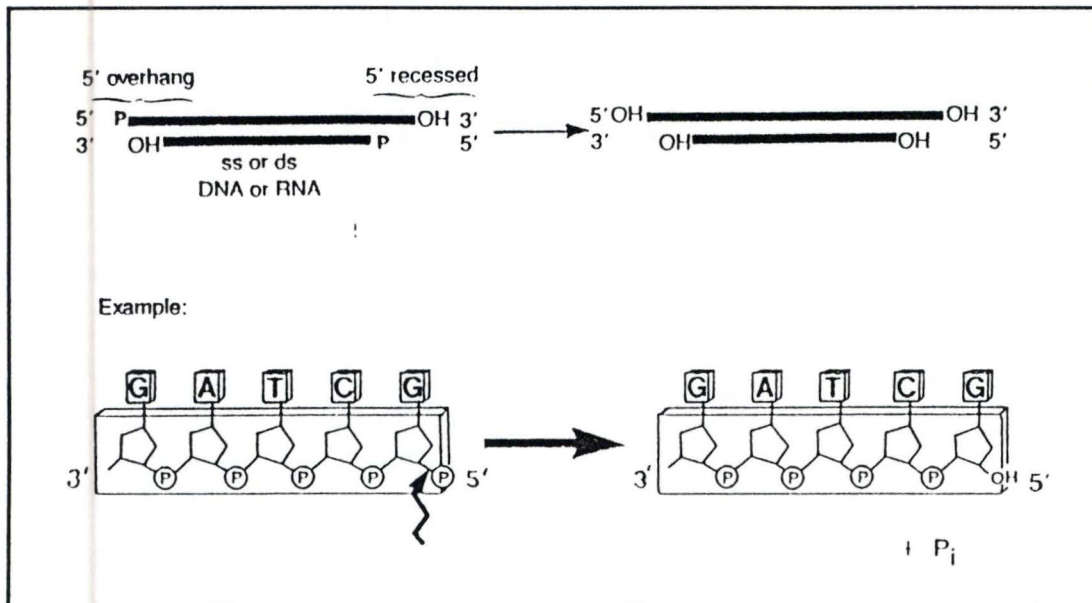


Figure II.11 : Hydrolyse des groupements phosphates de l'ADN.

- SfiI (Gibco-BRL) : 5'...GGCC N NNN/N GGCC...3'
 3'...CCGG N/NNN N CCGG...5'

à utiliser avec le tampon n°2 (Gibco-BRL) : - Tris HCl : 50 mM, pH 8.
 - MgCl₂ : 10 mM.
 - NaCl : 100 mM.

II.3.14. LA DEPHOSPHORYLATION D'UN VECTEUR LINEARISE

Après restriction, un vecteur linéarisé possède à ses extrémités des groupements 5'-phosphate et 3'-hydroxyle qui pourront très facilement, en présence de ligase, reformer les liens phosphodiester que la linéarisation avait rompus. L'hydrolyse des groupements phosphates (ou déphosphorylation) permet d'éviter cette réaction (**Figure II.11.**). La seule possibilité de recirculariser le plasmide linéaire est alors l'insertion d'un fragment non déphosphorylé.

En pratique :

- dans un volume de 100 µl, on place :
 - l'ADN restreint à déphosphoryler.
 - le tampon 10x.
 - 1 unité de CIAP (ou Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, Boehringer)
 - porter à volume avec de l'eau distillée.
- incuber 1 heure à 37°C.
- stopper la réaction avec 3 µl d'EDTA 500 mM.
- incuber 10 minutes à 68°C pour inactiver complètement la phosphatase alcaline.
- faire une extraction au phénol et une précipitation à l'éthanol pour purifier la préparation.

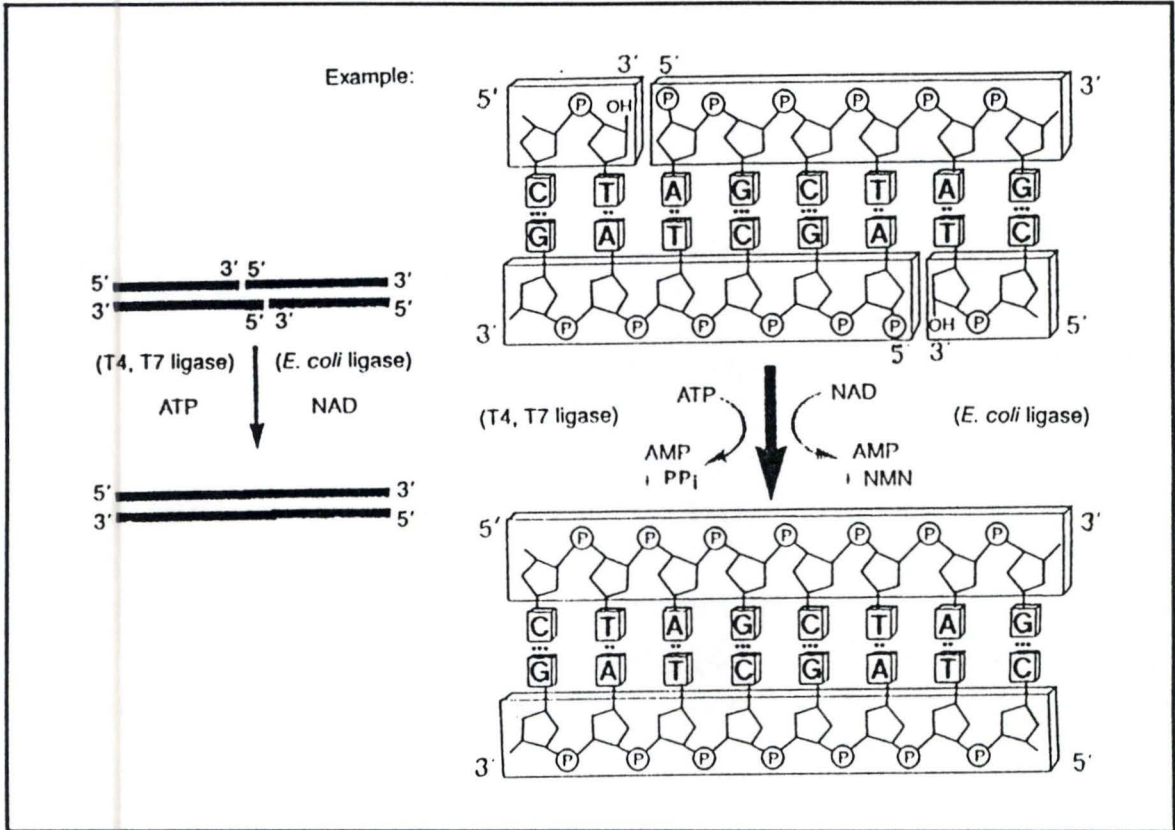


Figure II.12 : Activité de la DNA Ligase sur les "bouts cohésifs".

Tampon de déphosphorylation : -Tris pH8 : 200 mM.
 -MgCl₂ : 10 mM.
 -ZnCl₂ : 10 mM.

II.3.15. LA REACTION DE LIGATION

La construction de molécules d'ADN recombinant nécessite de lier de manière covalente les extrémités des fragments d'intérêt. L'enzyme T4 DNA Ligase permet cette réaction en catalysant la formation d'un lien phosphodiester entre l'hydroxyle 3' et le phosphate 5' des extrémités de l'ADN bicaténaire (Figure II.12.).

En pratique :

- dans un volume de 20 à 50 µl, on place :
 - le vecteur linéarisé et déphosphorylé.
 - le fragment à insérer.
 - le tampon de ligation.
 - 1 unité de Ligase (Gibco-BRL) par µg d'ADN à liguer.
 - porter à volume avec de l'eau distillée si nécessaire.
- pour la ligation de deux molécules à " bouts collants" (la faible température favorise la formation de ponts hydrogène), incuber à 14°C pendant 10 à 15 heures.

Remarque : Il s'agit ici de cloner un produit de digestion partielle; le rapport vecteur/insert doit, dès lors, être au moins égal à 1:1 et peut aller jusqu'à 3:1.

Tampon de ligation 5x (Gibco-BRL) : -Tris pH7,6 : 250 mM.
 -MgCl₂ : 50 mM.
 -DTT : 5 mM.
 -ATP : 5 mM.
 -PEG-8000 : 25%.

II.3.16. LA TRANSFORMATION DE BACTERIES

C'est l'étape qui permet l'introduction de molécules d'ADN exogènes dans un micro-organisme. Parmi les nombreuses techniques de transformation existantes, celle que nous avons utilisée ici est l'électroporation.

La compression qu'engendre un champ électrique appliqué à une membrane biologique favorise la perméabilisation momentanée de celle-ci, permettant ainsi le passage d'un plasmide si le voltage et la durée du choc sont suffisants. Il est très important de réduire la force ionique de la suspension cellulaire soumise à l'électroporation. On doit donc procéder à des lavages successifs de la culture avec un tampon de faible salinité ou simplement avec de l'eau. Après cette étape préliminaire, les cellules sont dites "compétentes". La phase de croissance à laquelle les cellules sont récoltées et la concentration cellulaire finale sont également en rapport avec la compétence à l'électroporation. Cette technique de transformation permet d'obtenir 10^9 à 10^{10} transformants par μg d'ADN.

Nous utilisons, au laboratoire, l'électroporateur "Gene Pulser" couplé au "Pulse Controller" de Bio-Rad.

II.3.16.1. Préparation de cellules électro-compétentes

- réaliser une préculture dans 5-10 ml de milieu LB.
 - incuber une nuit à 37°C.
 - inoculer 1 litre de LB avec 2 ml de la préculture.
 - incuber à 37°C avec agitation jusqu'à une DO comprise entre 0,5 et 0,8 (mesurée à 600 nm).
 - refroidir la culture sur glace pendant 15 à 30 minutes.
- attention:** à partir de cette étape, il est nécessaire de garder les cellules au maximum sur glace.
- centrifuger 10 minutes à 5000 rpm à froid (rotor Sorvall GSA).
 - retirer le plus possible de surnageant.

- resuspendre le culot dans 1 volume d'eau froide stérile.
- centrifuger 10 minutes à 5000 rpm à froid (rotor Sorvall GSA).
- resuspendre le culot dans 1/2 volume d'eau froide stérile.
- centrifuger 10 minutes à 5000 rpm à froid (rotor Sorvall GSA).
- resuspendre dans 20 ml de glycérol 10% froid.
- centrifuger 10 minutes à 5000 rpm à froid (rotor Sorvall GSA).
- resuspendre le culot dans 2 ml de glycérol 10% froid.
- aliquoter par 100 ml et stocker à -70°C.

II.3.16.2. L'électroporation

- laisser dégeler un aliquot de cellules du stock à -70°C sur glace.
- placer les cuvettes d'électroporation sur glace.
- mélanger dans un Eppendorf 40 µl de cellules avec 4 µl d'ADN plasmidique.
- transférer le mélange dans la cuvette d'électroporation et laisser sur glace.
- régler l'appareil (Gene Pulser) sur 25 mF ; 2,5 kV et 200 Ohms.
- placer la cuvette dans la chambre d'électroporation et électroporer.
- ajouter immédiatement 1 ml de milieu SOC ou de LB.
- transférer dans un Eppendorf et incuber 1 h à 37°C.
- étaier sur milieu sélectif et placer une nuit à 37°C.

<u>Milieu SOC :</u>	-Extrait de levure :	0,5%.
	-Bactotryptone :	2%.
	-NaCl :	10 mM.
	-KCl :	2,5 mM.
	-MgCl ₂ :	10 mM.
	-MgSO ₄ :	10 mM.
	-Glucose :	20 mM.

Quelques précisions sur le réglage de l'appareil à électroporation:

-la capacitance: 25 mF. C'est la valeur maximum que peut prendre l'appareil. La durée du choc électrique étant proportionnelle à la capacitance, on règle donc l'appareil pour avoir un choc aussi long que possible.

-le voltage: 2,5 kV. Il s'agit d'une valeur qui est un compromis entre la nécessité de créer des pores dans la membrane et la survie du plus grand nombre de cellules possible.

-la résistance: 200 Ohms. Cela correspond à la résistance de la solution contenue dans la cuvette d'électroporation.

II.3.17. TECHNIQUE DE MINI-PREP

Cette technique est utilisée pour préparer de petites quantité d'ADN. Dans ce travail, nous l'avons utilisée afin d'obtenir des plasmides pCRTMII contenant la sonde Cdk5.

- Une simple colonie est mise en culture toute une nuit dans 5 ml de milieu de culture LB (1X) contenant de l'ampicilline.
- A partir de cette culture, 1,5 ml de cellules sont prélevées et centrifugées 10 minutes à 4°C et à 2800 rpm.
- Le culot est resuspendu dans 200 µl de GTE froid et vortexé.
- Rajouter ensuite 400 µl de NaOH 0,2N - SDS 1% fraîchement préparé en faisant attention de ne pas réaliser cette manipulation sur la glace.
- Mélanger en inversant doucement.
- Rajouter 400 µl de KAc - HAC et centrifuger 15 min à 4°C et à 2800 rpm.
- Transférer 700 µl du surnageant dans un nouvel eppendorf et rajouter 350 µl de Phénol et 350 µl de CIAA.
- Agiter et centrifuger 5 min.
- Transférer 700 µl de la phase aqueuse dans un nouvel eppendorf, rajouter 700 µl d'Isopropanol (100 %) et laisser au moins 30 min à -20°C.
- Centrifuger 15 min à 4°C; l'ADN précipite et colle au fond de l'eppendorf.
- Evacuer l'Isopropanol, laver le culot à l'Ethanol 70 %, sécher, resuspendre dans 20 µl de TE (1X) et traiter à la RNase 30 min à 37 °C.

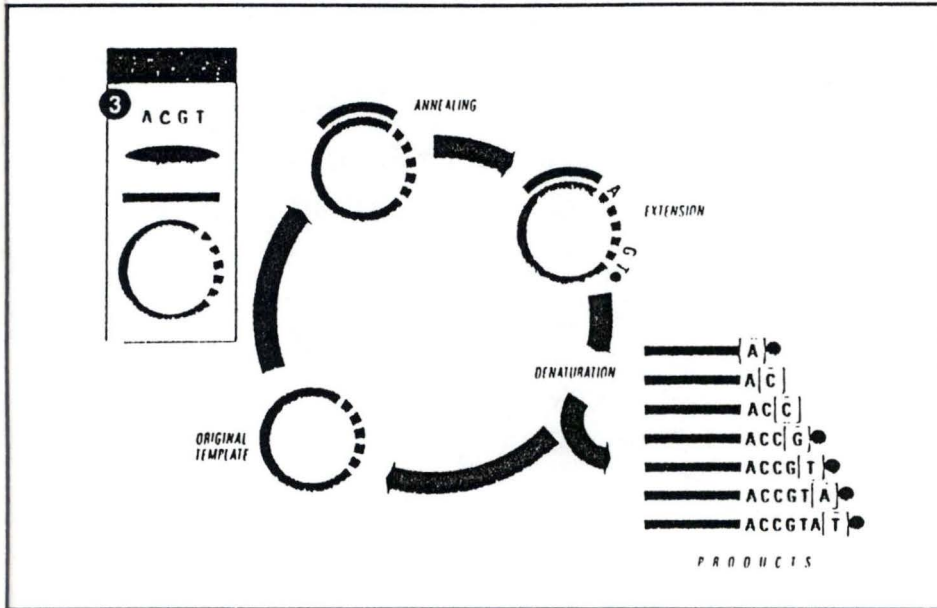


Figure II.13 : Réaction de "cycle sequencing".

II.3.18. LE SEQUENCAGE AUTOMATIQUE

Le séquençage automatique, comme le séquençage manuel, est basé sur la méthode des terminateurs de chaîne décrite par Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Cette méthode repose sur l'utilisation de 2'-3' didésoxyribonucléotides triphosphates ou ddNTPS. Ceux-ci se distinguent des précurseurs désoxynucléotidiques classiques par la substitution du groupe 3' hydroxyle par un hydrogène. Si ces ddNTPS sont parfaitement reconnus par l'ADN polymérase et donc incorporés dans la chaîne en croissance, ils agissent comme terminateurs de chaîne puisque l'absence d'hydroxyle empêche la création du lien phosphodiester suivant. En incorporant de tels monomères à la réaction, la terminaison se produira statistiquement au moins une fois à chaque nucléotide de la séquence. On obtient en fin de compte une population de fragments variables dont la taille permet de déterminer la position à laquelle le ddNTP a été incorporé.

Dans le cas du séquençage automatique, ces terminateurs de chaîne (ou "dye-terminators") sont marqués par des molécules fluorescentes qui émettent à une longueur d'onde précise lorsqu'on les excite avec un rayon laser. Chacune des quatre bases (A, C, G, T) est marquée par une molécule différente.

Le principe de la réaction de séquençage est montré à la **Figure II.13**. Il s'agit de réaliser une réaction PCR ("Cycle sequencing"), avec un seul primer, pour l'incorporation des dye-terminators. Les étapes successives de dénaturation, d'hybridation et d'extension ont pour résultat l'amplification linéaire (et non exponentielle, comme c'est le cas lorsqu'on utilise deux primers) des produits d'extension. Ces produits sont ensuite purifiés (par précipitation à l'éthanol) afin d'éliminer les terminateurs en excès, puis chargés sur un gel de polyacrylamide. La lecture de ce gel est ensuite exécutée par un logiciel afin de détecter les quatre couleurs correspondant à chaque base.

Remarque : alors que le séquençage manuel nécessite que la réaction se fasse dans quatre tubes différents, le séquençage automatique, lui, ne requiert qu'un seul tube. Les quatre couleurs (et donc les quatre bases) sont donc détectées dans une seule piste de gel.

Le séquenceur de notre laboratoire est un produit de la firme Perkin-Elmer (ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer) ; il permet de lire en moyenne 500 nucléotides avec une précision supérieure à 95%.

En pratique :

1) La réaction de Cycle Sequencing :

-la réaction se fait dans un volume de 10 µl :

Terminator Ready Reaction Mix :	4 µl.
Primer (1 mM) :	1,6 µl.
DNA Template (PCR product de 10 - 30 ng/µl) :	3 µl.

porter à 10 µl avec de l'eau stérile.

-ajouter environ 20 µl d'huile minérale dans le tube.

-placer le tube dans un appareil PCR et réaliser les cycles suivants :

- 1°) 96°C pendant 30 secondes.
- 2°) 50°C pendant 15 secondes.
- 3°) 60°C pendant 4 minutes.
- 4°) répéter 25 fois les 3 premières étapes.
- 5°) conserver le produit de la réaction à 4°C.

Terminator Ready Reaction Mix :

- A-dye terminator.
- T-dye terminator.
- C-dye terminator.
- G-dye terminator.
- dITP, dATP, dCTP, dTTP.
- Tris-HCl pH 9.
- MgCl₂.
- Pyrophosphatase thermostable.
- AmpliTAq DNA Polymérase, FS.

2) Purification des produits de la réaction :

- à chaque réaction, ajouter 1 μ l d'acétate de sodium 3M pH 4,6 et 25 μ l d'éthanol 95%.
- vortexer et mettre sur glace pendant 10 minutes.
- centrifuger pendant 30 minutes à 14.000 rpm (centrifuge 5415C).
- éliminer l'éthanol puis laver le culot avec 125 μ l d'éthanol 70%.
- éliminer l'éthanol puis sécher le culot sous vide.
- resuspendre ce culot dans 4 μ l de tampon de chargement.
- dénaturer cet échantillon pendant 2 minutes à 90°C.
- déposer 1,5 μ l de cet échantillon sur le gel de polyacrylamide.

Tampon de chargement : -formamide désionisé : 250 μ l.
-EDTA-Bleu dextran : 50 μ l.

Solution EDTA-Bleu dextran : -EDTA : 25 mM.
-Bleu dextran : 50 mg/ml.

II.3.19. MISE EN COLLECTION DE CLONES D'INTERET

Il s'agit de faire une culture de 5 ml d'une colonie isolée (dans du milieu LB-Amp). On incube à 37°C pendant 12 heures et on prélève ensuite 500 μ l de la culture que l'on mélange à 500 μ l de LB-Glycérol 40%. Ce mélange est ensuite stocké à -70°C.

Limites de confiance pour p N = 300-600

Distribution binomiale

N = nombre d'essais, x = nombre de succès, etc., $100 p_x = 100 x/N$

Les limites en italique sont exactes; les autres résultent de l'approximation de FERMAN et TURRY. Pour l'interpolation, voir la page 189

x	N = 300				N = 400				N = 500				N = 600							
	100(1 - 2α) limites		95%		100(1 - 2α) limites		95%		100(1 - 2α) limites		95%		100(1 - 2α) limites		95%					
	100 p _x	100 p _α	100 p _β	100 p _δ	100 p _x	100 p _α	100 p _β	100 p _δ	100 p _x	100 p _α	100 p _β	100 p _δ	100 p _x	100 p _α	100 p _β	100 p _δ				
0	0,00	0,00	1,22	0,00	1,75	0,00	0,00	0,92	0,00	1,12	0,00	0,00	0,74	0,00	1,03	0,00	0,00	0,61	0,00	0,88
1	0,33	0,01	1,84	0,00	2,43	0,23	0,01	1,38	0,00	1,84	0,20	0,01	1,11	0,00	1,48	0,17	0,00	0,93	0,00	1,33
2	0,67	0,08	2,39	0,03	3,03	0,50	0,06	1,79	0,03	2,70	0,40	0,03	1,44	0,02	1,84	0,33	0,04	1,20	0,02	1,54
3	1,00	0,21	2,89	0,11	3,61	0,73	0,16	2,18	0,08	2,70	0,60	0,12	1,74	0,07	2,18	0,50	0,10	1,43	0,06	1,82
4	1,33	0,36	3,38	0,23	4,14	1,00	0,27	2,54	0,17	3,11	0,80	0,22	2,04	0,14	2,50	0,67	0,18	1,70	0,11	2,08
5	1,67	0,53	3,88	0,30	4,59	1,25	0,40	2,92	0,23	3,46	1,00	0,32	2,34	0,18	2,77	0,83	0,26	1,95	0,15	2,31
6	2,00	0,73	4,33	0,45	5,08	1,50	0,54	3,26	0,34	3,83	1,20	0,43	2,61	0,27	3,07	1,00	0,36	1,78	0,23	2,56
7	2,33	0,93	4,77	0,62	5,56	1,75	0,70	3,59	0,46	4,19	1,40	0,56	2,88	0,37	3,36	1,17	0,46	2,40	0,31	2,80
8	2,67	1,15	5,21	0,80	6,03	2,00	0,86	3,92	0,60	4,54	1,60	0,69	3,14	0,48	3,64	1,33	0,57	2,22	0,40	3,04
9	3,00	1,37	5,64	0,99	6,49	2,25	1,03	4,25	0,74	4,89	1,80	0,82	3,40	0,59	3,92	1,50	0,68	2,04	0,49	3,27
10	3,33	1,60	6,07	1,19	6,94	2,50	1,20	4,57	0,89	5,23	2,00	0,96	3,66	0,71	4,20	1,67	0,80	3,86	0,59	3,50
11	3,67	1,84	6,49	1,39	7,39	2,75	1,37	4,88	1,04	5,57	2,20	1,10	3,92	0,83	4,47	1,83	0,91	3,27	0,69	3,73
12	4,00	2,08	6,90	1,60	7,83	3,00	1,55	5,20	1,20	5,90	2,40	1,24	4,17	0,96	4,74	2,00	1,03	3,48	0,79	3,95
13	4,33	2,32	7,32	1,82	8,27	3,25	1,74	5,51	1,36	6,23	2,60	1,39	4,42	1,08	5,00	2,17	1,15	3,69	0,90	4,18
14	4,67	2,57	7,73	2,04	8,70	3,50	1,92	5,82	1,52	6,56	2,80	1,54	4,67	1,22	5,26	2,33	1,28	3,89	1,01	4,39
15	5,00	2,82	8,13	2,26	9,13	3,75	2,11	6,12	1,69	6,88	3,00	1,69	4,91	1,35	5,52	2,50	1,40	4,10	1,12	4,61
16	5,33	3,08	8,53	2,49	9,55	4,00	2,30	6,43	1,86	7,20	3,20	1,84	5,16	1,49	5,78	2,67	1,53	4,30	1,24	4,83
17	5,67	3,33	8,94	2,72	9,98	4,25	2,49	6,73	2,03	7,52	3,40	1,99	5,40	1,62	6,04	2,83	1,66	4,51	1,35	5,04
18	6,00	3,59	9,33	2,96	10,39	4,50	2,69	7,03	2,21	7,84	3,60	2,14	5,64	1,76	6,29	3,00	1,78	4,71	1,47	5,26
19	6,33	3,85	9,73	3,20	10,81	4,75	2,88	7,33	2,39	8,15	3,80	2,30	5,88	1,91	6,55	3,17	1,91	4,91	1,59	5,47
20	6,67	4,12	10,12	3,44	11,22	5,00	3,08	7,63	2,57	8,47	4,00	2,46	6,12	2,05	6,80	3,33	2,05	5,11	1,71	5,68
21	7,00	4,38	10,52	3,69	11,63	5,25	3,28	7,93	2,75	8,78	4,20	2,62	6,36	2,20	7,05	3,50	2,18	5,31	1,83	5,89
22	7,33	4,65	10,91	3,93	12,04	5,50	3,48	8,22	2,94	9,09	4,40	2,78	6,60	2,34	7,30	3,67	2,31	5,51	1,95	6,09
23	7,67	4,92	11,30	4,18	12,45	5,75	3,68	8,51	3,12	9,39	4,60	2,94	6,83	2,49	7,54	3,83	2,44	5,70	2,07	6,30
24	8,00	5,19	11,68	4,43	12,85	6,00	3,88	8,81	3,31	9,70	4,80	3,10	7,07	2,64	7,79	4,00	2,58	5,90	2,19	6,51
25	8,33	5,47	12,07	4,69	13,25	6,25	4,08	9,10	3,50	10,00	5,00	3,26	7,30	2,79	8,03	4,17	2,71	6,10	2,32	6,71
26	8,67	5,74	12,45	4,94	13,65	6,50	4,29	9,39	3,69	10,31	5,20	3,42	7,54	2,94	8,28	4,33	2,85	6,29	2,45	6,92
27	9,00	6,02	12,84	5,20	14,05	6,75	4,49	9,68	3,88	10,61	5,40	3,59	7,77	3,09	8,52	4,50	2,99	6,49	2,57	7,12
28	9,33	6,29	13,22	5,46	14,45	7,00	4,70	9,97	4,07	10,91	5,60	3,75	8,00	3,25	8,76	4,67	3,12	6,68	2,70	7,32
29	9,67	6,57	13,60	5,72	14,84	7,25	4,91	10,26	4,27	11,21	5,80	3,92	8,23	3,40	9,01	4,83	3,26	6,88	2,83	7,53
30	10,00	6,85	13,98	5,98	15,24	7,50	5,12	10,54	4,46	11,51	6,00	4,08	8,46	3,56	9,25	5,00	3,40	7,07	2,96	7,73
31	10,33	7,13	14,36	6,25	15,63	7,75	5,33	10,83	4,66	11,81	6,20	4,25	8,69	3,71	9,49	5,17	3,54	7,26	3,09	7,93
32	10,67	7,41	14,74	6,51	16,02	8,00	5,54	11,12	4,85	12,10	6,40	4,42	8,92	3,87	9,72	5,33	3,68	7,45	3,22	8,13
33	11,00	7,70	15,11	6,78	16,41	8,25	5,75	11,40	5,05	12,40	6,60	4,59	9,15	4,03	9,96	5,50	3,82	7,64	3,35	8,33
34	11,33	7,98	15,49	7,05	16,80	8,50	5,96	11,69	5,25	12,69	6,80	4,76	9,38	4,19	10,20	5,67	3,96	7,84	3,48	8,52
35	11,67	8,27	15,86	7,32	17,18	8,75	6,17	11,97	5,45	12,99	7,00	4,92	9,61	4,35	10,44	5,83	4,10	8,03	3,61	8,72
36	12,00	8,55	16,24	7,59	17,57	9,00	6,38	12,25	5,65	13,28	7,20	5,09	9,84	4,51	10,67	6,00	4,24	8,22	3,75	8,92
37	12,33	8,84	16,61	7,86	17,95	9,25	6,60	12,53	5,86	13,57	7,40	5,26	10,06	4,67	10,91	6,17	4,38	8,41	3,88	9,12
38	12,67	9,13	16,98	8,13	18,34	9,50	6,81	12,82	6,06	13,86	7,60	5,43	10,29	4,83	11,14	6,33	4,52	8,60	4,01	9,31
39	13,00	9,42	17,35	8,41	18,72	9,75	7,03	13,10	6,26	14,15	7,80	5,61	10,52	4,99	11,38	6,50	4,66	8,79	4,15	9,51
40	13,33	9,71	17,72	8,68	19,10	10,00	7,24	13,38	6,47	14,44	8,00	5,78	10,74	5,15	11,61	6,67	4,81	8,97	4,28	9,71
41	13,67	10,00	18,09	8,96	19,48	10,25	7,46	13,66	6,67	14,73	8,20	5,95	10,97	5,32	11,84	6,83	4,95	9,16	4,42	9,90
42	14,00	10,29	18,46	9,23	19,86	10,50	7,68	13,94	6,88	15,02	8,40	6,12	11,19	5,48	12,08	7,00	5,09	9,35	4,55	10,10
43	14,33	10,58	18,83	9,51	20,24	10,75	7,89	14,21	7,08	15,31	8,60	6,30	11,42	5,64	12,31	7,17	5,24	9,54	4,69	10,29
44	14,67	10,87	19,20	9,79	20,62	11,00	8,11	14,49	7,29	15,59	8,80	6,47	11,64	5,81	12,54	7,33	5,38	9,73	4,83	10,48
45	15,00	11,16	19,56	10,07	20,99	11,25	8,33	14,77	7,50	15,88	9,00	6,64	11,86	5,97	12,77	7,50	5,52	9,91	4,96	10,68
46	15,33	11,46	19,93	10,35	21,37	11,50	8,55	15,05	7,71	16,17	9,20	6,82	12,09	6,14	13,00	7,67	5,67	10,10	5,10	10,87
47	15,67	11,75	20,29	10,63	21,74	11,75	8,77	15,33	7,92	16,45	9,40	6,99	12,31	6,31	13,23	7,83	5,81	10,29	5,24	11,06
48	16,00	12,05	20,66	10,92	22,12	12,00	8,99	15,60	8,13	16,74	9,60	7,17	12,53	6,47	13,46	8,00	5,96	10,47	5,38	11,26
49	16,33	12,34	21,02	11,20	22,49	12,25	9,21	15,88	8,34	17,02	9,80	7,34	12,76	6,64	13,69	8,17	6,10	10,66	5,52	11,45
50	16,67	12,64	21,39	11,48	22,86	12,50	9,43	16,15	8,55	17,30	10,00	7,52	12,98	6,81	13,92	8,33	6,25	10,84	5,66	11,64
60	20,00	15,63	24,99	14,37	26,55	15,00	11,65	18,89	10,68	20,11	12,00	9,29	15,18	8,50	16,18	10,00	7,72	12,69	7,06	13,54
70	23,33	18,68	28,55	17,32	30,16	17,50	13,91	21,59	12,86	22,87	14,00	11,08	17,36	10,23	18,42	11,67	9,21	14,51	8,50	15,41
80	26,67	21,76	32,06	20,32	33,73	20,00	16,20	24,27	15,08	25,60	16,00	12,90	19,52	11,99	20,62	13,33	10,72	16,32	9,95	17,26
90	30,00	24,89	35,54	23,37	37,25	22,50	18,51	26,92	17,33	28,30	18,00	14,74	21,66	13,77	22,80	15,00	12,24	18,12	11,43	19,09
100	33,33	28,04	38,99	26,46	40,73	25,00	20,84	29,55	19,61	30,96	20,00	16,59	23,78	15,58	24,97	16,67	13,78	19,90	12,92	20,91
110	36,67	31,22	42,40	29,59	44,17	27,50	23,19	32,16	21,91	33,61	22,00	18,45	25,90	17,40	27,11	18,33	15,22	21,67	14,43	22,71
120	40,00	34,44	45,79	32,76	47,57	30,00	25,56	34,76	24,23	36,23	24,00	20,33	28,00	19,23	29,24	20,00	16,87	23,43	15,95	24,51
130	43,33	37,67	49,15	35,97	50,93	32,50	27,94	37,34	26,57	38,83	26,00	22,21	30,08	21,						

II.4. ETABLISSEMENT D'UNE CARTE GENETIQUE

II.4.1. CALCUL DU POURCENTAGE DE RECOMBIAISON

Le pourcentage de recombinaison r est la proportion d'animaux recombinants (n) parmi N méioses analysées de sorte que $r = (n / N) \times 100$.

D'un point de vue statistique, le calcul des pourcentages de recombinaison est décrit comme une variable binomiale. Pour les valeurs de r basses, l'approximation normale n'est pas valable pour le calcul des intervalles de confiance. L'intervalle de confiance à 95% est calculé par interpolation à partir des tables scientifiques de Geigy (Table II.1) en appliquant les formules suivantes.

$$100p_g = 100p^*g + \frac{N-N_1}{N_2-N_1} (100p^{**}g - 100p^*g)$$

$$100p_d = 100p^*d + \frac{N-N_1}{N_2-N_1} (100p^{**}d - 100p^*d)$$

Avec N , le nombre de méioses analysées, N_1 et N_2 les valeurs les plus proches dans les tables scientifiques. Les valeurs notées $*$ sont celles trouvées dans les tables scientifiques pour N_1 , et celles notées $**$ pour N_2 .

$100p_d$ correspond à la limite supérieur de l'intervalle de confiance à 95% et $100p_g$ correspond à la limite inférieure de cet intervalle; c'est-à-dire que le pourcentage de recombinaison observé a 95% de chance de se retrouver entre ces deux valeurs.

RESULTATS
ET
DISCUSSION

III. RESULTATS ET DISCUSSION

L'allèle *Albany 1* fut induit par mutagenèse au chlorambucil. Cet agent mutagène induit des réarrangements chromosomiques caractérisés le plus souvent par des délétions relativement importantes. Afin de définir la mutation chez cet allèle, notre première démarche est de la localiser.

III.1. ANALYSE PAR RT-PCR DE L'ADNc DE ReIn^{Alb1}

Des analyses par Northern effectuées précédemment montrent que l'ARNm de la reelin chez le mutant ReIn^{Alb1} est exprimé en trop faible quantité pour être décelable. Cependant, grâce à la technique de RT-PCR, il s'avère possible d'amplifier suffisamment de fragments de cet ARNm pour le rendre analysable. Une étude comparative de l'ADNc de l'allèle muté et de l'allèle sauvage permettra de localiser la mutation sur le messenger si, bien sûr, elle s'y trouve.

L'amplification de l'ADNc de ReIn^{Alb1} ainsi que de l'allèle sauvage, a été réalisée en deux étapes.

- Une transcription reverse (RT) sur les ARNs messagers totaux.
- Une amplification par PCR de l'ADNc grâce à l'utilisation de paires d'amorces spécifiques.

III.1.1. CHOIX DES AMORCES

Les amorces utilisées lors de l'amplification PCR ont été déterminées sur base de la séquence de l'ADNc de Reelin disponible dans la banque de séquences nucléotidiques (Genbank #U24703) (**Annexe 1**). Leur fiabilité a été vérifiée lors de l'analyse, par cette même technique, du mutant ReIn^{Alb2}.

Elles sont généralement distantes de 120 à 600 bp et leur taille varie de 18 à 30 bp (Annexe 2). L'addition de l'ensemble des produits d'amplification obtenus permet de couvrir l'entièreté de la séquence de Reelin.

III.1.2. PREPARATION DE L'ADNc

L'ADNc de ces deux allèles a été obtenu par une RT-PCR sur de l'ARN de cellules de cerveau de souris. Cet ARN a été extrait, pour les souris homozygotes normales, au stade Po (c'est-à-dire au premier jour après la naissance) et chez les souris homozygotes *Albany 1*, environ une quinzaine de jours après la naissance, au moment où le phénotype *reeler* devient détectable.

III.1.3. AMPLIFICATION PAR PCR DE L'ADNc

L'analyse de l'ADNc de mutants souris *Albany 1* est réalisée en parallèle avec celle de l'ADNc de souris normales. Chaque amplification est toujours effectuée avec une concentration constante d'ADNc, de l'ordre de 20 ng/ μ l. La taille de l'ADNc à analyser est d'environ 12 Kb. Après migration sur gel d'agarose 1%, le produit d'amplification de chacun des allèles est révélé par coloration au bromure d'éthidium. Une différence de migration, ou l'absence du produit d'amplification de l'allèle muté, peut révéler l'existence de la mutation à cet endroit. L'ensemble de l'ADNc de Reelin a été étudié par la technique de RT-PCR.

La première étape de cette approche consistait à analyser l'ADNc dans sa quasi-totalité en délaissant toutefois les 600 premières paires de bases de la séquence. En effet, la partie 5' du messenger étant riche en nucléotides G et C, les conditions classiques de dénaturation, lors de la PCR, se sont révélées insuffisantes.

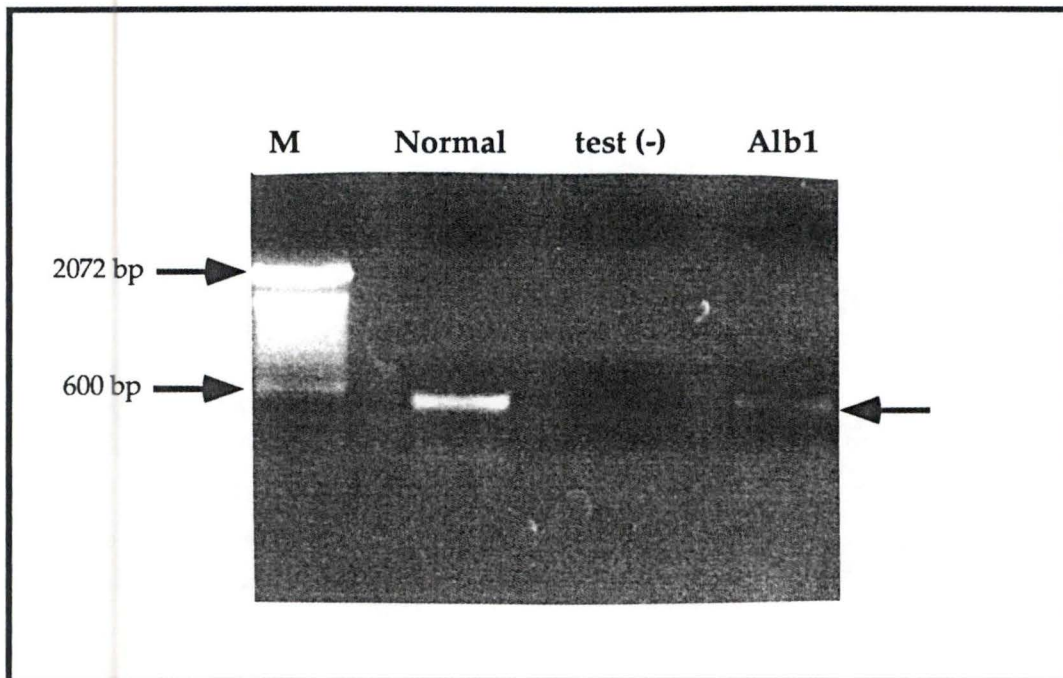


Figure III.1 : La différence d'intensité entre la bande de l'allèle sauvage (normal) et celle de la bande mutante (Alb1) montre que l'expression du gène est diminuée chez le mutant.

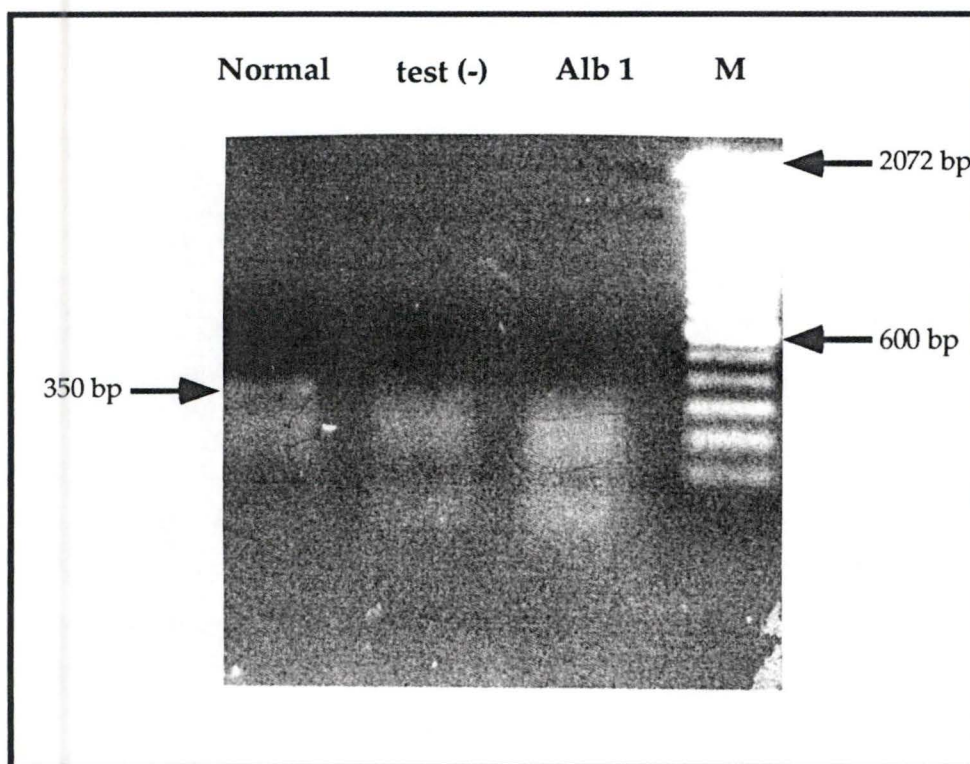


Figure III.2: Amplification du fragment UPA-Signal 2 (350 bp)

La bande attendue semble apparaître chez l'allèle sauvage(normal) mais pas chez l'allèle mutant (Alb 1).

Discussion

Aucune anomalie chez le mutant *Reln^{Alb1}* n'a été détectée dans cette zone. Il est cependant intéressant de constater que la quantité du produit d'amplification de l'allèle *Albany 1* est beaucoup plus faible que la quantité de l'allèle sauvage (Figure III.1). Ces résultats, en parfaite corrélation avec les analyses par Northern où l'ARNm est indétectable, nous permettent d'affirmer que l'expression du gène est fortement atténuée chez le mutant *Reln^{Alb1}*.

III.1.4. MODIFICATION DES CONDITIONS PCR

Lors de nos premières manipulations, réalisées aux conditions classiques de PCR, des amorçages vraisemblablement non spécifiques rendaient impossible l'analyse du messager en sa partie 5'. Caractérisée par la présence d'un îlot CpG s'étendant jusqu'au premier exon inclus, cette zone soumise à une température de dénaturation plus élevée, passant de 94 à 98°C, s'est certainement déhybridée avec plus de facilité rendant les sites spécifiques d'hybridation accessibles aux amorces. L'analyse sur gel d'agarose (1%) de chaque RT-PCR nous a permis de détecter, dans la majeure partie des cas, un produit de la taille attendue. Cependant, une absence d'amplification de l'extrémité 5' de l'ADNc mutant, appelé fragment UPA-Signal 2 (350 bp), pourrait évoquer une délétion éventuelle (Figure III.2).

Discussion

Les résultats obtenus sont encourageants mais nous émettons toutefois certaines réserves.

- Premièrement, le produit amplifié chez l'allèle sauvage est de faible concentration. Or, si l'on tient compte que l'ARNm *reeler* est, à l'origine, exprimé en plus faible quantité que l'ARNm sauvage, il est probable que le produit *Albany 1* ne soit pas suffisamment amplifié pour être détectable sur gel.

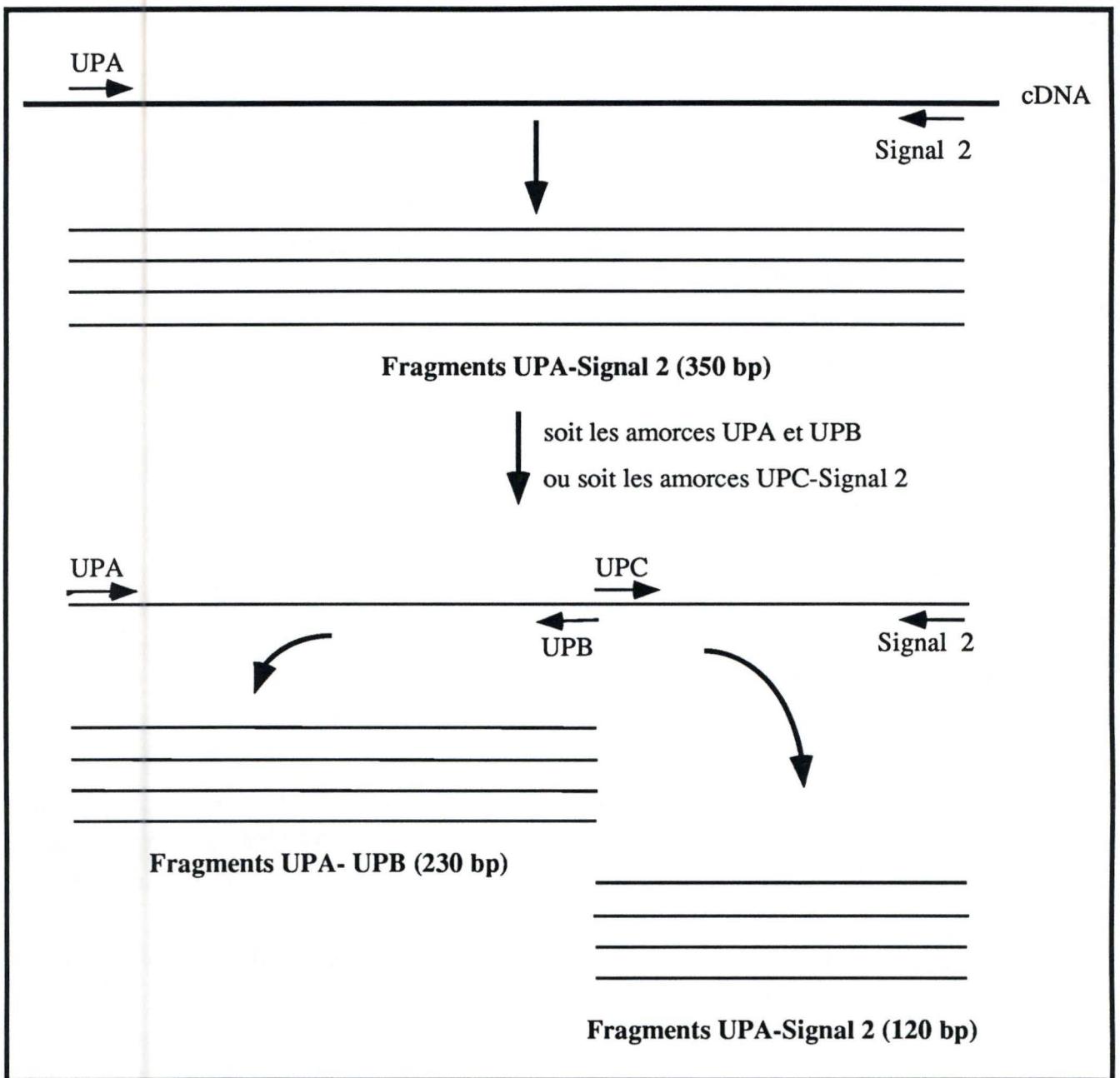


Figure III.3 : Amplification du fragment UPA-Signal 2 par PCR nichée.

- Deuxièmement, la présence de "smears" laisse présager que l'hybridation n'est pas encore complètement spécifique. Par conséquence, si les amorces peuvent s'hybrider ailleurs, l'obtention du produit attendu sera plus délicate et nécessitera, pour être visible sur gel, beaucoup plus de cycles d'amplification.

Une "sur-amplification" de ce produit PCR mutant et sauvage, par la technique de PCR nichée, nous permettra de vérifier ces résultats.

III.1.5 AMPLIFICATION PAR PCR NICHEE

L'approche effectuée nous permet de vérifier si l'absence sur gel de la bande attendue chez le mutant est due à une trop faible concentration du produit d'amplification ou bien, à l'absence pure et simple d'amplification. Le produit PCR "UPA-Signal 2", préalablement dilué 200 X, sert de matrice à la PCR suivante. Des amorces internes à ce produit sont définies et appelées UPB et UPC. A partir de ces nouvelles amorces et des amorces UPA et Signal 2, deux nouveaux fragments peuvent être amplifiés. Nous les nommerons "UPA-UPB" et "UPC-Signal 2" (figure III.3) ayant respectivement comme taille 230 bp et 120 bp.

Discussion

Comme attendu, après migration sur gel, les bandes, de taille correcte, apparaissent chez l'allèle sauvage mais nous constatons qu'aucune amplification ne s'est effectuée chez le mutant (Figure III.4a et III.4b). Ces résultats confirment bien que l'amplification, à partir de l'ADNc mutant, du fragment "UPA-Signal 2" ne s'est pas déroulée lors de la PCR précédente.

Cependant, ces résultats se sont avérés ultérieurement non reproductibles. En effet, d'autres RT-PCR effectuées avec ces mêmes amorces ont permis, dans les mêmes conditions PCR, d'amplifier les fragments de taille attendue aussi bien chez l'allèle mutant que chez l'allèle sauvage (Figure III.5a et III.5b).

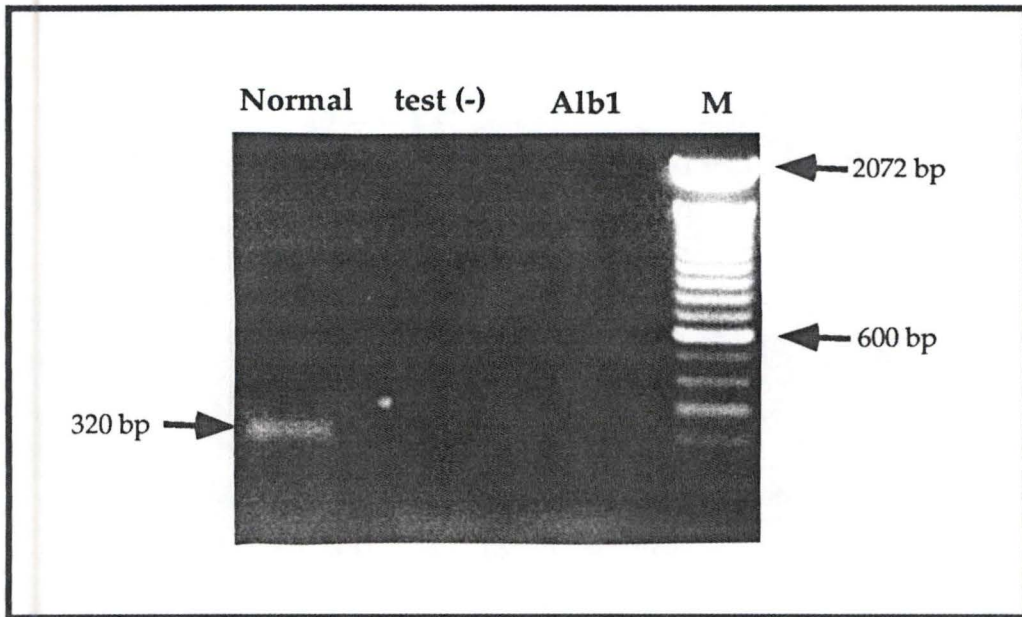


Figure III.4 a : Amplification par PCR nichée du fragment UPA-UPB (230 bp).
Aucune bande n'apparaît chez l'allèle mutant (Alb 1) !

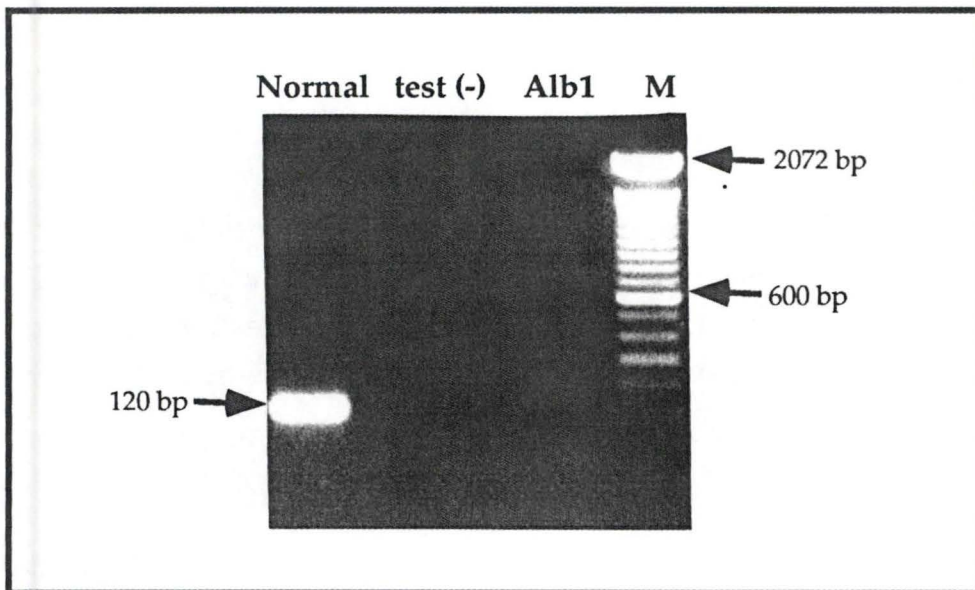


Figure III.4 b : Amplification par PCR nichée du fragment UPC-Signal 2 (120 bp).
Aucune bande n'apparaît chez l'allèle mutant (Alb 1) !

De plus, lorsqu'une partie de la séquence du promoteur fut établie suite à une PCR-Vectorette, technique discutée plus loin, une amorce, appelée CplUPF, spécifique de ce promoteur fut définie. Grâce à cette amorce, une PCR sur ADN génomique normal et *Albany 1* a été réalisée. Cette PCR a permis d'amplifier un fragment appelé "CplUPF-Signal 2", d'une taille d'environ 400 bp. Ce produit PCR s'est révélé identique chez les deux allèles étudiés (**Figure III.6**).

La technique de RT-PCR est très simple d'utilisation mais nécessite néanmoins des conditions très strictes. Les difficultés rencontrées lors de l'analyse de l'extrémité 5' de l'ADNc *reeler* sont certainement dues à la présence massive de nucléotides G et C dans cette zone rendant la dénaturation des deux brins d'ADN très ardue.

Nous n'avons pas mis en évidence, lors de l'analyse complète par RT-PCR du messenger *reeler*, une quelconque anomalie. Il nous semble donc que la mutation chez *Reln^{Alb1}* n'affecte pas le messenger. Toutefois, même si cela s'avère très peu probable, nous ne pouvons pas affirmer qu'il n'existe pas de mutation ponctuelle au sein de ce message. La technique de SSCP (Orita *et al.*, 1989) permettrait sans doute de le vérifier.

III.2. ANALYSE DU GENE *Reln^{Alb1}* SUR ADN GENOMIQUE

N'ayant pu localiser la mutation dans le messenger *reeler*, nous avons émis l'hypothèse que celle-ci pourrait affecter un site nécessaire à l'expression correcte du gène. En effet, la transcription d'un gène est régie par une multitude de protéines ayant chacune une fonction bien établie et un site d'action spécifique; la disparition d'un de ces sites pouvant être suffisante pour faire apparaître le phénotype *reeler*.

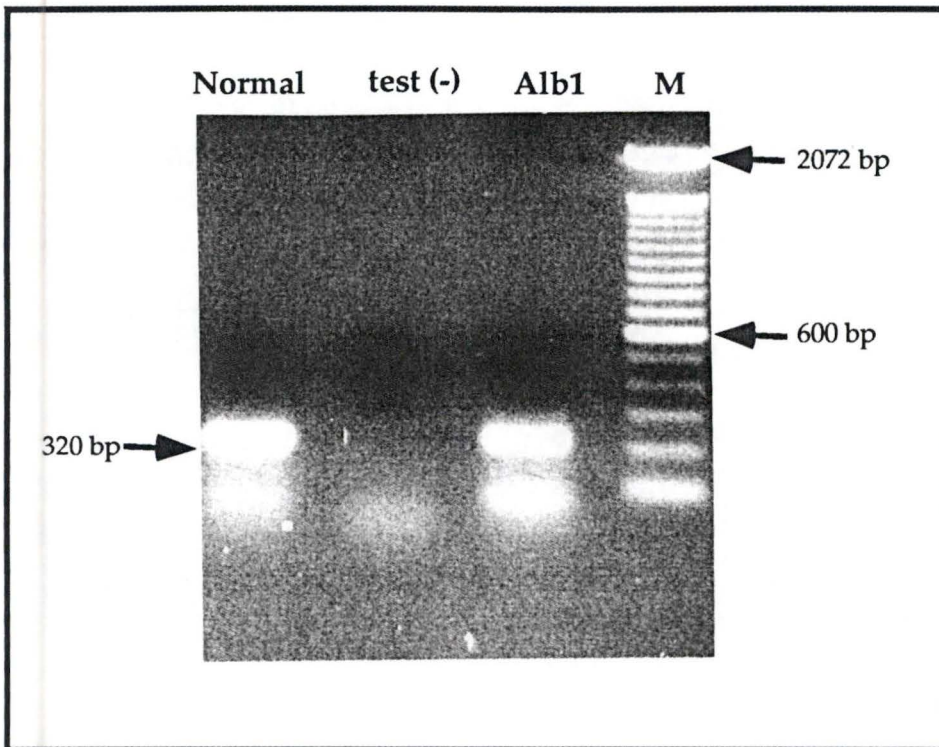


Figure III.5 a : Amplification par PCR nichée du fragment UPA-UPB (230 bp).
Une bande apparaît chez l'allèle mutant (Alb 1) !

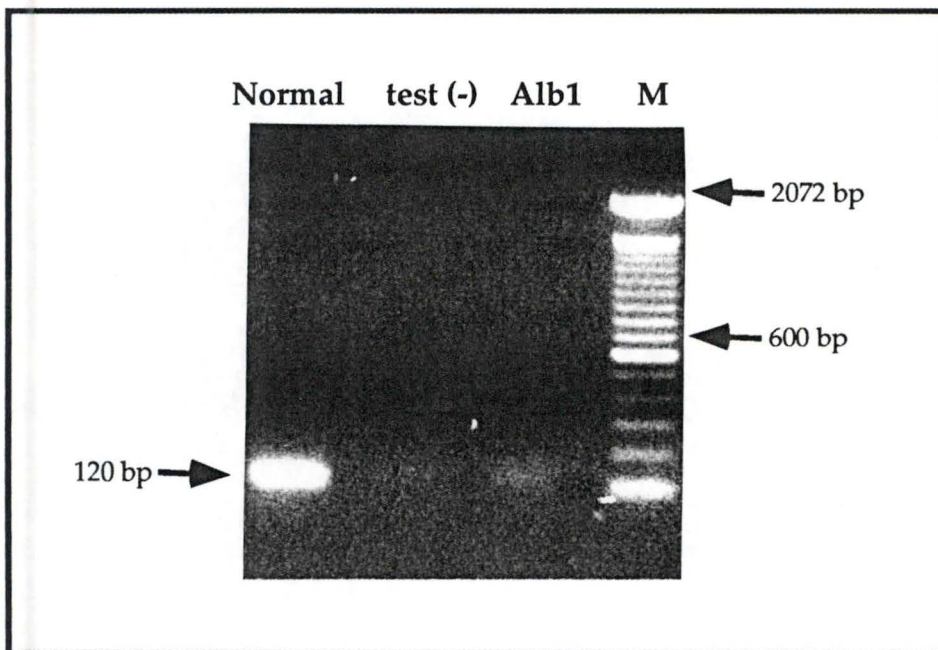


Figure III.5 b : Amplification par PCR nichée du fragment UPC-Signal 2 (120 bp).
Une bande apparaît chez l'allèle mutant (Alb 1) !

Pareille recherche est relativement ardue car les connaissances actuelles que nous avons de ces zones activatrices, appelée "enhancer", sont excessivement limitées. Par exemple, aucun renseignement sur le promoteur du gène n'est disponible et les zones introniques, susceptibles de contenir des sites d'activation, sont à peine déterminées.

Toujours par comparaison avec l'allèle sauvage, notre approche a été d'analyser, par Southern sur de l'ADN génomique digéré, des zones susceptibles de contenir une délétion produite par le chlorambucil

III.2.1. PREPARATION D'ADN GENOMIQUE EN BLOCS D'AGAROSE.

La préparation d'ADN génomique en bloc d'agarose a été réalisée à partir de souris adultes BALBc et de souris homozygotes *Albany 1* âgées d'une quinzaine de jours. La rate des animaux est prélevée et les tissus homogénéisés. Après décantation, les cellules en suspension sont récupérées et leur nombre estimé afin de pouvoir ultérieurement préparer des blocs d'agarose ayant une même concentration d'ADN. Le nombre total de cellules est déterminé sur une cellule de Bürker (pour la rate, on déduit 40 % de ce nombre total; ces 40 % correspondant au nombre de globules rouges).

Discussion

La principale difficulté de cette manipulation réside dans cette estimation cellulaire. En effet, une différence de concentration en ADN au sein des blocs pourrait se traduire sur gel par une différence de migration.

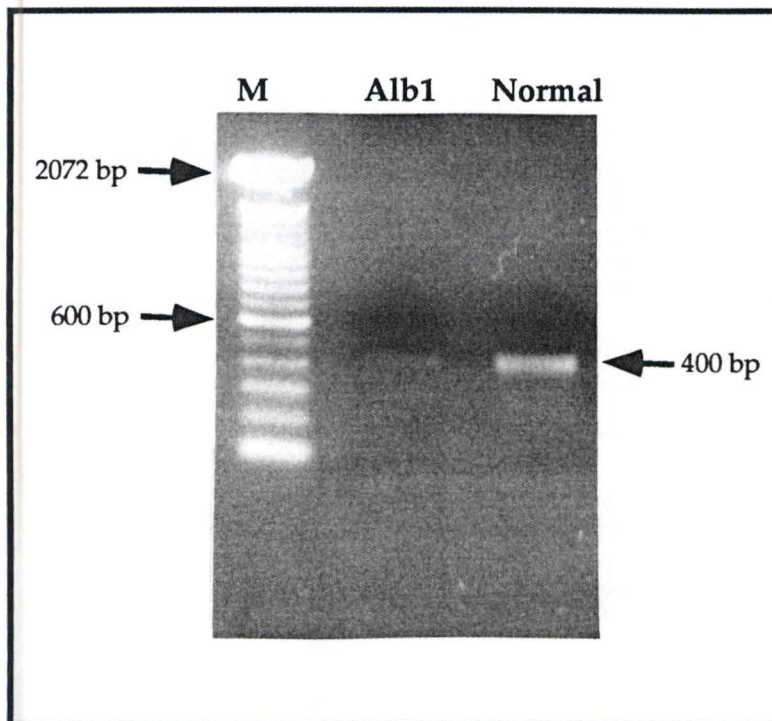


Figure III. 6 : Amplification par PCR du fragment CplUPF-Signal 2 (400 bp).
Une bande apparaît chez l'allèle mutant (Alb 1)

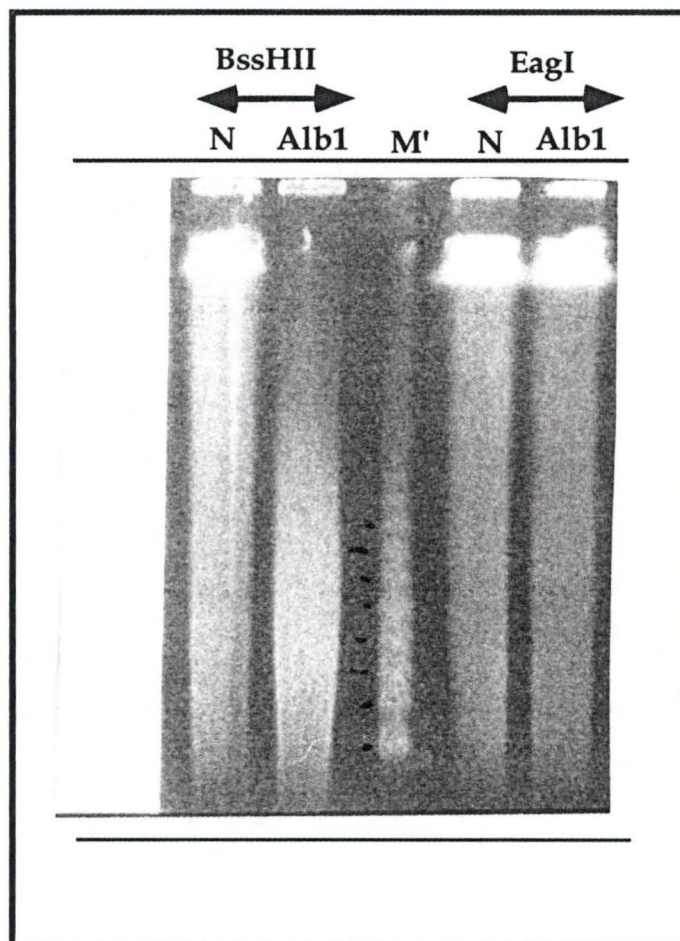


Figure III. 7: Digestion de blocs génomiques d'allèle sauvage (N) et d'allèle muté (Alb1) par BssHII (mauvaise digestion) et EagI (digestion correcte).
M' = marqueur 50Kb (Lambda Ladder PFG marker, SIGMA)

III.2.2. DIGESTION DE L'ADN GENOMIQUE

La majeure partie du génome des eucaryotes est caractérisé par la méthylation de la cytosine en 5' dans la plupart des doublets CpG (Lindsay et Bird, 1987). Toutefois, il existe dans le génome, et souvent à proximité des gènes, des régions d'ADN de 500 bp à 2 Kb qui ont un pourcentage de guanines et de cytosines beaucoup plus élevé qu'ailleurs (plus de 50 %) et une grande quantité de doublets CpG non méthylés. Ces régions sont appelées îlots CpG.

Afin de pouvoir utiliser comme support les renseignements fournis par la carte de restriction de la région génomique contenant *reeler* établie par Bar *et al.*, (1995), nous avons utilisé des enzymes de restriction sensibles à la méthylation de la cytosine et contenant le dinucléotide CpG dans leur séquence.

Les blocs d'ADN des deux allèles sauvage et mutant ont été digérés successivement par les enzymes BssHIII, EagI, MluI, Sall et SfiI.

Les blocs digérés sont placés sur gel et soumis à une électrophorèse à champ pulsé. Après cela, le gel est coloré au bromure d'éthidium afin de vérifier la qualité de la digestion.

Les produits de digestion sont ensuite transférés sur membrane Nylon.

Discussion

Toutes les digestions se sont bien réalisées (Figure III.7) mais on peut néanmoins constater que les restrictions BssHIII sur l'ADN normal et mutant ne paraissent pas similaires; l'ADN mutant est vraisemblablement plus digéré. Lors des étapes ultérieures, nous ne tiendrons plus compte de la digestion BssHIII.

ADN génomique

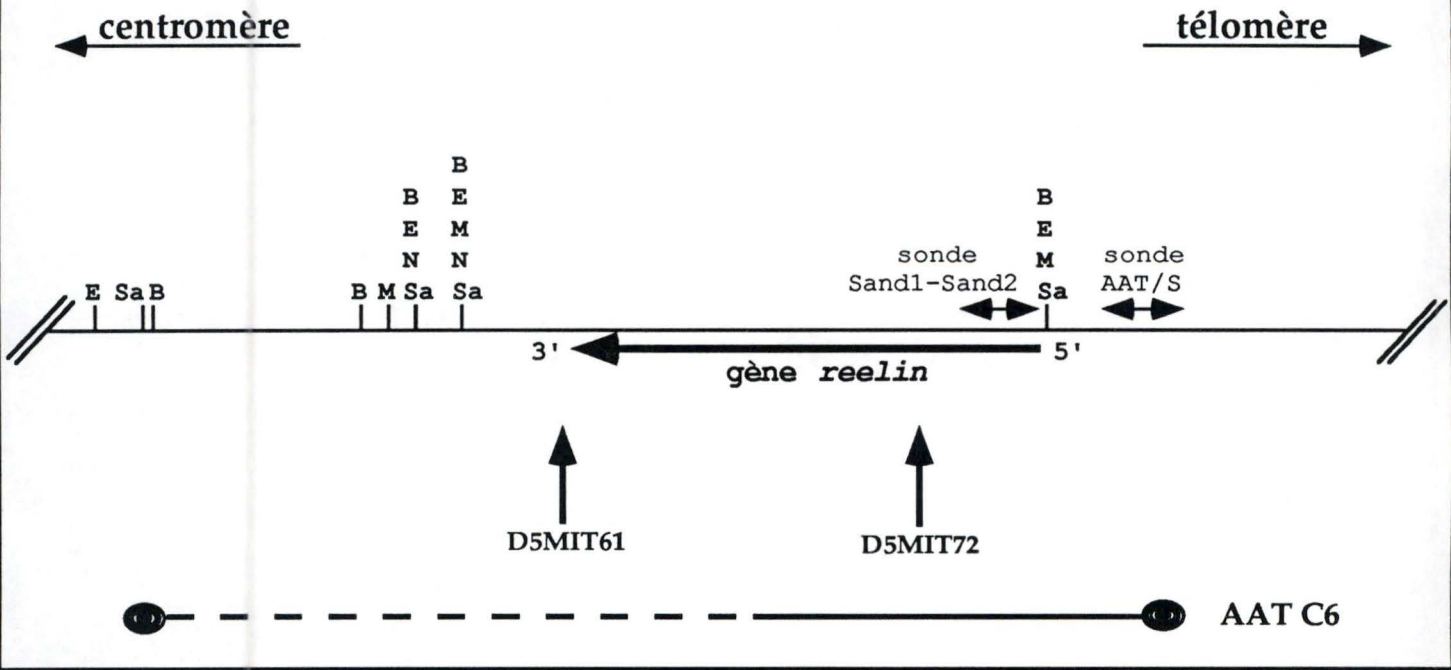


Figure III.8 : Définition et localisation des sondes Sand1-Sand2 et AAT/S respectivement sur et en amont du gène *reelin*
 E = EagI, Sa = SacII, B = BssHIII, M = MluI, N = NotI

III.2.3. HYBRIDATION SUR ADN GENOMIQUE DIGERE

En tenant compte des propriétés du chlorambucil, on s'attend à découvrir une importante délétion. Les zones où une telle mutation pourrait avoir lieu sont relativement limitées.

Des études effectuées dans notre laboratoire ont permis de caractériser un intron de très grande taille (≈ 70 Kb) situé entre le premier et deuxième exon. Si l'on sait qu'il n'est pas rare de rencontrer dans les premiers introns des séquences "enhancer", nous pouvons supposer qu'une mutation à cet endroit affecterait l'expression du gène. Une sonde pouvant s'hybrider sur l'extrémité 5' du gène nous permettrait de vérifier cette hypothèse.

La taille des autres introns est maintenant connue mais aucune ne nous paraît suffisamment importante pour accueillir une grande délétion.

Un autre site pouvant accueillir une importante délétion est bien entendu le promoteur du gène. Si la mutation affecte ce dernier, elle pourrait être détectée par l'utilisation d'une sonde s'hybridant en amont du gène, c'est-à-dire, avant l'îlot CpG s'étendant entre le promoteur du gène réel et le premier exon.

III.2.3.1. Définition des sondes (Figure III.8)

III.2.3.1.1. La sonde Sand1-Sand2

Cette sonde a été réalisée par amplification PCR sur ADNc à partir des amorces Sand1 (1er exon) et Sand2 (5ème exon). Sa taille est de 450 bp.

III.2.3.1.2. La sonde AAT/S

Les seuls renseignements en notre possession nous permettant de réaliser une sonde pouvant s'hybrider en amont du gène est l'extrémité distale du YAC AAT-C6. D'après la carte de restriction existante, cette séquence, nommée AAT/S, est située à environ 100 Kb en amont du gène *reeler*. Nous avons préparé cette sonde par amplification PCR sur ADN total à partir des amorces spécifiques AAT1 et AAT2. Sa taille est de 371 bp.

III.2.3.2. Hybridation proprement dite

L'hybridation des membranes est réalisée à 68°C. Suite à cela, les membranes sont lavées dans du SSPE-SDS. Ce lavage nous permet d'éliminer les sondes qui ne se sont pas hybridées à l'ADN de façon spécifique afin de diminuer le "bruit de fond". Une succession de lavages au SSPE-SDS est généralement nécessaire. Après chaque lavage, une mesure de la radioactivité des membranes est effectuée. Si cette dernière est trop élevée, les membranes sont relavées avec une solution de stringence accrue où le SSPE est en plus faible concentration.

L'obtention d'hybridations de bonne qualité, effectuées à l'aide des sondes mentionnées précédemment, s'est révélée difficile.

- Lors des premiers essais, aucune des deux sondes ne s'hybridait sur les membranes. Ce problème a été partiellement résolu en diminuant la stringence des lavages mais seules, les hybridations sur ADN génomique digéré par *EagI* et *SfiI* se sont parfois effectuées correctement.

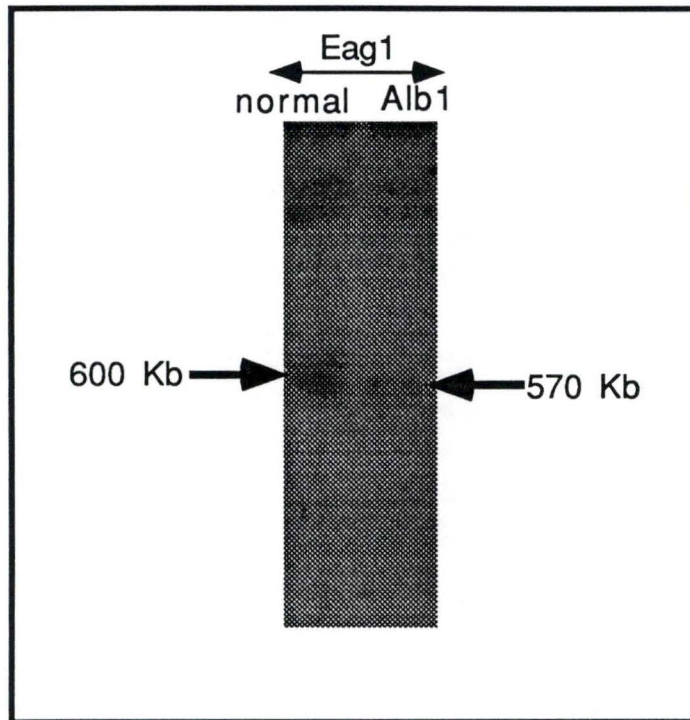


Figure III.9 : Hybridation de la sonde Sand 1-Sand 2 sur ADN génomique digéré par EagI. Mise en évidence - d'un fragment de 600 Kb (taille attendue) pour l'allèle sauvage (normal) - d'un fragment de +/- 570 Kb pour l'allèle mutant (Alb1).

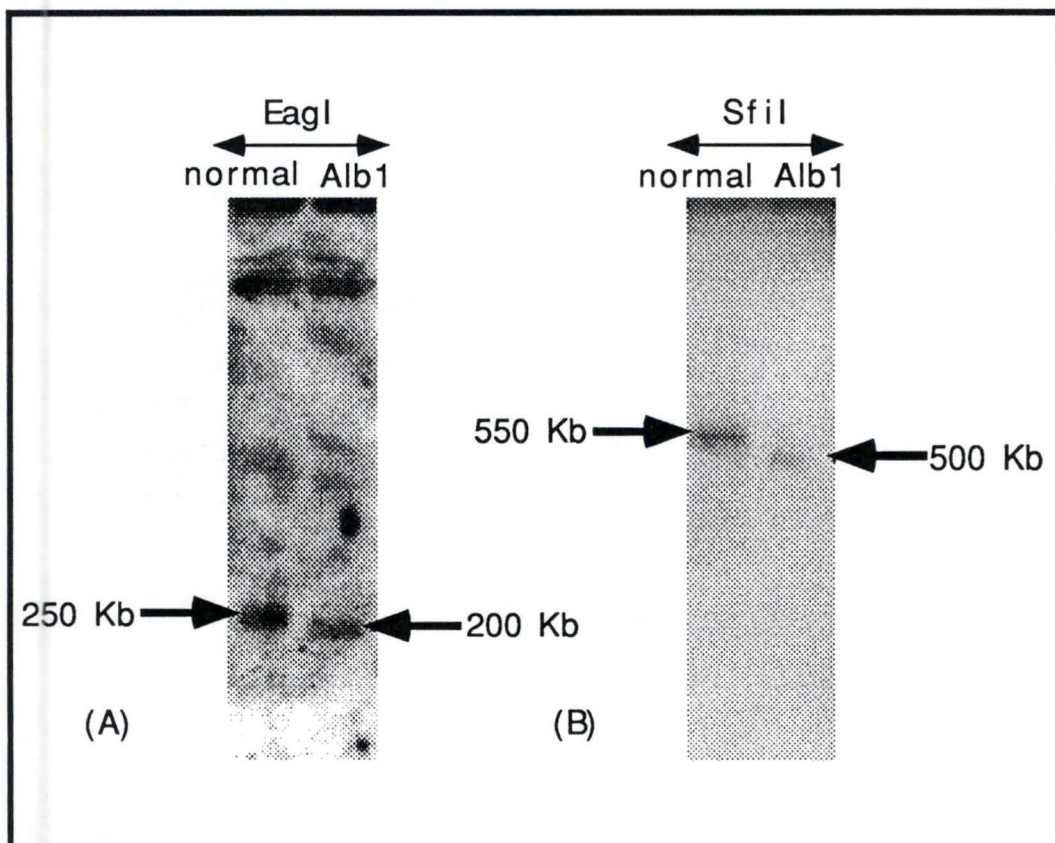


Figure III.10 : Hybridation de la sonde AAT/S sur ADN génomique digéré par (A) EagI et (B) SfiI. Mise en évidence d'une variation de taille d'environ 50 Kb entre l'allèle sauvage et l'allèle mutant.

III.2.3.2.1. Hybridation de la sonde Sand1-Sand2

Les résultats obtenus pour cette hybridation sont visibles sur digestion par *EagI* (Figure III.9).

Comme attendu, sur base de la carte de restriction, la sonde révèle chez l'allèle sauvage un fragment de 600 Kb. Cependant, le fragment marqué chez *Albany 1* semble être de plus petite taille, soit environ 570 Kb.

III.2.3.2.2. Hybridation de la sonde AAT/S

Deux hybridations ont bien fonctionné avec la sonde AAT/S. Il s'agit des digestions *EagI* et *SfiI* (Figure III.10).

- Le fragment révélé sur *EagI* a une taille de 250 Kb pour l'allèle sauvage mais nous constatons également que le fragment mutant est 50 Kb plus petit avec une taille de l'ordre de 200 Kb.

- Chose étonnante, pour une enzyme sensée couper souvent, le fragment révélé sur *SfiI* est de plus grande taille (environ 550 Kb). Il est important de remarquer aussi pour cette digestion que le fragment *Albany 1* est également plus court de 50 Kb.

Discussion

Les résultats qui ont été obtenus ici sont assez surprenants. En effet, ils semblent indiquer qu'il existe chez le mutant *Reln^{Alb1}* deux délétions, à la fois dans le gène et en amont du gène, ce qui est peu vraisemblable.

Les résultats obtenus sur la digestion *EagI* ne nous semblent pas très fiables car les deux hybridations, Sand1-Sand2 et AAT/S, ont été effectuées sur la même membrane. Aussi, une différence de migration électrophorétique pourrait expliquer cette variation de taille entre les deux allèles.

ADN génomique

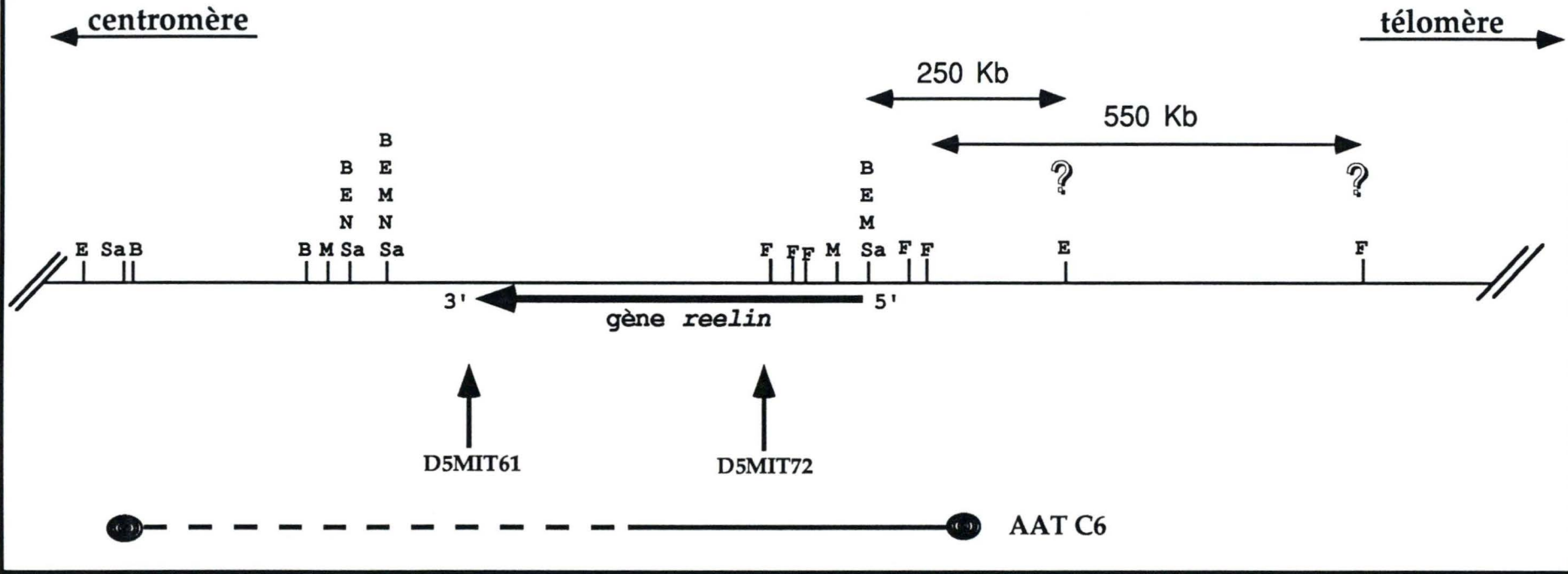


Figure III.11 : Localisation des deux nouveaux sites de restrictions EagI et SfiI marqués d'un point d'interrogation.

E = EagI, Sa = SacII, B = BssHII, M = MluI, N = NotI, F = SfiI

Bien que nous ne pouvons pas montrer qu'il n'y a pas de mutation au sein du gène, l'analyse de l'hybridation sur SfiI par la sonde AAT/S suggère qu'il existe une délétion en amont de celui-ci.

Pour démontrer cela, il serait tout d'abord important de vérifier la fiabilité de la migration pour cette digestion. Nous avons utilisé pour toutes nos digestions des blocs génomiques d'une même préparation.

Si, par exemple, une erreur d'estimation, sur cellule de Bürker, du nombre de cellules présentes dans la solution d'extraction a été effectuée, les blocs d'agarose n'auront pas la même concentration d'ADN. Le manque de temps ne nous a pas permis de reprendre une nouvelle série de préparations.

Si rien de certain ne peut être établi sur la mutation de *Reln^{Alb1}*, les digestions effectuées nous permettent cependant de confirmer et de tenter de compléter légèrement la carte de restriction existante (**Figure III.11**).

Deux sites de restrictions complémentaires ont été localisés. Il s'agit d'un site EagI situé à 250 Kb en amont de l'îlot CpG de l'extrémité distale du gène *reeler* et d'un site SfiI situé vraisemblablement à 550 Kb de ce même îlot. L'existence de ces sites peut se traduire par la présence d'autres îlots CpG pouvant nous renseigner sur une localisation potentielle d'autres gènes.

III.3. CLONAGE DE L'EXTREMITÉ DISTALE DU YAC AAT-C6

Même s'ils nous orientent vers la zone promotrice du gène, les résultats obtenus par Southern ne nous permettent pas d'affirmer avec certitude que la mutation s'y trouve. Toutefois, des informations supplémentaires sur l'extrémité distale du YAC AAT-C6 (environ 100 Kb) seraient utiles pour, par exemple, établir l'existence de séquences activatrices de *reeler* ou voire même d'autres gènes encore inconnus situés à proximité de *reeler*.

III.3.1. PURIFICATION DU YAC AAT-C6

Le protocole utilisé (matériel et méthodes II.3.11) combine les avantages de ne pas exposer l'ADN du gel aux UV et de le concentrer dans un minimum d'agarose, en prenant garde de travailler dans des conditions les plus stériles possibles. Après purification, le YAC est précipité, lavé à l'éthanol et resuspendu dans du TE 1X. Sa concentration est mesurée par quantification au bromure d'éthidium.

Discussion

La masse de YAC AAT-C6 purifié est de 600 ng. Cette quantité d'ADN est assez faible. L'utilisation, pour le sous-clonage, de l'entièreté de ce produit sera nécessaire surtout lorsque l'on prend en considération que, malgré les qualités de cette technique, le YAC n'est pas totalement pur et que le clonage d'ADN de levure est inévitable.

III.3.2. SOUS-CLONAGE DU YAC AAT-C6 PURIFIÉ

Après digestion partielle, les fragments du YAC ont été clonés au site BamHI du vecteur pBlueScript II SK (-).

III.3.2.1. Restrictions

Le vecteur pBS II SK (-) a été linéarisé par une restriction BamHI et ensuite déphosphorisé. D'autre part, l'ADN de YAC a été digéré partiellement par MboI, une enzyme connue pour son taux élevé de sites de restriction. Le facteur limitant de cette dernière digestion est le temps (20 min) .

L'électrophorèse en gel d'agarose (1 %) d'un échantillon de chaque restriction montre le profil attendu à savoir un fragment de 3 Kb correspondant au vecteur pBS II SK(-) et à un "smear" recouvrant toute la surface de migration correspondant à l'ADN de YAC et attestant que la digestion de ce dernier est de bonne qualité. La taille moyenne des fragments du YAC est de 1,5 Kb.

III.3.2.2. Ligation

Une quantité équivalente à 500 ng du produit de digestion de YAC et 1,5 µg du vecteur pBS II SK(-) linéarisé ont été mis en présence dans un tampon de ligation contenant 2 unités de T4 DNA ligase. La ligation a été réalisée pendant la nuit à 14°C. En parallèle un test négatif de ligation, ne contenant que le vecteur linéarisé, a également été effectué.

III.3.2.3. Transformation et analyse des clones recombinants

Les cellules DH11α électrocompétentes ont été transformées par le produit de ligation puis étalées sur le milieu sélectif LB + ampicilline. Le milieu contient également de l'X-gal et de l'IPTG car le vecteur possède le gène de la β-galactosidase qui permet le test blanc/bleu. La transformation réalisée à partir du produit "négatif" de ligation permet le contrôle de la déphosphorylation du vecteur.

Seulement 65 colonies ayant le phénotype blanc ont été produites. Le nombre attendu de colonies, suite à ce sous-clonage, étant infiniment plus élevé, la probabilité d'obtenir un clone d'intérêt est presque nulle. Malgré leur nombre excessivement faible ne pouvant représenter l'ensemble du YAC AAT-C6, ces colonies ont été quand même soumises, pour vérification, à une amplification PCR utilisant deux amorces de la zone 5' du gène reeler (UPC e t RNASp11; toutes deux spécifiques du premier exon) ainsi que les amorces AAT1 et AAT2 spécifiques de l'extrémité distale du YAC.

.....gtcttggacg ntttcgttag cgcagcggcc gagcagcct gcccttcgg

-192 -183 -176
gaggagcggc cccctgggcgg gagggcgcg tgtgttcgg ggcacagccc
SP-1 **AP-2** **SP-1**

-128 -119 -101
gaggtgcggg caagcccggag gggggcggga cgggcgcgg gccggggggc
AP-2 **SP-1** **SP-1**

-69 -57
cggctgggac acgtgtggcg ccgggcgggg agdgggcggc gcccggggct
SP-1 **SP-1**

-23 **site** **+1**
ttaagaaggt gcggaggggg cgggcacttt cccaagccg gccgaGGGC
SP-1 ↓

GTGCGTGCA CACCGGCGGC GCGGGCGTC GGAGGCGGAC GACGCGTCT.....

Figure III.12 : Une première analyse du promoteur de reelin montre 7 séquences consensus du facteur de transcription SP-1 et 2 séquences consensus AP-2.

Aucun fragment n'a été amplifié par ces PCR. Aucune de ces colonies ne contient donc l'extrémité distale du YAC ou le premier exon du gène *reeler*. Nous ne sommes pas parvenus à sous cloner l'extrémité distale du YAC AAT-C6.

III.4. AMPLIFICATION PAR PCR-VECTORETTE ET SEQUENÇAGE DU PROMOTEUR REELER

La PCR-vectorette (Riley *et al.*, 1990; Gibson *et al.*, 1993; Tümer *et al.*, 1995) permet le clonage des séquences inconnues (ici, le promoteur *reeler*) flanquant la séquence connue de l'extrémité 5' de l'ARNm.

L'amplification, par cette méthode, d'un fragment d'ADN génomique contenant une partie du promoteur a été réalisée. Après purification sur colonne Wizard, la séquence de ce produit a été déterminée par cycle sequencing à l'aide des mêmes amorces que pour la PCR. Les renseignements obtenus de la sorte permettent d'amplifier, toujours par PCR-Vectorette, un fragment un peu plus lointain et ainsi de suite.

La technique de PCR-vectorette nous a permis de définir une séquence promotrice du gène *reeler* de 494 pb.

Discussion

L'analyse de cette région 5' (**Figure III.12**) montre qu'une séquence de 6 paires de bases, la boîte (G/C)GGCGG, connue comme séquence consensus du facteur de transcription SP-1, est répétée 7 fois aux positions 23, 57, 69, 101, 119, 176, et 192, bp en amont de la phase ouverte de lecture du gène *reeler*.

Deux séquences consensus AP-2, CCCG, ont également été localisées aux positions 128 et 183 bp toujours en amont de la phase ouverte de lecture.

Comme beaucoup de gène dont l'extrémité 5' est caractérisée par un îlot CpG, le promoteur de la *reelin* ne présente pas de boîte TATA ou CAAT.

III.5. ESTIMATION DE LA DISTANCE GENETIQUE ENTRE LES LOCUS REELER ET CDK5

Les souris knock-out pour le gène *cdk5* ont un phénotype similaire aux souris *reeler*. Les raisons exactes de ce phénomène ne sont pas encore bien connues mais une interaction entre ces deux gènes n'est pas exclue. La localisation chromosomique du gène *cdk5* établie par Ohshima *et al.*(1995) montre que ce gène est relativement proche du gène *reeler* mappé par Beckers *et al.*(1994). Dans ces conditions, il est possible que la réalisation du knock-out pour *cdk5* ait affecté le gène *reeler* ou modifié la conformation de la chromatine rendant l'expression du gène *reeler* impossible. La première étape, en vue de soutenir cette hypothèse, est d'établir, sur le chromosome 5, la distance génétique entre les gènes *reeler* et *cdk5*.

Lors d'études précédentes, 367 recombinants (133 issus de backcross et 234 d'intercross) ont été obtenus par Beckers *et al.*,(1994) en croisant deux souches de souris:

- Une souche normale B6 (C57BL/6) dont une partie du chromosome 5 (*reeler* compris) est de génotype S (*Mus spretus*).
- Une souris de phénotype *reeler*, homozygote, issue de la souche C (BALB/c).

Nous avons réalisé, en utilisant une sonde s'hybridant spécifiquement au gène *cdk5*, une analyse par Southern des animaux informatifs de ces croisements, à savoir les ADN qui montraient des recombinaisons entre les marqueurs Hgf, en position centromérique, et D5Mit66 en position distale. Le nombre de recombinants que nous obtiendrons nous informera sur la distance séparant *reeler* et *cdk5*.

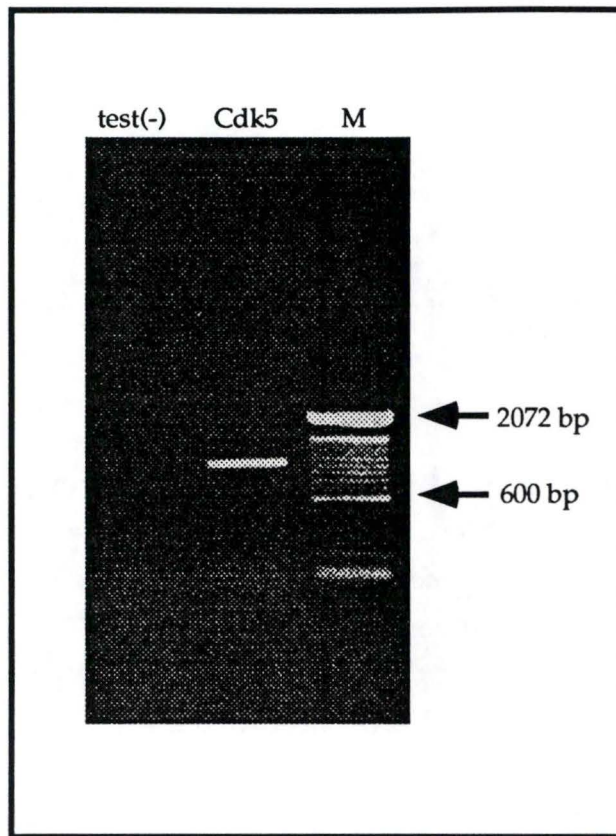


Figure III.13: Production de la sonde Cdk5 (1100 bp)par RT-PCR

III.5.1. PREPARATION DE LA SONDÉ

La sonde a été produite par RT-PCR sur de l'ADNc de souris au stade E15 (15ème jour du développement embryonnaire). à l'aide des primers Cdk5-1 et Cdk5-2. Comme attendu, le produit obtenu est un fragment de 1100 pb, détecté sur gel d'agarose 1% (**Figure III.13**), correspondant à la séquence codante de Cdk5. Ce produit a été cloné, par TA-Cloning, dans le vecteur pCRTMII. Dix colonies blanches ont été obtenues et contrôlées par PCR. Le plasmide contenant Cdk5 a été purifié par miniprep et sa concentration mesurée par quantification au bromure d'éthidium. Nous avons obtenu entre 0,8 et 1 µg/µl d'ADN plasmidique. Après digestion par l'enzyme de restriction EcoRI, une bande de 700 bp a été obtenue. La diminution de la taille de notre insert est probablement due à la présence d'un site de restriction EcoRI dans la séquence. La sonde purifiée par Wizard a une concentration de 80 ng/µl.

III.5.2. SOUTHERN ET ANALYSE

La sonde marquée au [³²P] a été hybridée sur les membranes réalisées par Beckers *et al.*, (1994). Après incubation et lavages appropriés, les membranes ont été analysées. Les résultats montrent qu'il existe 3 recombinants sur les 367 méioses informatives. L'expérience a été répétée sur d'autres membranes pour confirmer ces résultats.

Discussion

La distance génétique entre le gène *cdk5* et le gène *reeler*, calculée pour 3 recombinants parmi 367 méioses, est donc 0,8 cM (0,2-2,4 pour l'intervalle de confiance à 95%). Ces résultats nous indiquent que *cdk5* est le gène connu le plus proche de *reeler*.

CONCLUSION
ET
PERSPECTIVES

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

IV.1. CONCLUSION

Le gène *reeler* est un gène clé du développement cérébral. Son action se manifeste à la fin de la migration neuronale, lorsque les premiers patterns architectoniques se mettent en place. Le phénotype *reeler* se marque principalement au niveau du cortex cérébral et cérébelleux même si, de manière moins prononcée, presque toutes les structures du système nerveux central sont atteintes. La mutation de ce gène affecte une étape importante et est donc un excellent modèle d'étude du développement cérébral.

Bien qu'il soit maintenant cloné et presque complètement caractérisé, *reeler* reste encore énigmatique sur bien des points. La protéine ayant une taille extrêmement importante, aucune information sur sa conformation n'est disponible si ce n'est par comparaison d'homologie avec des protéines déjà étudiées. Notre connaissance de sa fonction exacte se limite encore à de simples hypothèses et son mécanisme d'action est totalement inconnu.

Les observations morphologiques ont conduit à l'hypothèse selon laquelle la protéine Reelin défectueuse ne permettrait pas aux neurones de se stabiliser en fin de migration (Goffinet et al., 1984) expliquant ainsi les structures neurales aberrantes rencontrées au niveau du système nerveux central des souris *reeler*.

L'obtention d'allèles *reeler* mutants a été un événement essentiel permettant la localisation et le clonage du gène. Mais l'intérêt de disposer d'allèles variés est plus important encore. En effet, la localisation sur le gène d'une mutation permet souvent de déterminer des zones importantes pour la protéine. Sur base de ces connaissances, une approche de la fonction de cette dernière peut être réalisée.

Les analyses présentées dans ce mémoire avaient pour but de localiser la mutation affectant l'allèle *Albany 1*; seul allèle *reeler* toujours inconnu parmi les cinq existant.

C'est en tenant compte de l'origine de *Reln^{Alb1}* que nous avons orienté nos recherches. En effet, comme il est issu d'une mutagenèse chimique au chlorambucil, nous nous attendions à découvrir chez cet allèle, une délétion importante dans le gène *reeler*. Afin de mettre à jour cette mutation, les différentes analyses effectuées ont consisté en une analyse comparative entre l'allèle muté et l'allèle sauvage.

Notre première hypothèse fut que la mutation affectait un ou plusieurs exons du gène causant ainsi une anomalie au sein même de la protéine, la rendant inapte à effectuer son rôle. Pour le vérifier, une analyse du message de *Reln^{Alb1}* a été réalisée. La technique de RT-PCR nous a paru la plus appropriée et certainement la plus simple d'utilisation; l'obtention d'une différence de migration, détectée sur gel d'agarose, entre les produits d'amplification d'ADNc mutant et sauvage ou l'absence d'amplification de l'ADNc mutant, étant suffisante pour révéler l'existence d'une l'anomalie.

Toute le message de Reelin (normal et mutant) a été amplifié par une série de réactions de RT-PCR. A chaque réaction, un seul produit a été généré, excluant la possibilité de formes alternatives du message conduisant au phénotype *reeler*. Sauf si la mutation est ponctuelle, et dans ce cas nous n'aurions pu la détecter par RT-PCR, il apparaît que le message chez *Albany 1* ne présente aucune anomalie.

La seule information que nous apporte ces résultats est de confirmer que l'expression du gène chez le mutant *Reln^{Alb1}*, comme chez les autres mutants, est excessivement restreinte.

Lorsque l'on sait que les 12 Kb correspondant au message de *reeler* représentent seulement, dans des conditions normales, 10 % de l'ADN transcript, on peut se rendre compte que le temps nécessaire à la transcription du gène est relativement long et que de ce fait, la quantité d'ARNm *reeler* dans les cellules est faible.

Si le message n'est pas affecté, l'intérêt que nous portions à cette mutation, pour nous informer sur l'existence d'une zone primordiale à la protéine, se voit fortement atténué. Néanmoins, de nouvelles questions se posent: "Y a-t-il chez *Reln^{Alb1}* une anomalie au sein d'une zone d'activation de la transcription ?" ou bien, "La diminution de l'expression du gène chez *Reln^{Alb1}* est-elle suffisante à elle seule pour faire apparaître la pathologie ?" ou encore " Existe-t-il une limite au delà de laquelle la protéine est en quantité insuffisante pour remplir son rôle correctement ?"

Afin d'analyser la zone promotrice de *reeler* ainsi que d'autres zones pouvant contenir des séquences "enhancer" nous avons réalisé une analyse par Southern d'ADN génomique digéré. Deux sondes, l'une recouvrant l'extrémité 5' du gène et l'autre la partie plus en amont du gène comprenant le promoteur, ont été produites. Le nombre d'hybridations réussies est faible et les résultats obtenus sont difficilement analysable. Toutefois ces derniers semblent indiquer qu'une délétion de l'ordre de 50 Kb existe tout au plus 200 Kb en amont du gène. Cependant, avant de tirer une conclusion trop hâtive, il paraît indispensable de confirmer ces premiers résultats en effectuant d'autres Southern avec d'autres sondes ou sur de l'ADN digéré avec d'autres enzymes.

Comme aucun renseignement n'est disponible pour cette zone, l'obtention d'informations de séquence en amont du gène nous aurait permis de produire de nouvelles sondes et de localiser ainsi plus efficacement la mutation.

Pour cela, nous avons premièrement tenté de sous-cloner le YAC AAT-C6 ayant à son extrémité 5' une séquence d'ADN, en amont de *reeler*, de 100 Kb.

Seulement 65 colonies candidates ont été obtenues après transformation. Ceci n'est absolument pas représentatif du sous-clonage effectué surtout si l'on tient compte qu'il est inévitable, par la méthode que nous avons utilisée, de sous-cloner de l'ADN de levure

Notre deuxième approche a été de séquencer des produits obtenus par PCR-Vectorette et correspondant au promoteur du gène *reelin*. Une séquence de 496 paires de bases a été déterminée et analysée brièvement. Comme la plupart des gènes pourvus d'un îlot CpG à son extrémité 5', le promoteur de *reelin* ne contient pas de boîtes TATA et CAAT mais bien 7 séquences consensus du facteur de transcription Sp1 et 2 séquences consensus pour AP2.

La dernière partie de notre travail consistait à définir la distance génétique entre le gène *reeler* et celui codant pour la protéine Cdk5. Lorsque l'on s'est aperçu qu'une souris knock-out pour le gène *cdk5*, produite par Ohshima et al., (1996), présentait un phénotype similaire à *reeler*, certaines questions se sont posées. Certains pensent que Cdk5 pourrait interagir avec Reelin mais d'autres estiment qu'il est vraisemblable que le knock-out affecte l'expression du gène. Cette seconde hypothèse est d'autant plus plausible que la distance séparant les deux gènes est faible. La distance mesurée est de 0,8 cM (0,2-2,4 pour l'intervalle de confiance à 95 %) ce qui nous permet de dire que *cdk5* est le gène connu le plus proche de *reelin*.

IV.2. PERSPECTIVES

La mutation Albany 1

Les analyses effectuées dans ce travail tendent à montrer que la mutation *Albany 1* se localise en amont du gène affectant peut être un site d'activation de la transcription de *reelin*. La confirmation de ces résultats est bien entendu la première étape à franchir. A cette fin, il nous semble nécessaire de recommencer les analyses par Southern afin de conforter les résultats obtenus précédemment. Une augmentation la diversité des digestions nous paraît également indispensable pour compléter la carte de restriction de l'ADN génomique contenant le gène *reeler*. Pareille analyse n'est toutefois pas des plus aisée car l'obtention de souris *Reln^{Alb1}* homozygotes toujours vivantes, au moment où le phénotype *reeler* apparaît, est difficile.

Si la localisation de la mutation *Albany 1*, suspectée ici, se confirme, cet allèle pourrait être un excellent modèle d'étude des facteurs agissant dans l'expression d'un gène. De plus, s'il s'avère exact que la mutation *Albany 1* n'affecte pas le messager, ceci nous pousserait à vérifier l'hypothèse selon laquelle une diminution de la Reelin suffit, à elle seule, pour provoquer la pathologie.

Le promoteur de reelin

La détermination complète de la séquence du promoteur permettrait de prédire quels sont les facteurs de transcription agissant potentiellement sur l'expression du gène. Mais plus encore, la caractérisation du promoteur est une étape très importante car elle ouvre la porte à une étude permettant de confirmer de manière irrévocable que le phénotype de *reeler* est bien dû à une anomalie de la Reelin.

En effet, l'obtention d'animaux transgéniques *reeler* ayant intégrés une copie du gène *reelin* fonctionnel, devrait permettre de restaurer le phénotype sauvage. Le transgène pourra être construit à partir de l'ADNc complet de *reelin*, du promoteur de ce gène et généralement du premier intron de la globine inséré entre le premier et le second exon de *reelin*. Cet intron est connu pour faciliter, après insertion du transgène, la transcription de ce dernier (Behringer *et al.*, 1987; Brinster *et al.*, 1988; Palmiter *et al.*, 1991).

Les interactions de Reelin

Pour jouer son rôle de stabilisation de la structure architectonique, il faudrait que la Reelin interagisse avec les neurones soit directement via un récepteur, soit indirectement via d'autres protéines. Dans l'hypothèse la plus simple, Reelin transmettrait son message d'organisation directement en se liant à un récepteur qui lui est spécifique à la surface des neurones. En 1991, une nouvelle mutation de phénotype proche de *reeler* est apparue spontanément. Baptisée Scrambler, la mutation supposée affecter le produit d'interaction avec la Reelin a été cartographiée sur le chromosome 4 de souris. Le clonage de ce gène est maintenant une priorité et permettrait sans doute de mieux comprendre les mécanismes de la migration cellulaire neurale lors du développement embryonnaire.

De manière tout aussi surprenante, une souris knock-out *cdk5* reproduit, parmi d'autres, les mêmes symptômes que les souris *reeler*. Le gène a été mappé à environ 0,8 cM de *reelin*, ce qui permet de penser que la construction transgénique aurait pu affecter, à plus ou moins grande distance, l'expression du gène *reelin*. Cependant, une autre hypothèse à vérifier, serait l'implication de la protéine Cdk5 dans une cascade de réactions impliquant la protéine *reelin*.

BIBLIOGRAPHIE

V. BIBLIOGRAPHIE

- * Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. (1983) *Molecular Biology of the Cell*, Garland Publishing.
- * Alfandari D., Darribère T. (1994) A simple PCR method for screening cDNA libraries, PCR Methods and Applic., 4: 46-49.
- * Antequera F., Bird A. (1993) Number of CpG islands and genes in human and mouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 11995-11999.
- * Arnold C., Hodgson I.J. (1991) Vectorette PCR : a novel approach to genomic walking, PCR Methods and Application, 1: 39-42.
- * Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., and Struhl K. (1993) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience, New York.
- * Bar I., Lambert de Rouvroit C., Royaux I., Krizman D., Deroncourt C., Ruelle D., Beckers M.C., Goffinet A. (1995) A YAC contig containing the reeler locus with preliminary characterization of candidate gene fragments, Genomics, 26: 543-549.
- * Behringer RR., Hammer RE., Brinster RL., Palminter RD., Townes TM. (1987) Two 3' sequences direct adult erythroid- specific expression of human beta-globin genes in transgenic mice, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 7056-7060.
- * Beckers M.C., Bar I., Huynh-Thu T., Deroncourt C., Brunialti A.-L., Montagutelli X., Guénet J.-L., Goffinet A.M. (1994) A high resolution genetic map of mouse chromosome 5 encompassing the reeler (rl) locus, Genomics, 23: 685-690.
- * Bickmore W.A., Bird A.P. (1992) The use of restriction endonucleases to detect and isolate genes from mammalian cells, Methods Enzymol., 216: 224-243.
- * Bird A. (1987) CpG island as gene markers in the vertebrate nucleus, Trends Genet., 3: 342-347.
- * Birren B., Lai E. (1993) *Pulsed field gel electrophoresis: a practical guide*, Academic Press.
- * Bonhomme F., Benmedhi J., Britton-Davidian J., Martin S. (1979) Analyse génétique de croisements interspécifiques *Mus musculus*L. x *Mus spretus* Lataste: liaison de Adh-1 avec Amy-1 sur le chromosome 3 et de Es-14 avec Mod-1 sur le chromosome 9, C.R.Acad.Sci.Paris, 289: 545-548.

- * Bonhomme F., Guénet J.L., Catalan J. (1982) Présence d'un facteur de stérilité mâle, *hst-2*, ségrégeant dans les croisements interspécifiques *Mus musculus* x *Mus spretus* Lastate et lié à *Mod-1* et *Mpi* sur le chromosome 9, C.R.Acad.Sci.Paris, 294: 691-693.
- * Bostein D., White R., Skolnick M. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, Am. J. Hum. Genet., 32: 314-331.
- * Brinster RL., Allen JM., Behringer RR., Gelinas RE., Palmiter RD. (1988) Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 836-840.
- * Bustamante C., Gurrieri S., Smith S. (1993) Towards a molecular description of pulsed-field gel electrophoresis, Trends Biotech., 11: 23-30.
- * Carle G., Frank M., Olson M. (1986) Electrophoretic separation of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field, Science, 232: 65-68.
- * Caviness V.S., Rakic P. (1978) Mechanisms of cortical development: a view from mutations in mice, Ann. Rev. Neurosci., 1: 297-326.
- * Chu G., Vollrath D., Davis R. (1986) Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogenous electric fields, Science, 234: 1582-1585.
- * Chuong C.M., Crossin K.L., Edelman G.M. (1987) Sequential expression and differential function of multiple adhesion molecules during the formation of cerebellar cortical layers, J. Cell Biol., 104: 331- 342.
- * Craig J., Bickmore W. (1994) The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes, Nature Genet., 7: 376-382.
- * D'Arcangelo G., Miao G., Chen S., Soares H., Morgan J., Curran T. (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant *reeler*, Nature, 374: 719-723.
- * Dernoncourt C., Ruelle D., Goffinet A.M. (1991) Estimation of genetic distances between *reeler* and nearby loci on mouse chromosome 5, Genomics, 11: 1167-1169.
- * Dracopoli N., Haines J., Korf B., Moir D., Morton C., Seidman C., Seidman J., Smith D. (1994) Current Protocols in Human Genetics, Wiley Interscience, New York.
- * Engel J. (1989) EGF-Like domains in extracellular matrix proteins: localized signal for growth and differentiation? FEBS Lett., 251: 1-7.

- * Falconer D.S. (1951) Two new mutants, "trembler" and "reeler", with neurological actions in the house mouse, J. Genet., 50: 192-201.
- * Falconer D.S. (1952) Location of reeler in linkage group III of the mouse, Heredity, 6: 255-257.
- * Flaherty L., Messer A., Russel L., Rinchik E. (1992) Chlorambucil-induced mutations in mice recovered in homozygotes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 89 : 2859-2863.
- * Gibson RA., Buchwald M., Roberts RG., Mathew CG., (1993), Characterisation of the exon structure of the Fanconi anaemia group C gene by vectorette PCR, Hum Mol Genet, 2: 35-38.
- * Gilbert S. (1988) Developmental Biology, Second edition, Sinauer Associates, inc.
- * Godfraind C., Schachner M., Goffinet A. (1988) Immunohistological localization of cell adhesion molecules L1, J1 and N-CAM and their common carbohydrate L2 in the embryonic cortex of normal and reeler mice, Dev. Brain Res., 42: 99-111.
- * Goffinet, A.M. (1984) Events governing organization of postmigratory neurons: studies on brain development in normal and reeler mice, Brain Res. Rev., 7: 261-296.
- * Goffinet A. (1990.b) Cerebellar phenotype of two alleles of the reeler mutation on similar backgrounds, Brain Res., 519: 355-357.
- * Goffinet A.M., Deroncourt C. (1991) Localization of the reeler gene relative to flanking loci on mouse chromosome 5, Mamm. Genome, 2: 100-103.
- * Green M. (1981) Gene Mapping, dans : The Mouse in Biomedical Research, volume I, Academic Press, pp. 105-117.
- * Green, E. (1993) Physical mapping of human chromosomes: generation of chromosome-specific sequence-tagged sites, dans: Methods in Molecular Genetics: Gene and Chromosome Analysis (Part A) (K.W. Adolph, ed.; Academic Press, Inc.), Vol. 1, pp. 192-210.
- * Hellmich MR., Pant HC., Wada E., Battey JF., (1992) Neuronal cdc2-like: a cdc2-related protein kinase with predominantly neuronal expression, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10867-10871.
- * Herrmann B.G., Barlow D.P., Lehrach H. (1987) An inverted duplication of more than 650 kbp in mouse chromosome 17 mediates unequal but homologous recombination between chromosomes heterozygous for a large inversion, Cell, 48: 813-825.

- * Hirotsune S., Takahara T., Sasaki N., Hirose K., Yoshiki A., Ohashi T., Kusabe M., Murakami Y., Muramatsu M., Watanabe S., Nakao K., Katsuki M., Yayashizaki Y (1995) The reeler gene encodes a protein with an EGF-like motif expressed by pioneer neurons, Nature Genet., 10: 77-83.
- * Jacobson M. (1991) Developmental Neurobiology, Plenum Press, Third Edition
- * Larsen F., Gundersen G., Lopez R., Prydz H. (1992.a) CpG island as gene markers in the human genome, Genomics, 13: 1095-1107.
- * Larsen F., Gundersen G., Prydz H. (1992.b) Choice of enzymes for mapping based on CpG islands in the human genome, Genet. Anal. Tech. Appl., 9: 80-85.
- * Larsen W. (1993) Human Embryology, Churchill Livingstone .
- * Lindsay S., Bird A.P. (1987) Use of restriction enzymes to detect potential gene sequences in mammalian DNA, Nature, 327: 336-338.
- * Maule J., Porteus D., Brookes A. (1994) An improved method for recovering intact pulsed field gel purified DNA, of at least 1.6 megabases, Nucleic Acids Res., 22: 3245-3246.
- * Miao G.G., Smeyne R.J., D'Arcangelo G., Copeland N.G., Jenkins N.A., Morgan J.I., Curran T. (1994) Isolation of an allele of reeler by insertional mutagenesis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 11050-11054.
- * O'Shea K.S., Rheinheimer, Dixit V.M. (1990) Deposition and role of thrombospondin in the histogenesis of the cerebellar cortex, J. Cell Biol., 110 : 1275-1283.
- * Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformational polymorphism, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 2766-2770.
- * Ohshima T., Nagle JW., Pant, Joshi JB., Kozak CA., Brady RO., Kulkarni AB., (1995), Molecular cloning and chromosomal mapping of the mouse cyclin-dependent kinase 5 gene, Genomics, 28: 585-588.
- * Ohshima T., Ward JM., Huh CG., Longenecker G, Veeranna, Pant HC., Brady RO., Martin LJ., Kulkarni AB., (1996), Targeted disruption of the cyclin-dependent kinase 5 gene results in abnormal corticogenesis, neuronal pathology and perinatal death, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 11173-11178.
- * Palmiter RD., Sandgren EP., Avarbock MR., Allen DD., Brinster RL. (1991) Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 478-482.

- * Rakic P. (1990) Principles of cell migration, Experientia, 46: 882-891.
- * Riley J., Butler R., Ogilvie D., Finniear R., Jenner D., Powel S., Anand R., Smith J. Markham A. (1990) A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones, Nucleic Acids Res., 18: 2887-2890.
- * Rinchik E., Flaherty L., Russel L. (1993) High-frequency induction of chromosomal rearrangements in mouse germ cells by the chemotherapeutic agent chlorambucil, Bioessays, 12: 831-836.
- * Royaux I (1997)
- * Russel L., Hunsicker P., Cacheiro N., Bangham J., Russel W., Shelby M. (1989) Chlorambucil effectively induces deletion mutations in mouse germ cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 3704-3708.
- * Sanger F., Nicklen S., Coulson AR., (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463-5467.
- * Schedl A., Montoliu L., Kelsey G., Schütz G. (1993) A yeast artificial chromosome covering the tyrosinase gene confers copy number-dependant expression in transgenic mice, Nature, 362: 258-261.
- * Sun D., Leung CL., Liem RKH. (1996) Phosphorylation of the high molecular weight neurofilament protein (NF-H) by Cdk5 and p35, J Biol Chem, 271: 14245-14251.
- * Takahara T., Ohsumi T., Kuromitsu J., Shibata K., Sasaki N., Okazaki Y., Shibata H., Sato S., Yoshiki A., Kusakabe M., Muramatsu M., Ueki M., Okuda K., Hayashizaki Y. (1996), Dysfunction of the Orleans reeler gene arising from exon skipping due to transposition of a full-length copy of an active L1 sequence into the skipped exon, Hum Mol Genet, 5: 989-993.
- * Tsai LH., Takahashi T., Caviness VS Jr., Harlow E. (1993) Activity and expression pattern of cyclin-dependent kinase 5 in the embryonic mouse nervous system, Development, 119: 1029-1040.
- * Tumer Z., Vural B., Tonnesen T., Chelly J., Monaco AP., Horn N. (1995) Characterization of the exon structure of the Menkes disease gene using vectorette PCR, Genomics, 26: 437-442.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Séquence de la reelin

10	20	30	40	50	60	70	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	12345
GGGCGTGCGC	GTGCACACCG	CGCGCGCGCG	CGTCTGGAGG	CGGACGACGC	GCTCTCGGCG	CCCAGCGGCC	CGGTT -208
CCCCCGCGC	TCTCGCTCCG	GCGGCCAAAA	GTAACCTCGG	GAGCCTCGGT	CTCCCGCTAA	CTTCCCCCCG	CGGGC -133
TCGGTTGCC	GGACCCGCTC	GGTCTGAGCC	CGCCGCCGGC	TCGCCTTCCC	CGCACGCGGC	TCCTCCGTGC	CGGTG -58
CCTCCGAAAG	TGGATGAGAG	AGCGCGCGGG	GCGCGCGGGC	GCACGGAGCG	CGGCGGCATG	GAGCGCGGCT	GCTGG 18
GCGCGCGGG	CTCTCGTCTT	GGCCGTGCTG	CTGCTGCTGG	CGACGCTGAG	GCGCGCGCGC	GCCACCGGCT	ACTAC 93
A P R A	L V L A	A V L	L L L A	T L R	A R A	A T G G Y	Y
CCGCTTCT	CGCCTTCT	TTTCTGTG	ATCCACCAG	GGGAGCTGGA	AGGGGATGGG	GATCAGGGC	AGGTG 168
P R F S	P F F	F L C	T H H G	E L E	G D G	E Q G E	V
CTCATTTC	TGCACATTGC	GGGAACCC	ACCTACTACG	TACCGGGACA	GGAATACCAT	GTTACAATTT	CAACA 243
L I S L	H I A	G N P	T Y Y V	P G Q	E Y H	V T I S	T
AGCACCTTCT	TTGATGGCTT	GCTGGTGACG	GGACTCTATA	CCTCGACAAG	CATCCAGTCT	TCTCAGAGCA	TTGGA 318
S T F F	D G L	L V T	G L Y T	S T S	I Q S	S Q S I	G
GGCTCCAGCG	CCTTGGATT	CGGATCATG	TCCGACCAC	AGTTTGGTAA	CCAGTTTATG	CTCAGTGTGG	TGGCC 393
G S S A	F G F	G I M	S D H Q	F G N	Q F M	C S V V	A
TCTCATGTGA	GTCACCTGCC	TACAACCAAC	CTCAGCTTTG	TCTGGATTGC	CCCACCAGCT	GGCACAGGCT	GTGTG 468
S H V S	H L P	T T N	L S F V	W I A	P P A	G T G C	V
AATTTCATGG	CTACTGCAAC	ACATAGGGC	CAGGTGATT	TCAAAGACGC	ACTGGCCAG	CAGCTGTGTG	AACAA 543
N F M A	T A T	H R G	Q V I F	K D A	L A Q	Q L C E	Q
GGAGCTCCCA	CAGAGGCCAC	TGCTTACTCG	CACCTTGCTG	AAATACACAG	TGACAGTGTG	ATCCTACGAG	ATGAC 618
G A P T	E A T	A Y S	H L A E	I H S	D S V	I L R D	D
TTGACTCCT	ACCAGCACT	GGAAATGACC	CCCAACATA	GGGTTGAATG	CAGCAACTGT	GAGATGGGG	AGCAG 693
F D S Y	Q Q L	E L T	P N I W	V E C	S N C	E M G E	Q
TGTGGACCA	TCATGCATGG	CAATGCTGTC	ACCTTCTGTG	AGCCGTACGG	CCCTCGAGAG	CTGACCACCA	CATGC 768
C G T I	M H G	N A V	T F C E	P Y G	P R E	L T T T	C
CTGAACACAA	CAACAGCATC	TGTCCTCCAG	TTTTCCATT	GGTCAGGATC	ATGTCGATTT	AGTACTCTG	ACCCC 843
L N T T	T A S	V L Q	F S I G	S G S	C R F	S Y S D	P
AGCATCACTG	TGTCATACGC	CAAGAACAAT	ACCGCTGATT	GGATTCAGCT	GGAGAAAATT	AGAGCCCCTT	CCAAT 918
S I T V	S Y A	K N N	T A D W	I Q L	E K I	R A P S	N
GTGAGCACAG	TCATCCACAT	CCTGTACCTC	CCCCAGGAAG	CCAAAAGGGA	GAGCGTGCAG	TTCCAGTGA	AACAG 993
V S T V	I H I	L Y L	P E E A	K G E	S V Q	F Q W K	Q
GACAGCTGC	GAGTGGGTGA	GGTGTATGAG	GCCTGCTGGG	CCCTGGATAA	CATCCTGGTC	ATCAATTGAC	CCCAC 1068
D S L R	V G E	V Y E	A C W A	L D N	I L V	I N S A	H
AGAGAAGTCG	TTCTGGAGGA	CAACCTCGAC	CCGGTGCACA	CGGGCAACTG	GCTCTTCTTC	CCTGGAGCAA	CGGTC 1143
R E V V	L E D	N L D	P V D T	G N W	L F F	P G A T T	V
AAGCATAGCT	GTCAGTCAGA	TGGGAADTCC	ATVTATTCT	ATGGAAATGA	AGGCAGCGAG	TTCAATTTG	CCACC 1218
K H S C	Q S D	G N S	I Y F H	G N E	G S E	F N F A	T
ACCCGGGATG	TAGATCTTTC	TACAGAGGAT	ATTCAAGAGC	AGTGGTCCAG	AGAATTTGAG	AGCCAGCCCA	CAGGA 1293
T R D V	D L S	T E D	I Q E Q	W S E	E F E	S Q P T	G
TGGGATATCT	TGGGAGCAGT	AGTTGGTGA	GACTGTGGAA	CCGTAGAAAT	AGGACTATCA	CTGGTGTTC	TCAA 1368
W D I L	G A V	V G A	D C G T	V E S	G L S	L V F L	K
GATGGAGAGA	GGAAGCTTTG	CACCCCTAC	ATGGATACAA	CTGGTTATGG	CAACCTGAGG	TTCTACTTCG	TTATG 1443
D G E R	K L C	T P Y	M D T T	G Y G	N L R	F Y F V	M
GGAGGAATCT	GTGACCCCTGG	AGTCTCTCAT	GAAAACGATA	TCATCTTATA	TGCAAAGATT	GAAGGAAGAA	AAGAA 1518
G G I C	D P G	V S H	E N D I	I L Y	A K I	E G R K	E
CACATTGCAC	TGGACACTCT	TACCTATTCT	TCCATATAAGG	TTCCGTCTTT	GTTTCTGTG	GTCATCAACC	CTGAA 1593
H I A L	D T L	T Y S	S Y K V	P S L	V S V	V I N P	E
CTCAGACAC	CTGCCACCAA	ATTTTGTCTC	AGGCAAAAAG	GCCACCAAGG	GTATAATCGG	AATGCTGGG	CTGTG 1668
L Q T P	A T K	F C L	R Q K S	H Q G	Y N R	N V W A	V
GACTTCTTC	ATGTCTGCC	CGTTCTCCCT	TCAAACAATGT	CTCACTAGAT	CCAGTTTTCT	ATTAATTTGG	GATGC 1743
D F F H	V L P	V L P	S T M S	H M I	Q F S	I N L G	C
GGCACACACC	AGCCTGGGAA	CAGCGTCCAG	TTGGAGTTTT	CTACTAACCA	TGGACGGTCC	TGGTCCCTAC	TCCAC 1818
G T H Q	P G N	S V S	L E F S	T N H	G R S	W S L L	H
ACTGAGTGT	TGCCGGAGAT	CTGTGCAGGC	CCCCACCTCC	CCCACAGCAC	TGTCTACTCC	TCAGAAAAT	ACAGC 1893
T E C L	P E I	C A G	P H L P	H S T	V Y S	S E N Y	S
GGGTGGAACC	GAATCACGAT	TCCTCTCCCT	AATGCAGCAC	TCACCCGAGA	CACCAGGATT	CGCTGGAGAC	AAACA 1968
G W N R	I T I	P L P	N A A L	T R D	T R I	R W R Q	T
GGCCCAATCC	TGGGAAATAT	GTGGGCAATT	GATAATGTTT	ATATAGGTCC	TTCGTGTCTC	AAATTCGTGT	CTGGC 2043
G P I L	G N M	W A I	D N V Y	I G P	S C L	K F C S	G
AGAGGACAAT	GCATCCGGCA	TGGCTGCAAG	GTTGACCCAG	GATTTCTGG	CCCAGCTTGT	GAGATGGCAT	CTCAG 2118
R G Q C	T R H	G C K	C D P G	F S G	P A C	E M A S	Q
ACATTCCCAA	TGTTTATTTT	GGAAAGCTTT	GGCAGTGCCA	GACTTTCTCT	TTACCATAAC	TTTTACTCTA	TCCGT 2193
T F P M	F I S	E S F	G S A R	L S S	Y H N	F Y S I	R
GGTGCTGAAG	TCAGCTTTGG	TTGTTGGTGC	TTAGCCAGTG	GTAAGGCTCT	GGTTTTCAAC	AAAGATGGGA	GGCGG 2268
G A E V	S F G	C G V	L A S G	K A L	V F N	K D G R	R
CAGCTAATCA	CGTCCTTCT	GGACAGCTCG	CAGTCCAGGT	TTCTTCAGTT	TACACTGAGG	CTGGGGAGCA	AGTCT 2343
Q L I T	S F L	D S S	Q S R F	L Q F	T L R	L G S K	S
GTGCTGAGCA	CGTGACAGAC	CCCTGACCAA	CCGGGGGAGG	GAGTCTCTGT	GCATATTCA	TATGACAACG	GGATA 2418
V L S T	C R A	P D Q	P G E G	V L L	H Y S	Y D N G	I
ACATGGAAAC	TCCTGGAGCA	CTATTCTTAC	GTCAACTACC	ACGAGCCCAG	AATAATCTCT	GTAGAGCTAC	CGGAT 2493
T W K L	L E H	Y S Y	V N Y H	E P R	I I S	V E L P	D

10	20	30	40	50	60	70	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	12345
GATGCAAGAC	AGTTTGGAA	CCAGTTCAGA	TGGTGGCAGC	CTTACCATT	TTCCCAAGGA	GAAGACGTGT	GGGCC 2568
D A R Q	F G I	Q F R	W W Q P	Y H S	S Q G	E D V W	A
ATTGATGAGA	TTGTCATGAC	CTCAGTCCTG	TTCACACAGCA	TCAGTCTCGA	CTTTACCAAT	CTTGTGGAA	TCACT 2643
I D E I	V M T	S V L	F N S I	S L D	F T N	L V E V	T
CAATCCCTGG	GATTCTACCT	TGGCAATGTT	CAACCATACT	GTGGCCATGA	CTGGACGCTT	TGTTTTACGG	GAGAT 2718
Q S L G	F Y L	G N V	Q P Y C	G H D	W T L	C F T G	D
TCTAAACTTG	CCTCAAGCAT	GCGCTATGTG	GAAACACAGT	CCATGCAGAT	CGGAGCATCC	TATATGATT	AGTTC 2793
S K L A	S S M	R Y V	E T Q S	M Q I	G A S	Y M I Q	F
AGCCTAGTGA	TGGATGTGG	CCAGAAATAC	ACTCCTCACA	TGGACAACCA	GGTGAAGCTG	GAGTACTCAG	CCAAC 2868
S L V M	G C G	Q K Y	T P H M	D N Q	V K L	E Y S A	N
CACGGCCTTA	CATGGCACCT	TGTACAAGAA	GAATGCCTTC	CCAGTATGCC	AAGCTGCCAG	GAATTTACAT	CTGCC 2943
H G L T	W H L	V Q E	E C L P	S M P	S T C	E F T S	A
AGCATTTACC	ATGCCAGCGA	GTTACACAG	TGGAGAAGAG	TCACTGTGT	TCTTCCCAG	AAAACATGGT	CCGGT 3018
S I Y H	A S E	F T Q	W R R V	T V V	L P Q	K T W S	G
GCCACCCGCT	TCCGTGGAG	TCAGAGCTAT	TACACAGCCC	AGGATGAGTG	GGCTTTAGAC	AACATTTACA	TTGGG 3093
A T R F	R W S	Q S Y	Y T A Q	D E W	A L D	N I Y I	G
CAGCATGGCC	CCAACATGTC	CAGTGGY	GGTTCATGT	ACCTGGCGT	GTGCAGGTGT	GCCAGGGT	ACCAG 3168
Q Q C P	N M C	S G H	G S C D	H G V	C R C	D Q G Y	Q
GGCACTGAAT	GCCACCCAGA	AGCTGCACTT	CCTTCCACGA	TTATGTCAGA	TTTTGAGAAC	CCGAGCAGTT	GGGAA 3243
G T E C	H P E	A A L	P S T I	M S D	F E N	P S S W	E
TCAGACTGGC	AGGAAGTTAT	TGGGGGAGAA	GTTGTAAGC	CTGAGCAAGG	CTGTGGAGTC	GTGTCTTCTG	GATCT 3318
S D W Q	E V I	G G E	V V K P	E Q G	C G V	T S S G	S
TCTCTGTACT	TCAGCAAGGC	TGGGAAGGG	CAGCTGGTGA	GCTGGGACT	GGACACATCC	VGGTGGACT	TTGTC 3393
S L Y F	S K A	G K R	Q L V S	W D L	D T S	W V D F	V
CAGTTCTACA	TCCAGATAGG	AGGAGAGAGT	GCTGCATGCA	ACAAGCCTGA	CAGCAGAGAG	GAGGGCATT	TGCTC 3468
Q F Y I	Q I G	G E S	A A C N	K P D	S R E	E G I L	L
CAGTAGCA	ACAACGGGG	CATCCAGTGG	CACATCGTGG	CAGAGATGTA	CTTCTCAGAC	TTCAGCAAAC	CCAGA 3543
Q Y S N	N G G	I Q W	H L L A	E M Y	F S D	F S K P	R
TTGTCTACC	TGGAGTCCC	AGCTGCTGGG	AAGACCCTT	GTACCAGTT	CCGCTGGTGG	AAGCCTGTGT	TCTCG 3618
F V Y L	E L P	A A G	K T P C	T R F	R W W	K P V F	S
GGGAGYACT	ATGCCAGTG	GGCCGTGAT	GATATCATCA	TTCTGTCAGA	GAAGCAGAAG	CAGGTTATCC	CAGTT 3693
G E D Y	D Q W	A V D	D I I I	L S E	K Q K	Q V I P	V
GTCAACCCAA	CTTTGCCCA	GAACCTCTAT	GAGAAGCCAG	CTTTGATTA	CCCTATGAAC	CAAATGAGTG	TGTGG 3768
V N P T	L P Q	N F Y	E K P A	F D Y	P M N	Q M S V	W
CTAATGTTGG	CCAATGAAGG	CATGGCTAAA	AACGACAGCT	TCTGTGCGAC	CACGCCGTCA	GCCATGGTGT	TTGGA 3843
L M L A	N E G	M A K	N D S F	C A T	T P S	A M V T	G
AAGTCAGATG	GAGACCGGTT	TGCAGTAACT	CGAGATCTGA	CCTGAAACC	TGGATATGTG	CTGCAGTTCA	AGCTA 3918
K S D G	D R F	A V T	R D L T	L K P	G Y V	L Q F K	L
AACATAGGCT	GCACCAGCCA	GTTACAGCAGC	ACTGCCCCGG	TTCTCCTGCA	GTATTCACAT	GATGCCGGCA	TGTCG 3993
N I G C	T S Q	F S S	T A P V	L A L Q	Y S H	D A G M	S
TGTTTCTGT	TGAAGGAAAG	ATGCTTCCCA	CGCTCAGCAG	CCAALAGATG	TGAAGGAAAC	TCCAGGGAAAT	TGAGT 4068
W F L L	K E G	C F P	A S A A	K G C	E G N	S R E L	S
GAGCCTACTG	TCTATTATAC	TGGGGACTTC	GAAGAATGGA	CTAGAATCAC	CATTGCCATT	CCAAGGTCCC	TTGCA 4143
E P T V	Y Y T	G D F	E E W T	R I T	I A I	P R S L	A
TCCAGCAAGA	CCAGATTCCG	ATGGATCCAA	GAGAGCAGCT	CTCAGAAGAA	TGTGCCCCCG	TTGGCTTLAG	ATGGG 4218
S S K T	R F R	W I Q	E S S S	Q K N	V P P	F G L D	G
GTGTACATAT	CTGAGCCTTG	TCCCAGTTAC	TGCAGTGGCC	ATGGAGACTG	CATCTCGGGG	GTGTGTTTTT	GTGAC 4293
V Y I S	E P C	P S Y	C S G H	G D C	I S G	V C F C	D
CTGGGGTACA	CAGCTGCACA	AGGAACCTGT	GTGTCAAACA	CCCCTAACCA	CAGTGAGATG	TTCGACAGGT	TTGAG 4368
L G Y T	A A Q	G T C	V S N T	P N H	S E M	F D R F	E
GGGAAGCTAA	GCCCACTGTG	GTACAAAATC	ACCGGGGGTC	AGGTTGGCAC	GGGCTGTGGC	ACCCTCAATG	ACGGC 4443
G K L S	P L W	Y K I	T G G Q	V G T	G C G	T L N D	G
AGGTCCCTCT	ACTTTAATGG	CCTTGGGAAA	AGGGAAGCCA	GGACAGTCCC	ACTGGACACC	AGGAATATCA	GTCTT 4518
R S L Y	F N G	L G K	R E A R	T V P	L D T	R N I S	L
GTTCAGTTTT	ATATCAAAT	TGGAAGTAAA	ACATCAGGGA	TTACTGTACAT	CACCCACGG	GCTAGATATG	AGGGG 4593
V Q F Y	I Q I	G S K	T S G I	T Y I	T P R	A R Y E	G
CTGTGTGTT	AGTATTCCAA	TGATAATGGG	ATACTTTGGC	ATTTGTGAG	AGAGTTGGAT	TTCATGTCAT	TCCTG 4668
L V V Q	Y S N	D N G	I L W H	L L R	E L D	F M S F	L
GAGCCACAGA	TCATTTCCAT	TGACNTGCC	CGGGAAGCAA	AGACACCTTC	CACAGCTTTC	CGGTGGTGGG	AGCCG 4743
E P Q I	I S I	D L P	R E A K	T P A	T A F	R W W Q	P
CAGCATGGGA	AGCATTCCGG	CCAGTGGGCT	TTGGGTGATG	TCCTTATAGG	AGTGAATGAC	AGCTCTCAAA	CTGGA 4818
Q H G K	H S A	Q W A	L G D V	L I G	V N D	S S Q T	G
TTCAAGATA	AATGGATGG	CTCCATAGAC	TTGCAAGCCA	ACTGGTATCG	AATCCAGGGA	GGCCAAGTTG	ATATC 4893
F Q D K	L D G	S I D	L Q A N	W Y R	I Q G	G Q V D	I
GACTGCCTCT	CTATGGACAC	TGCCCTTATA	TTCACTGAAA	ACATAGGAAA	CCCTCGCTAT	GCTGAGACCT	GGGAC 4968
D C L S	M D T	A L I	F T E N	I G N	P R Y	A E T W	D
TTCCATGTGT	CAGAGTCAAG	CTTCTTACAG	TGGGAAATGA	ACATGGGCTG	CAGCAAGCCT	TTCAGTGGT	CCCAC 5043
F H V S	E S S	F L Q	W E M N	M G C	S K P	T S G A	H
GGCATAACAGC	TCCAGTACTC	TCTGAACAAC	GGCAAGGACT	GGCAGCTTGT	CACCGAAGAG	TGTGTCCCCTC	CAACC 5118
G I Q L	Q Y S	L N N	G K D W	Q L V	T E E	C V P P	T
ATTGGGTGCG	TGCACTACAC	AGAGAGTTCA	ACTTACACAT	CAGAAAGATT	CCAGAACTGG	AGGCGGGTCA	CGGTC 5193
I G C V	H Y T	E S S	T Y T S	E R F	Q N W	R R V T	V
TACCTGCCAC	TGCCACCAA	TTCTCCCAGG	ACTCGGTTCA	GATGGATTCA	GACCAACTAT	ACTGTTGGAG	CAGAT 5268
Y L P L	A T N	S P R	T R F R	W I Q	T N Y	T V G A	D

10	20	30	40	50	60	70		
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	12345	
TCCTGGGCTA	TTGATAATGT	CATCCTGGCC	TCGGGCTGTC	CTTGGATGTG	CTCAGGACGA	GGGATCTGTG	ATTTCG	5343
S W A I	D N V	I L A	S G C P	W M C	S G R	G I C D	S	
GGGCCTGTG	TGTGTGACCG	GGGCTTCGGT	GGACCCTTCT	GTGTTCTGT	TGTTCTCTT	CCCTCCATK	TAAAA	5418
G R C V	C D R	G F G	G P F C	V P V	P S I L	V P L	K	
GATGATTCA	ATGGAACTT	ACATCCTGAC	CTTTGGCCTG	AAGTPTACGG	GGCAGAGAGG	GGCAATCTGA	ATGGC	5493
D D F N	G N L	H P D	L W P E	V Y G	A E R	G N L N	G	
GAAACCATCA	AATCCGGAAC	ATGTCTGATC	TTTAAAGGGG	AGGGACTAAG	AATGCTTATT	TCCAGAGATC	TAGAT	5568
E T I K	S G T	C L I	F K G E	G L R	M L I	S R D L	D	
TGCACCAATA	CTATGTATGT	CCAGTCTCT	CTCCGATTTA	TAGCGAAAGG	TACCCAGAG	AGGCTCACT	CCATC	5643
C T N T	M Y V	Q F S	L R F I	A K G	T P E	R S H S	I	
CTTCTACAGT	TCTCTGTCAG	TGGAGGAGTC	ACCTGGCACC	TGATGGATGA	ATTCTACTTC	CCTCAAACGA	CCAGG	5718
L L Q F	S V S	G G V	T W H L	M D E	F Y F	P Q T T	R	
ATACTTTTCA	TCAATGTTCC	CTTACCATAC	GGTGCCCAA	CCAACGCTAC	AAGATTCAGA	CTCTGGCAAC	CGTAC	5793
I L F I	N V P	L P Y	G A Q T	N A T	R F R	L W Q P	Y	
AATAATGGTA	AGAAAGAAGA	AATCTGGATC	ATTGATGACT	TTATTATTGA	TGAAACAAT	TTGAACAACC	CCGTG	5868
N N G K	K E E	I W I	I D D F	I I D	G N N	L N N P	V	
CTGCTGTGG	ACACGTTCTGA	CTTTGGGCCC	AGGGAAGACA	ATTGGTTTTT	CTATCCGGGT	GGTAATATCG	GACTT	5943
L L L D	T F D	L S V	R E D N	I I Q	F P G	G N I G	L	
TACTGCCCGT	ATTCTTCAA	GGGAGCTCCT	GAGGAGGATT	CGGCCATGGT	GTTTGTTC	AACGAAGTTG	GAGAA	6018
Y C P Y	S S K	G A P	E E D S	A M V	F V S	N E V G	E	
CACTCCATTA	CCACACGAGA	CCTAAGTGTG	AACGAGAACA	CCATCATCA	ATTTGAGATC	AATGTTGGCT	GCTCC	6093
H S I T	T R D	L S V	N E N T	I I Q	F P G	N V I G	S	
ACTGATAGTT	CTTCTGCTGA	TCCGGTCAGA	CTGGAATTCT	CAAGGGACTT	TGGAGCCACC	TGGCACCTGC	TGCTG	6168
T D S S	S A D	P V R	L E F S	R D F	G A T	W H L L	L	
CCTCTCTGCT	ACCACAGCAG	CAGCCTCGTC	AGCTCCTTAT	GCCTCACTGA	GCATCACCCG	AGCAGCACCT	ACTAC	6243
P L C Y	H S S	S L V	S S L C	S T E	H H P	S S T Y	Y	
GGGGGACCA	CCCAGGGCTG	GGGGGGGAG	GCTGTGCACT	TCGGAAAGCT	GCACCTTGTG	GGATCTGTGC	GTTTC	6318
A G T T	Q G W	R R E	V V H F	G K L	H L C	G S V R	F	
CGTTGGTACC	AGGGATTTTA	TCCTGCTGGC	TCTAGCCCG	TCACATGGGC	CATTGACAAT	GTCTACATTG	GTCCC	6393
R W Y Q	G F Y	P A G	S Q P V	T W A	I D N	V Y I G	P	
CAGTGTAAAG	AGATGTGCTA	TGGGCACGGG	AGCTGCATCA	ATGAAACCAA	GTGTATATGT	GACCCGGGCT	ACTCT	6468
Q C E E	M C Y	G H G	S C I N	G T K	C I C	D P G Y	S	
GGGCCAACCT	GTAATAAAG	CACCAAATA	CCTGATTTTC	TCAAAGACGA	CTTTGAAGGT	CAACTGGAAT	CCGAT	6543
G P T C	K I S	T K N	P D F L	K D D	F E G	Q L E S	D	
CGATTCTTAC	TGATGAGCGG	TGGGAAGCCG	TCTCGTAAGT	GTGGCATCTT	TTCCAGTGGG	AACAACCTCT	TCTTC	6618
R F L L	M S G	G K P	S R K C	G I L	S S G	N N L F	F	
AATGAGGACG	GCTTGCGCAT	GCTAGTAACA	CGGGACCTGG	ATTTATCAC	TGCAAGGTTT	GTGCAGTTCT	TCATG	6693
N E D G	L R M	L V T	R D L D	L S H	A R F	V Q F F	M	
AGACTGGGAT	GTGGTAAAGG	TGTTCCAGAC	CCAGGAGCC	AGCCCGTGCT	TCTGCAGTAC	TCCCTCAATG	GCGGC	6768
R L G C	G K G	V P D	P R S Q	P V L	L Q Y	S L N G	G	
CTCTCCTGGA	GTCCTTTTCA	AGAGTTCCCT	TTCAGCAACT	CCAGCAATGT	GGGCAGGTAC	ATTGCCCTGG	AAATG	6843
L S W S	L L Q	E F L	F S N S	S N V	G R Y	I A L E	M	
CCCCTGAAAG	CCCCTTCTGG	TTCGACACGC	CTCCGCTGGT	GGCAGCCATC	TGAAAATGGG	CACTTCTATA	GCCCC	6918
P L K A	R S G	S T R	L R W W	Q P S	E N G	H F Y S	P	
TGGGTGATCG	ACCAGATTCT	TATTGAGGGA	AATATCTSG	GTAATAGACT	CTTAGAAGAT	GATTTCTCAA	CTCTG	6993
W V I D	Q I L	I G G	N I S G	N T V	L E D	D F S T	L	
GACAGCAGAA	AGTGGCTGCT	TCACCCAGGA	GGCACAAGA	TGCCTGTGTG	TGGCTCCACA	GGCGATGCC	TGGTC	7068
D S R K	W L L	H P G	G T K M	P V C	G S T	G D A L	V	
TTTATTGAAA	AGGCCAGCAG	CCGTTACGTG	GTCACGACG	ACATCGCTGT	GAATGAGGAC	TCATTCTTAC	AGATA	7143
F I E K	A S T	R Y V	V T T D	I A V	N E D	S F L Q	I	
GACTTTGCTG	CCTCCTGTCT	AGTCACAGAC	TCCTGTCTATG	CTATTGAACT	GGAGTACTCG	GTGGATCTCG	GTCTG	7218
D F A A	S C S	V T D	S C Y A	I E L	E Y S	V D L G	L	
TCGTGGCACC	CGTGGTGAG	GGACTGCCTG	CCTACCAATG	TTGAGTGTAG	TCGTTACCAC	CTGCAGCGGA	TCCTG	7293
S W H P	L V R	D C L	P T N V	E C S	R Y H	L Q R I	L	
GTGTAGATA	CTTCAACAA	GTGGACAGGA	ATCACTCTGC	CCCTGCCTTC	CTACACCAGG	TCTCAAGCCA	CTCGT	7368
V S D T	F N K	W T R	I T L P	L P S	Y T R	S Q A T	R	
TTCCGCTGGC	ATCAGCCAGC	GCCTTTTGAC	AAGCAGCAGA	CCTGGGCAAT	AGATAATGTC	TATATTGGGG	ATGGT	7443
F R W H	Q P A	P F D	K Q Q T	W A I	D N V	Y I G G	G	
TGCCTAGACA	TGTGCAGTGG	CCACGGGAGA	TGCGTCCAG	GAAGCTGTGT	CTGTGATGAA	CAGTGGGAG	GCTG	7518
C L D M	C S G	H G R	C V Q G	S C V	C D E	Q W G G	L	
TACTGTGATG	AGCCTGAGAC	CTCCCTTCCC	ACCCAGCTCA	AAGACAATT	CAACCGAGCC	CCCTCCAACC	AGAAC	7593
Y C D E	P E T	S L P	T Q L K	D N F	N R A	P S N Q	N	
TGGCTGACTG	TGAGCGGTGG	GAAGCTGAGT	ACAGTGTGTG	GGGCTGTGGC	TTCCGGCCTG	GCTCTCCATT	TCAGT	7668
W L T V	S G G	K L S	T V C G	A V A	S G L	A L H F	S	
GGGGGCTGCA	GCCGATTGTT	AGTCACTGTG	GATCTGAACC	TCACCAATGC	TGAGTTTATC	CAGTTTACT	TTATG	7743
G G C S	R L L	V T V	D L N L	T N A	E F I	Q F Y F	M	
TATGGATGCL	TCATTACGCC	GAGCAACCGT	AACCAGGGAG	TCCTGTGGA	GTACTCTGTC	AATGGAGGCA	TCACC	7818
Y G C L	I T P	S N R	N Q G V	L L E	Y S V	N G G I	T	
TGGAACCTGC	TGATGGAGAT	TTTCTATGAC	CAGTACAGCA	AACCTGGATT	TGTGAATATC	CTTCTCCCTC	CTGAT	7893
W N L L	M E I	F Y D	Q Y S K	P G F	V N I	L L P P	D	
GCTAAAGAGA	TTGCCACTCG	CTTCCGATGG	TGGCAGCCAC	GACATGATGG	CCTTGACCAG	AATGACTGGG	CCATT	7968
A K E I	A T R	F R W	W Q P R	H D G	L D Q	N D W A	I	
GACAATGTCC	TCATCTCGGG	CTCTGCGGAC	CAGAGGACAG	TCATGTGGA	CACCTTTAGC	AGCGCCCCAG	TACCA	8043
D N V L	I S G	S A D	Q R T V	M L D	T F S	S A P V	P	

10	20	30	40	50	60	70	12345	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	12345	
CAGCATGAGC	GCTCCCCCGC	AGACGCTGGC	CCTGTTGGAA	GAATTGCTTT	TGAAATGTTT	TTAGAAGACA	AAACT	8118
Q H E R	S P A	D A G	P V G R	I A F	E M F	L E D K	T	
TCAGTGAATG	AGAATTGGCT	CTTCCATGAT	GACTGTACAG	TGGAAAGATT	CTGTGACTCG	CCAGATGGTG	TCATG	8193
S V N E	N W L	F H D	D C T V	E R F	C D S	P D G V	M	
CTCTGTGGCA	GCCATGATGG	ACGAGAGGTG	TATGCAAGTG	CTCATGACCT	GACGCCCCT	GAGAAGTTGA	TCATG	8268
L C G S	H D G	R E V	Y A V T	H D L	T P T	E N W I	M	
CAGTTCAAGA	TCTCTGTTGG	ATGCAAAGTG	CCTGAAAAAA	TTGCCAGAA	TCAAATTCAC	GTGAGTTTT	CTACT	8343
Q F K I	S V G	C K V	P E K I	A Q N	Q I H	V Q F S	T	
GACTTTGGCG	TGAGCTGGAG	TTATTTAGTC	CCTCAGTGCT	TACCCGCCGA	CCCAAAGTGT	TCTGGAAGCG	TTTCT	8418
D A F G V	S W S	Y L V	P Q C L	P A D	P K C	S G S V	S	
CAACCGTGT	TGTTTCC	AACTGAAGGG	TGGAAAAAG	TCACCTAGAA	GCTTCCTGAA	AGCTTAACGG	GGAAT	8493
Q P S V	F F P	T E G	W K R I	T Y P	L P E	S L T G	N	
CCTGTAAGAT	TTAGGTTCTA	CCAAAAGTAC	TCAGATGTGC	AGTGGGCAAT	TGACAATTTT	TACCTTGGCC	CTGGA	8568
P V R F	R F Y	Q K Y	S D V Q	W A I	D N F	Y L G P	G	
TGTTTGGACA	ACTGTGGAG	CCAGGAGAC	TGCCTAAAG	AACAGTGTAT	CTGTGACCCA	GGCTACTCAG	GGCA	8643
C L D N	C G G	H G D	C L K E	Q C I	C D P	G Y S G	P	
AACTGCTACT	TAACTCACAG	CCTGAAGACT	TTCCTGAAG	AGCGCTTGA	CAGTGAGGAG	ATCAAGCCTG	ACTTA	8718
N C Y L	T H S	L K T	F L K E	R F D	S E E	I K P D	L	
TGGATGTCT	TGGAAGGGC	AAGCACTTGT	ACAGAGTGGC	GGGCTCCTGC	CGAGAACACT	GCACTCTATT	TTGGG	8793
W M S L	E G G	S T C	T E C G	V L A	E N T	A L Y F	G	
GGATCCACTG	TGAGACAAGC	TATTACTCAA	GACTTAGATC	TCAGAGGTGC	AAAATTCCTG	CAGTACTGGG	GACGT	8868
G S T V	R Q A	I T Q	D L D L	R G A	K F L	Q Y W G	R	
ATCGGCAGTG	AGAACAACAT	GACATCTTGC	CATCGGCCTG	TCTGGCGAA	GGAAGGCGTG	CTGCTGGACT	TCTCT	8943
I G S E	N N M	T S C	H R P V	C R K	E G V	L L D F	S	
ACGGATGGAG	GAATCACTTG	GACCTTGCTT	CACGAGATGG	ATTTCCAGAA	ATACATTTCT	GTGAGGCACG	ACTAC	9018
T D G G	I T W	T L L	H E M D	F Q K	Y I S	V R H D	Y	
ATCCTCCTGC	CTGAGGGGGC	CCTCACCAAC	ACAACCTGCAC	TTGCTGTTGG	GCAGCCTTTT	GTCATCAGCA	ATGGG	9093
I L L P	E G A	L T N	T T R L	R W W	Q P F	V I S N	G	
CTGTTGGTTT	CCGGGGTGG	AGCGTGGCA	GTGGGCTGCT	GACAACATTC	TGATTGGTGG	AGCAGAAATC	ATCCA	9168
L V V S	G V G	A C A	V G T G	Q H S	D W W	S R N H	P	
AGCCAACTGG	TGGACTTTT	CGATGACGAA	GGCTCCTCCC	ATGAAGAAAA	CTGGAGTTTT	TACCTAATG	CAGTA	9243
S Q L V	D T F	D D E	G S S H	E E N	W S F	Y P N A	V	
AGACAGCAGC	GATTCTGTGG	CAACCEATCC	TTCCASCTCT	ACTGGCCAAA	TAAAAGAAG	GACAAGACCC	ACAAT	9318
R T A G	F C G	N P S	F H L Y	W P N	K K K	D K T H	N	
GCACTCTCCT	CCCAGAGCT	CATTATACAG	CCAGGATACA	TGATGCAATT	TAAAATTGTG	GTGGGTTGTG	AAGCC	9393
A L S S	R E L	I I Q	P G Y M	M Q F	K I V	V G C E	A	
ACTTCATSG	GTGACCTTCA	TTCCGTGAT	CTGGAGTACA	CCAAGGATGC	AAGGTCCGAT	TCTTGGCAGC	TCGTG	9468
T S C G	D L H	S V M	L E Y T	K D A	R S D	S W Q L	V	
CAGACCCAGT	GCCTACCTTC	CTCTTCCAAT	AGCATTTGCT	GCTCCCCGTT	CCAGTTCCAT	GAAGCCACCA	TTTAT	9543
Q T Q C	L P S	S S N	S I G C	S P F	Q F H	E A T I	Y	
AATGCTGTCA	ACAGCTCAAG	CTGGAAGAGG	ATCACCATCC	AGCTCCCAGA	CCACGTCTCG	TCAAGTGCCA	CACAG	9618
N A V N	S S S	W A R	I T I Q	L P D	H V S	S S A T	Q	
TCCGCTGGA	TCCGAAGGG	AGAAGAAAAC	GAGAAGCAA	GCTGGGCACT	CGAGCACGCTG	TACATCGGAG	AGGCT	9693
F R W I	Q K G	E E T	E K Q S	W A I	D H V	Y I G E	A	
TGTTCCAAAGC	TCTGCACGG	GCATGGCTAC	TGCACCACAG	GGGCCGCTGT	CATCTGCGAT	GAAAGCTTCC	AAGGT	9768
C P K L	C S G	H G Y	C T T G	A V C	I C D	E S F Q	G	
GACGACTGCT	CTGCTTTCAG	TCACGAGCTT	CCTAGTTACA	TAAAGATAA	TTTTGAATCA	GCAAGAGTCA	CTGAA	9843
D D C S	V F S	H E L	P S Y I	K D N	F E S	A R V T	E	
GCCAAGTGGG	AAACCATCCA	GGGTGGAGTG	ATCGGAAGTG	GCTGTGGCCA	GCTGGCGCCC	TATGCCCATG	GAGAT	9918
A N W E	T I Q	G G V	I G S G	C G Q	L A P	Y A H G	D	
TCGCTACT	TTAATGTTG	TCAGATAAGG	CAAGCTGCCA	CCAAGCCTACT	GGACCTCACT	CGAGCAAGCA	AAATT	9993
S L Y F	N G C	Q I R	Q A A T	K P L	D L T	R A S K	I	
ATGTTTGTCT	TGCAAATGG	GAGCCCAGCC	CAGACAGACA	GTTGCAACAG	CGACCTCAGC	GGCCCCACA	CCGCG	10068
M F V L	Q I G	S P A	Q T D S	C N S	D L S	G P H T	A	
GACAAAGCAG	TACTGTGCA	GTACAGTGTC	AACAATGGCA	TCACCTGGCA	CGTCATCGCT	CAGCACAGC	CGAAG	10143
D K A V	L L Q	Y S V	N N G I	T W H	V I A	Q H Q P	K	
GACTTCACAC	AAGCTCAGCG	GGTGTCTTAC	CACGTCCCC	TGGAAGCTCG	GATGAAAGGA	GTCTACTGC	GCTGG	10218
D F T Q	A Q R	V S Y	H V P L	E A R	M K G	V L L R	W	
TGGCAGCCAC	GCCACAATG	AACAGGTCAT	GATCAATGGG	CTTTGGACCA	TGTGGAGGTC	GTCCTAGTAA	GCACT	10293
W Q P R	H N G	T G H	D Q W A	L D H	V E V	V L V S	T	
CGCAAAACAAA	ATTACATGAT	GAATTTTTCA	CGGCAACATG	AGCTCAGGCA	CTTCTACAAC	AGAAGACGAA	GGTCG	10368
R K Q N	Y M M	N F S	R Q H G	L R H	F Y N	R R R R	S	
CTTAGGCGAT	ACCCATGAAG	AATCCAAGTT	TATTTCCCTT	TCCAGCGTAC	AATGTGTC	TTCTGTGTTT	TTTGA	10443
L R R Y	P							
AACACCTCTC	ACTGCATCTG	ATATCAGGAA	ACAAAGATGA	AGGACTTGCC	GAACAGAAAG	CCCTTCGAGA	TCTTG	10518
GTGACCCAC	CTTCCACAC	TGTGAGCTAA	TGATGTGTGG	TTTCTCTGCA	CATAAGTAAA	TGTCTTCACG	TCAGT	10593
CGTCCCGTGG	AAATTGTGAT	CTGTTGTAAT	ATCAGTTACA	GTGGCAGTAT	TGAGAATAAG	AAATAGTTTA	ACAGG	10668
AAAAAACGTT	TAAGCACAAA	CATTTTTAAG	ATCTTATGTT	TTAAGTGCCA	TTTTAGCACA	GTATTTAACA	TTGTT	10743
GGTCACCGAG	CTATTTAAGT	AGACTGTATT	TCAGCTCTGT	CTCTTGTTTA	ATATGAATAA	GTTCTCGTCG	TTTGT	10818

10	20	30	40	50	60	70	
1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	12345
CCTTTATGTA	TTCTTCTCTA	CCGTATAACA	CACTGAAACT	GTATCTACTT	GCTGTGTTGC	AATATTTTGC	TGCTG 10893
GACTTTGACC	TACTTGTATT	ATGCAGAAAAG	TTAATGCAGA	TACCTATTCA	AGATGATAAC	TGTAAAGACA	CTGCT 10968
GTCTCCTTAA	TATGCTCCTT	AACACGTATG	TTGATGTAGC	ATCATTTTGT	GGATAGGAAA	AAAAATGTTT	GACCT 11043
TCAGATATTT	TCTACTTAAA	AAATTGTGGA	TGAACGCCCT	ATCTCCCTCC	CACAGTGAGT	CCCCATTACC	TTGTC 11118
TAAAACAATT	TTTTAATGTG	TTCTGTGGCC	GTTTACTGA	CAGTAACTGC	CATTCGTGT	CTGTGGTAAC	AAAGT 11193
GACTTGTAAG	ATGGTGGATG	TTCCCTCAC	TGTGTTCTCT	TCGTGGGTTG	TTTCCTTGTG	GGTCATAGTC	ATACC 11268
TTCTGATGAG	GTGGAGCCAA	CACCAGCAAA	GTATGATGGC	CCTGTAGCCT	CTGACTAGTC	CTGAAACAGA	AGGCT 11343
GCACTCTAGG	CTGAACCATG	CTAAAAGCCC	ATGCTTAAAT	AAAAAATG			11391

Annexe 2

LISTE AMORCES PCR REELIN

PS : lettres en italique si erreur par rapport séquence cDNA

Nom amorce	Séquence amorce (5' -> 3')	Size	TM (°C) (2AT+4GC)
UPF	CCT CCG CAC CTT CTT AAA GCC	21	66
CplUPF	GGC TTT AAG AAG GTG CGG AGG	21	66
UPA ->	GGC GTC GCG TGC ACA CCG G	19	68
UPD2 <-	GCG TCG TCC GCC TCC GAG CG	20	72
UPB <-	GGA GGC ACC GGC ACG GAG GAG	21	74
Signal1 ->	CTG CTG CTG GCG ACG CTG AG	20	68
Signal2 <-	CTC AGC GTC GCC AGC AGC AG	20	68
4.14 <-	GTG ATG GGT GCA CAG GAA	18	56
Cpl4.14 ->	TTC CTG TGC ACC CAC CAC	18	58
SAND1 ->	<u>AAG AAT TCT</u> GTG CAC CCA CCA CGG G	25	78
RNASPL1 <-	GCA ATG TGC AGG GAA ATG AGC	21	64
4.5 ->	GAT GGC TTG CTG GTG ACG	18	58
Cpl4.5 <-	CCG TCA CCA GCA AGC CAT C	19	62
IRO7 <-	AGA CTG GAT GCT TGT CGA GG	20	62
CplIRO7 ->	CCT CGA CAA GCA TCC AGT C	19	60
4.9 <-	GGC CAC CAC ACT GCA CAT	18	58
Cpl4.9 ->	ATG TGC AGT GTG GTG GCC TC	20	64
4.4 <-	AAA ATC ACC TGG CCC CTA	18	54
VDEB1 ->	<u>AAG AAT TCA</u> TAG GGG CCA GGT GAT TTT	27	
SPOND1 ->	ACG CAC TGG CCC AGC AGC TG	20	68
SPOND2 <-	AGC TGC TGG GCC AGT GCG TC	20	68
SAND2	TTT CTA GAT TAA GCA GTG GCC TCT GTG GG	29	
CplSAND2	CCA CAG AGG CCA CTG CTT ACT C	22	70
GD4-6 <-	GGT CAA TTC CAG TTG CTG	18	54
Cpl4-6 ->	TAC CAG CAA CTG GAA TTG ACC	21	62
12E ->	CAA CAA CAG CAT CTG TCC	18	54
Cpl12E <-	GGA CAG ATG CTG TTG TTG TG	20	60
12F ->	CCA TTG GGT CAG GAT CAT G	19	58
12H <-	TCT CCA GCT GAA TCC AAT CAG C	22	66
Cpl12H ->	GCT GAT TGG ATT CAG CTG GAG	21	64

12G <-	ACT CGC AGG CTG TCC TGT TTC C	22	70
12K ->	ATC CTG GTC ATC AAT TCA GCC	21	62
12B <-	CTT GAC CGT TGC TCC AGG	18	58
12C ->	CCT GGA GCA ACG GTC AAG	18	58
1211C	ATA GCT GTC AGT CAG ATG GG	20	60
1211A <-	GAA CTC GCT GCC TTC ATT TCC	21	64
1211B ->	GGA AAT GAA GGC AGC GAG TTC	21	64
11A ->	GTC AGA AGA ATT TGA GAG CCA G	22	60
11B <-	CTC TCA AAT TCT TCT GAC	18	50
N11A	GTA GTT GGT GCA GAC TGT GG	20	62
2T7.4	GAA CCT CAG GTT GCC ATA ACC	21	64
27A	GGA ATC TGT GAC CCT GGA	18	56
VDEB2	AAT CTA GAT TAG ATG ATA TCG TTT TCA TGA GAG A	34	
27B	ACC TTA TAG GAA GAA TAG G	19	52
N27A <-	GGC TCT TTT GCC TGA GAC	18	56
N27B	GTC TCA GGC AAA AGA GCC	18	56
N27C ->	CAA TGT CTC ACA TGA TCC AG	20	58
8E	TCT ACT AAC CAT GGA CGG	18	54
Cp18E ->	CTA CTA ACC ATG GAC GGT CC	20	62
8A ->	TCA CGA TTC CTC TCC CTA	18	54
8D <-	TAG GGA GAG GAA TCG TGA	18	54
8B	TGG CAG CCA TGC CGA GTG	18	60
8F ->	TTA TAT AGG TCC TTC GTG TCT C	22	62
8C ->	CAC TCG GCA TGG CTG CAA	18	58
4113A ->	GAT GGC ATC TCA GAC ATT CC	20	60
4113B <-	GGA ATG TCT GAG ATG CCA TC	20	60
13C <-	GAT AGA GTA AAA GTT ATG	18	46
13D ->	ACA GCT CGC AGT CCA GGT	18	58
RL22A <-	GCT CAG CAC AGA CTT GCT CC	20	60
RL22C ->	CCT GCT GCA CTA TTC ATA TG	20	58
SK2 ->	CTG GAG CAC TAT TCC TAC	18	54
RL22B ->	ACG TCA ACT ACC ACG AGC C	19	60
SK14 ->	GAG CTA CCG GAT GAT GCA	18	56
SK15 ->	GCC TTA CCA TTC TTC CCA	18	54
SK13 <-	TGA CTT CCA CAA GAT TGG	18	52
SK16 ->	AAT CCC TGG GAT TCT ACC	18	54
SK1 <-	GGA AGT TTA GAA TCT CCC	18	52

SK9 <-	ATG TAA GGC CGT GGT TGG	18	56
CplSK9 ->	GGA ACC ACG GCC TTA CAT GG	20	64
SK8 <-	TTC CTG GCA GCT TGG CAT	18	56
CplSK8 ->	GTA TGC CAA GCT GCC AGG	18	58
EGF2A ->	GTC AGA GCT ATT ACA CAG CC	20	60
EGF2D <-	GCT GTG TAA TAG CTC TGA CTC C	22	66
EGF2F <-	TGC ACA CGC CAT GGT CAC ATG	21	66
EGF2B <-	GAA GGA AGT GCA GCT TCT GG	20	62
EGF2C ->	CCA GAA GCT GCA CTT CCT TC	20	62
NEGF2C <-	GAC TCC ACA GCC TTG CTC	18	58
NEGF2D ->	TGT GGA GTC GTG TCT TCT GG	20	62
NEGF2A <-	CTG GAC AAA GTC CAC CCA GG	20	64
NEGF2B <-	GTC AGG CTT GTT GCA TGC	18	56
CplN2B ->	GCA TGC AAC AAG CCT GAC AG	20	62
DOM23E <-	AGA AGT ACA TCT CTG CCA GC	20	60
DOM23AB??	GGG TAA TCG AAA GCT GGC	18	56
DOM23C ->	AGG ACT ATG ACC AGT GGG	18	56
DOM23D <-	CCC ACT GGT CAT AGT CCT C	19	60
DOM23AB??	TTG TCT ACC TGG AGC TCC	18	56
IRO1 ->	GAA ACC TGG ATA TGT GCT GC	20	60
IRO12 <-	TTC CTT CAA CAG AAA CCA CG	20	58
CplIRO12 ->	GTC GTG GTT TCT GTT GAA GG	20	60
EGF3A ->	CAG CTC TCA GAA GAA TGT GC	20	60
EGF3C <-	GCA CAT TCT TCT GAG AGC	18	54
EGF3D <-	TCC ATG GCC ACT GCA GTA AC	20	62
EGF3B <-	TGT CGA ACA TCT CAC TGT GG	20	60
LikeOrl ->	AAG CCA GGA CAG TCC CAC TG	20	64
42C ->	TTG GAA GTA AAA CAT CAG GG	20	56
42B ->	GGA TTA CGT GCA TCA AAC CAC (A et CC)	21	62
42A <-	GTG GTT TGA TGC ACG TAA TCC (GG et T)	21	62
DOM34A ->	AAG CAA AGA CAC CTG CCA CG (A)	20	62
DOM34C <-	CTG TGG CAG GTG TCT TTG CTT C	22	68
DOM34B <-	GCA AGT CTA TGG AGC CAT CC	20	62
7.7Gap2 ->	CCA AGT TGA TAT CGA CTG CC	20	60
IRO5 ->	GGC ATA CAG CTC CAG TAC	18	56
CplIRO5 <-	GTA CTG GAG CTG TAT GCC	18	56
EGF4A ->	TGT TGG AGC AGA TTC CTG GG	20	62

EGF4C ->	CCT GTT GTT CCT CTT CCC TC	20	62
EGF4E ->	GGG AAC TTA CAT CCT GAC C	19	58
7.7Gap1 <-	AGG TCA GGA TGT AAG TTC CC	20	60
N55A ->	CCA GAG ATC TAG ATT GCA CC	20	60
N55B <-	GGT GCA ATC TAG ATC TCT GG	20	60
D12-55B ->	GGC ACC TGA TGG ATG AAT TC	20	60
D12-55C <-	GAA TTC ATC CAT CAG GTG CC	20	60
D12-55A <-	TGT ACG GTT GCC AGA GTC TG	20	62
552A <-	GTC ATC AAT GAT CCA GAT TTC	21	58
552B ->	GAA ATC TGG ATC ATT GAT GAC	21	58
P1E2B ->	ATA TCG GAC TTT ACT GCC CG	20	60
P1E2A <-	GTG TTC TCG TTC ACA CTT AGG	21	62
P1E2C ->	CCT AAG TGT GAA CGA GAA CAC	21	62
D12-38A ->	GAT AGT TCT TCT GCT GAT CCG G	22	64
D12-38B <-	AGC ATA AGG AGC TGA CGA GG	20	62
3ReA1 <-	GCT CGG GTG ATG CTC AGT	18	58
N38A <-	GTA CCA ACG GAA ACG CAC AG	20	62
N38B ->	CTG TGC GTT TCC GTT GGT AC	20	62
53.17 <-	CAG CAG GAT AAA ATC CCT	18	52
Cpl53.17 ->	AGG GAT TTT ATC CTG CTG	18	56
VDEB3 ->	? AAG AAT TCC TGA TTT TCT CAA AGA CGA C	28	
CplVDEB3<-	AGT CGT CTT TGA GAA AAT CAG	21	58
FAKE4B	CGA TTC TTA CTG ATG AGC GG	20	60
311A	GAA GCC GTC TCG TAA GTG	18	56
FAKE4A	CTT GCA TGT GAT AAA TCC AGG	21	58
311H	TGC AGT TCT TCA TGA GAC TGG	21	62
7.8Gap2	CCT CTC CTG GAG TCT TCT TC	20	62
311B	GCA ATG TAC CTG CCC ACA	18	56
311C	TGG AAA TGC CCC TGA AAG	18	54
311D	GCA TCT TGG TGC CTC CTG	18	58
311G	CAG AAA GTG GCT GCT TCA CC	20	62
IRO8	ACG TGG TCA CGA CAG ACA TCG	21	66
311E	TGA ACT GGA GTA CTC GGT GG	20	62
Cpl311E	TCC ACC GAG TAC TCC AGT TC	20	62
IRO10	CTA CAC TCA ACA TTG GTA GGC	21	62
EGF6A	TTG ACA AGC AGC AGA CCT GG	20	62
7.8Gap1	GGC AAC CAT CCC CAA TAT AG	20	60

EGF6D	GAC TGT GAG CGG TGG GAA GC	20	66
PTE6.1	CCT GGC TCT CCA TTT CAG TG	20	62
PTE6.2	CAC TGA AAT GGA GAG CCA GG	20	62
Like22D	CCT CCA TTG ACA GAG TAC TC	20	60
Like22A	AGT ACT CTG TCA ATG GAG GC	20	60
Like22B	TTA GCA TCA GGA GGG AGA AG	20	60
53.14	ACT GGG GCG CTG CTA AAG	18	58
43.2	CAG ATG GTG TCA TGC TCT	18	54
Cpl43.2	ACA GAG CAT GAC ACC ATC TGG	21	64
PA7	CTA CTG ACT TTG GCG TGA GC	20	62
53.13	GGA AGA ACA CAG ACG GTT	18	54
Cpl53.13	AAC CGT CTG TGT TCT TCC	18	54
EGF7C	AAG TAC TCA GAT GTG CAG	18	52
EGF7E	TCA GGC TGT GAG TTA AGT AGC	21	62
EGF7D	TTT GAC AGT GAG GAG ATC	18	52
53.12	TTC TCA CTG CCG ATA CGT	18	54
Cpl53.12	GAC GTA TCG GCA GTG AGA AC	20	62
43.4	ATG ACA TCT TGC CAT CGT	18	52
53.9	GTG AGG CAC GAC TAC ATC	18	56
Cpl59.9	GGA TGT AGT CGT GCC TCA CAG	20	66
IRO6	TCA GAA TGT TGT CCA GTG	18	52
VDEB8	AAT CTA GAA GCA GAA ATC ATC CAA GCC	27	
DOM78	TCC TGC TGT CCT TAC TGC	18	56
CplDOM78	ATG CAG TAA GGA CAG CAG G	19	58
IRO4	GGC TGT ATA ATG AGC TCT	18	52
CplIRO4	AGA GCT CAT TAT ACA GCC AG	20	58
PTE8.1	ATT GTG GTG GGT TGT GAA GC	20	60
PTE8.2	CCT TGC ATC CTT GGT GTA C	19	58
53.6	CCC GTT CCA GTT CCA TGA AG	20	62
Cpl53.6	TCA TGG AAC TGG AAC GGG	18	56
Orl5	AGA AGG GAG AAG AAA CCG AG	20	60
CplOrl5	CTC GGT TTC TTC TCC CTT CT	20	60
46C	CTG GGC TCC CAA TTT GCA AGA C	22	68
Orl3	AGC TTG TGT GAA GTC CTT CG	20	60
CplOrl3	CGA AGG ACT TCA CAC AAG CT	20	60
46B	AGC TTG CGT GAA GTC CTT CG	20	62
53.7	CAT TGT GGC GTG GCT GCC	18	60

53.18	GGG CTT TGG ACC ATG TGG	18	58
CD2A	ATC TGC TAC TTA GCG TCC TGC	21	64
CD2B	GCA GGA CGC TAA GTA GCA GAT	21	64
CD3	GTA AGG CAA CCC AGA TCA AGC ATA AGA CGT	30	/
CD1	GTA AGG CAA CCC AGA TCA AG	20	60
EXON6PB	AGA GTA AGG T	10	28
CpIEXON6PB	ACC TTA CTC T	10	28
PLUS6B	TGC GAG TGC TTA CTA GGA CG	20	62
MOINS6B	GTT TGC GAG TGA GGA CGA C	19	60
53.11	CGA AGG TCG CTT AGG CGA	18	58
CpI53.11	TCG CCT AAG CGA CCT TCG	18	58
VDEB7	AAT CTA GAT CAT GGG TAT CGC CTA AG	26	74
53.5	CTT TCT GTT CGC CAA GTC	18	54
53.1	GTT TTA GAC AAG GTA ATG GG	20	56
P1-E46A	ATG TCT GCC TCG CAA ATT GG	20	60