

CENTRE DE NEUROBIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE  
LABORATOIRE DU PROFESSEUR T.GRISAR  
UNIVERSITÉ DE LIÈGE, 17 PLACE DELCOUR, B-4020, BELGIQUE



## MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

*Caractérisation d'EFHC1, une nouvelle protéine mutée dans l'épilepsie  
myoclonique juvénile:*

*Etude de l'expression de l'ARNm et essais d'établissement de lignées cellulaires  
stables n'exprimant pas la protéine.*

Delgaudine Marie  
2<sup>ème</sup> licence sciences biomédicales  
année 2002-2003



*Seul, on ne peut rien. Je désire remercier tout particulièrement:*

*Le professeur Thierry Grisar, pour m'avoir accueilli au sein du service de Biochimie et Neurophysiologie Humaine, ainsi que pour les précieux conseils qu'il m'a prodigués.*

*Le docteur Bernard Lakaye, pour ses explications avisées, sa patience, et le temps qu'il m'a consacré tout au long de ce projet.*

*Le docteur Myriam Verlaet qui m'a suivie et conseillée, aussi bien dans la pratique qu'en théorie, au cours de ce mémoire.*

*Le docteur Grazyna Chanas pour m'avoir enseigné les bases de l'immunocytochimie.*

*Monsieur Bernard Coumans de m'avoir initiée à la technique de la cytométrie de flux ainsi qu' Antoine Adamantidis pour sa gentillesse et sa disponibilité. Merci également à Danièle, Agnès et Arlette.*

*Et enfin, merci à ma maman d'être toujours là pour moi et à chouchou pour ses encouragements et son écoute.*

*Merci pour votre générosité...*

# **Table des matières:**

## **A. Introduction**

### **1. L'épilepsie myoclonique juvénile**

- 1.1. Présentation clinique
  - 1.1.1. La crise myoclonique
  - 1.1.2. Les absences
  - 1.1.3. La crise tonico-clonique
- 1.2. Phénotypes
- 1.3. Electroencéphalogramme
- 1.4. Traitement
- 1.5. Pronostic
- 1.6. Génétique
- 1.7. Hypothèses fonctionnelles: la protéine EFHC1 et l'excitabilité neuronale
  - 1.7.1. Domaines EF-hand
  - 1.7.2. Sites de myristoylation
  - 1.7.3. Le calcium: généralités

### **2. La technologie des siRNA**

- 2.1. Définition et origine
- 2.2. Mécanisme d'action
  - 2.2.1. ARNdb versus siRNA
- 2.3. Application en recherche
- 2.4. Application médicale

### **3. Objectifs du mémoire**

## **B. Matériel et méthodes**

### **1. Matériel**

- 1.1. Oligonucléotides
- 1.2. Duplex d'ARN
- 1.3. Plasmides
  - 1.3.1. Plasmide pH1
  - 1.3.2. Plasmide pRed
  - 1.3.3. Plasmide pEGFP-EFHC1
- 1.4. Standards de taille moléculaire
  - 1.4.1. «Standards ADN»
  - 1.4.2. «Standard protéines»
- 1.5. Anticorps
  - 1.5.1. Anticorps dirigés contre la protéine EFHC1
  - 1.5.2. Anticorps dirigés contre la protéine GFP
  - 1.5.3. Anticorps secondaires

- 1.6.Lignées cellulaires
  - 1.6.1.Lignée cellulaire HEK-239
  - 1.6.2.Lignée cellulaire Neuro2A
- 1.7.Souche bactérienne
- 1.8.Espèces murines
  - 1.8.1.Souris NMRI
  - 1.8.2.Souris C57BL/6

## **2.Méthodes**

- 2.1.Culture cellulaire
- 2.2.Transfection de lignées cellulaires
  - 2.2.1.Transfection par co-précipitation au phosphate de calcium
  - 2.2.2.Transfection au Fugen
- 2.3.Sélection des transfectants stables
- 2.4.Immunocytochimie
- 2.5.Cytomètre à flux
  - 2.5.1.Définition
  - 2.5.2.Fonctionnement
- 2.6.Prélèvement d'organes
- 2.7.Manipulation des protéines
  - 2.7.1.Extraction différentielle des protéines
  - 2.7.2.Dosage des protéines
  - 2.7.3.Western blot
    - Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE)
    - Electro-transfert semi-sec
    - Immunodétection
- 2.8.Manipulation d'acides nucléiques
  - 2.8.1.Préparation de cellules compétentes
  - 2.8.2.Transformation des bactéries compétentes
  - 2.8.3.Extraction d'ADN plasmidien
    - Mini-préparation de plasmides
    - Midi-préparation de plasmides
  - 2.8.4.Digestion d'ADN par des enzymes de restriction
  - 2.8.5.Purification d'ADN
    - Purification d'ADN en solution
    - Extraction et purification d'ADN d'un gel d'agarose
  - 2.8.6.Hybridation des oligonucléotides en solution
  - 2.8.7.Ligation d'ADN
  - 2.8.8.Extraction d'ARN total
  - 2.8.9.Traitement à la DNase
  - 2.8.10.Transcription inverse
  - 2.8.11.Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)
  - 2.8.12.PCR quantitative en temps réel

## **C. Résultats**

### **1. Mise en évidence de l'ARNm de EFHC1 dans différentes lignées cellulaires:**

#### **2. PCR quantitative en temps réel**

- 2.1. Interprétation des données
- 2.2. Choix du standard interne
- 2.3. Quantification de l'ARNm
- 2.4. Distribution tissulaire de l'ARNm de EFHC1 chez la souris
- 2.5. Evolution de l'expression de l'ARNm au cours du développement
- 2.6. Quantification de l'ARNM de EFHC1 dans les lignées cellulaires HEK-293 et Neuro2A

#### **3. siRNA**

- 3.1. Comparaison de l'efficacité du plasmide pRed et des duplex dirigés contre EGFP
- 3.2. Construction d'un plasmide codant des siRNA dirigés contre EFHC1
  - 3.2.1. Conception des siRNA
  - 3.2.2. Constructions
- 3.3. Inhibition de l'ARNm de EFHC1 par l'intermédiaire de duplex d'ARN
  - 3.3.1. Western Blot
  - 3.3.2. Immunocytochimie
  - 3.3.3. Transfection des Neuro2A par les duplex d'ARN dirigés contre EFHC1

#### **4. Etablissement de lignées cellulaires exprimant une forme tronquée de la protéine EFHC1**

- 4.1. Construction
- 4.2. Transfection stable
  - 4.2.1. Sélection des clones positifs au FACS
  - 4.2.2. Vérification de l'intégration de la construction

## **D. Discussion et conclusions**

## **E. Bibliographie**

## A.Introduction:

Les épilepsies constituent, en importance, le deuxième groupe de maladies neurologiques. Elles affectent quelque 40 à 100 millions de personnes de par le monde. Leur incidence est plus élevée chez les nouveaux-nés de moins d'un an et chez les personnes de plus de 75 ans (fig.1). Le caractère spectaculaire de certaines crises, et en particulier des crises généralisées jadis appelées «Grand Mal», a longtemps contribué au rejet social des patients qui en étaient atteints, et curieusement, en parallèle, à un certain obscurantisme de la recherche fondamentale en la matière.

Ces affections se caractérisent par des manifestations cliniques (crises épileptiques) d'apparition brutale, de courte durée et se terminant de façon plus ou moins abrupte. La sémiologie et la présentation clinique sont très polymorphes.

Elles sont la conséquence de décharges neuronales hypersynchrones paroxystiques affectant une région plus ou moins étendue du cortex cérébral. L'étiologie de ces anomalies est également variable: traumatismes crâniens, tumeurs cérébrales, accidents vasculaires, malformations congénitales, séquelles hypoxiques,... Toutefois, pour nombre de syndromes épileptiques, aucune lésion ne peut être mise en évidence, et un facteur familial, génétique, peut être incriminé: il s'agit du groupe des *épilepsies généralisées idiopathiques*.

Le caractère héréditaire de l'une de celle ci, l'*épilepsie myoclonique juvénile* (ou syndrome de Herpin-Janz), a permis de réaliser des études génétiques de liaison et de mettre en évidence des loci génétiques co-ségrégés avec le phénotype caractéristique de cette maladie. Le laboratoire collabore avec un des groupes de recherche (Prof.A.V.Delgado-Escueta, LA-CA) qui vient d'isoler un gène muté dans cette affection: le gène EFHC1.

Notre travail a consisté à la mise au point de méthodes permettant la caractérisation partielle de ce même gène et de cette nouvelle protéine et, en particulier, à des essais de mise en place des modèles cellulaires n'exprimant pas la protéine, à des fins d'études fonctionnelles ultérieures.

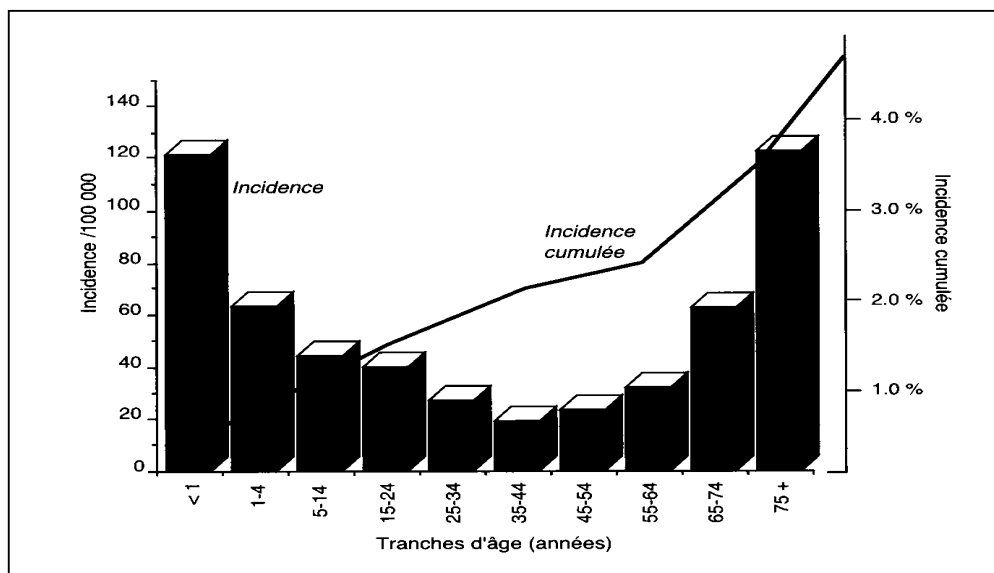


Figure 1: Incidence et incidence cumulée des syndromes épileptiques en fonction de l'âge[2].

## **1.L'épilepsie myoclonique juvénile:**

### **1.1.Présentation clinique:**

Les crises d'épilepsie sont des phénomènes cliniques résultant d'excitations anormales et excessives des neurones des hémisphères cérébraux. Au point de vue physiologique, les décharges neuronales observées sont occasionnelles, soudaines, excessives, rapides et localisées.

Des modifications de la conscience, du comportement et des émotions font partie du tableau clinique, de même qu'une altération de la fonction motrice, de façon paroxystique, intermittente et stéréotypée.

Une crise épileptique cause toujours une désorganisation et un dérangement de nombreuses fonctions cérébrales, parfois visibles à l'examen clinique, mais pouvant être non reconnus {1}.

L'épilepsie myoclonique juvénile (JME) représente 4 à 11% des syndromes épileptiques. Elle constitue la forme d'épilepsie la plus commune durant l'adolescence et cependant, reste fréquemment non diagnostiquée. Elle débute entre 8 et 20 ans chez des enfants normaux. Dans 75% des cas, la première manifestation a lieu entre 12 et 18 ans. Ce trouble neurologique atteint autant d'hommes que de femmes (sex-ratio:1/1). D'un point de vue clinique, la JME se traduit par des crises myocloniques, des absences et des crises généralisées {1,3}.

#### **1.1.1.La crise myoclonique:**

La crise myoclonique constitue le symptôme initial dans 54% des cas. Elle se caractérise par des secousses musculaires bilatérales mais pas toujours symétriques, en salves rapides et d'amplitudes variables. Elles touchent le plus souvent les muscles extenseurs des membres supérieurs et des épaules; beaucoup plus rarement les muscles de la face et des jambes. Leur durée est de quelques minutes. Le plus souvent la conscience est conservée. Les crises sont rythmées par le cycle circadien (beaucoup plus fréquentes au réveil, ce qui incrimine l'état de vigilance) et sont précipitées par le manque de sommeil, l'alcool, la fermeture des yeux et les stimulations lumineuses intermittentes.

L'épilepsie myoclonique juvénile est le syndrome épileptique le plus fréquemment associé à la photosensibilité. En effet, 30% des patients souffrent de photosensibilité, en parallèle aux crises bilatérales myocloniques.

La photosensibilité est liée à l'âge. Elle se développe entre 10 et 15 ans et se résout vers 20 ans. Ce symptôme est plus fréquent chez les femmes.

#### **1.1.2.Les absences:**

Les absences sont présentes dans 27 à 30% des cas de JME; toutefois, leur fréquence est faible (moins d'une fois par semaine).

La majorité des crises peut résulter en chutes mais ne semble pas être accompagnée de pertes de conscience.

Une absence pure est une brusque cessation des activités conscientes, sans mouvements convulsifs ou pertes de contrôle des attitudes, mais peut s'accompagner de manifestations

motrices mineures: clignotements des paupières, petits mouvements de mastication, légère agitation des mains.

Les crises peuvent être si brèves qu'elles passent alors inaperçues. Elles ne durent que quelques secondes à quelques minutes. A la fin de l'absence, le malade reprend très rapidement conscience de ce qui l'entoure, sans passer par un stade de confusion.

### **1.1.3.La crise tonique clonique («Grand mal»):**

Au début de l'évolution, l'épilepsie myoclonique juvénile se traduit par des crises myocloniques de réveil qui, plus tard, peuvent être suivies par d'autres, généralisées toniques cloniques (dans 84% des cas). Celles-ci représentent le symptôme initial dans 35% des cas. Certaines crises toniques cloniques peuvent être généralisées d'emblée; d'autres le sont à la suite d'une crise partielle ou myoclonique .

Les crises tonico-cloniques débutent par une brusque perte de conscience, des contractions toniques des muscles, une perte de contrôle des attitudes, tandis que le malade pousse un cri d'expiration forcée résultant de la contraction des muscles respiratoires. Il peut être cyanosé du fait de cette gêne respiratoire.

Le malade tombe au sol en opisthotonos et reste rigide pendant plusieurs secondes: il peut se blesser pendant la chute.

Des contractions rythmées, en série, ne tardent pas à apparaître au niveau des quatre membres.

La durée de cette phase clonique varie, elle prend fin quand la contraction musculaire cesse.

Le malade reste inconscient quelques minutes au plus; il peut être désorienté, voire agressif.

Des morsures de langue, des pertes d'urine et de matières fécales sont fréquentes pendant les crises.

Amnésie, céphalée et somnolence sont des séquelles courantes et le retour à l'état normal peut prendre plusieurs jours.

### **1.2.Phénotypes:**

On a décrit quatre présentations phénotypiques possibles dans le syndrome JME, dans lesquelles ces différentes manifestations (crise myoclonique, tonico-clonique, photosensibilité et absence) sont présentes, mais surviennent à des âges différents et selon une chronologie différente. {4}

1. Le premier syndrome compte pour 45% des cas de JME et commence fréquemment au réveil pendant l'adolescence et, le plus souvent, entre 13 et 15 ans. Deux ans plus tard apparaissent les convulsions tonico-cloniques et de rares absences peuvent être observées durant cette période.
2. Le deuxième syndrome représente 27% des JME. Il commence par des absences à la fin de l'enfance et est suivi de crises myocloniques et tonico-cloniques lors de l'adolescence.
3. Le troisième syndrome (23% des JME) commence à l'adolescence par des absences, des crises myocloniques et toniques-cloniques.
4. Le quatrième (5% des JME) débute par une crise myoclonique et tonico-clonique pendant l'adolescence et des absences suivent après 18 ans.

D'autres phénotypes sont évoqués, mais sans certitude, quant à leur classification en tant qu'épilepsie myoclonique juvénile (exemples: jamais d'absences, association à un retard mental...).



### 1.3. Electroencéphalogramme:

L'électroencéphalographie est à l'épilepsie ce que l'anatomopathologie est au cancer. La démonstration de la nature épileptique d'une manifestation critique repose sur la démonstration d'anomalies EEG critiques ou au moins intercritiques (fig. 2).

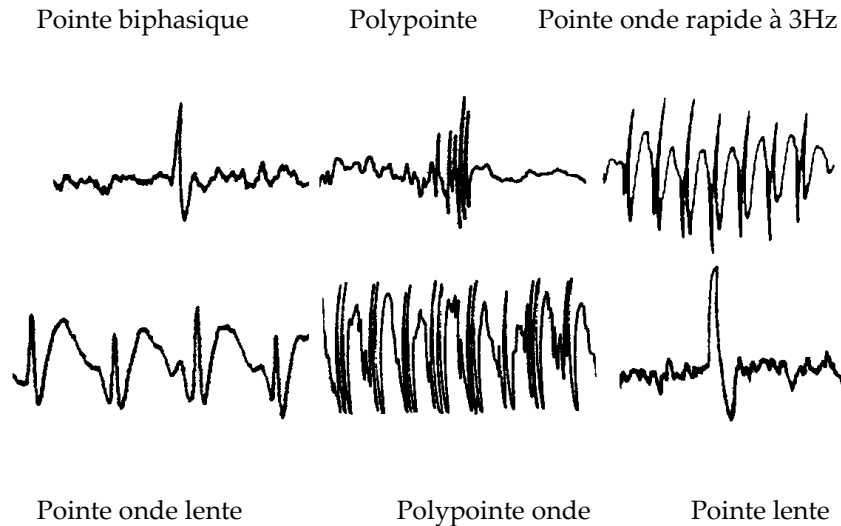


Figure 2: Exemples d'activités épileptiques («paroxystiques»){2}

Les patients atteints de JME possèdent un tracé intercritique qui peut être normal ou présente des bouffées de polypointes, polypointes ondes, généralisées et asymptomatiques (fig.3A). Lors d'une crise myoclonique (fig.3B), l'EEG montre des bouffées bilatérales et synchrones de pointes ondes ou poly-pointes-ondes de 3,5 Hz, ou de poly-pointes-ondes de très hautes fréquences. Le nombre de pics varie entre 5 et 20 et est corrélé, non pas avec la durée, mais avec l'intensité des crises cliniques. Il coïncide avec le début de la crise et il s'ensuit des ondes lentes. Les décharges sur l'EEG sont souvent plus longues que la crise. Il existe différentes méthodes de provocation permettant d'enregistrer l'activité électrique cérébrale pathologique: 1) réaliser un EEG de nuit, 2) provoquer une hyperventilation due à la privation de sommeil, 3) parfois des stimulations lumineuses, peuvent favoriser l'apparition des crises.

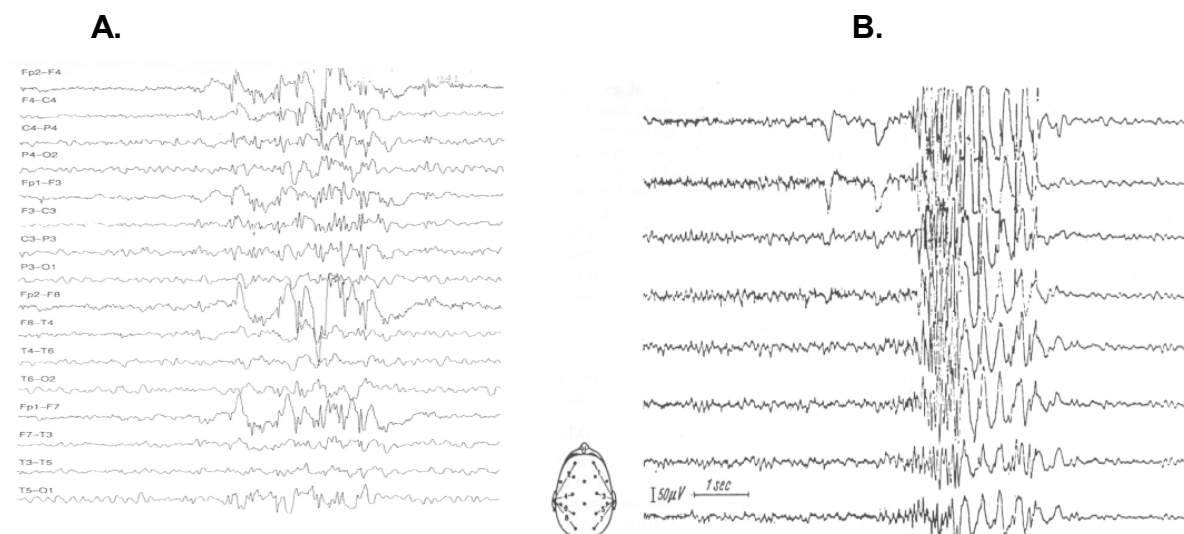


Figure 3: Tracé EEG d'un patient atteint de JME A. en intercritique {5} B. lors d'une crise myoclonique {3}.

Les EEG des malades en cours de crise tonico-clonique montrent une activité rapide (10 Hz ou plus) de faible voltage. Par la suite, de grandes ondes plus lentes et plus amples apparaissent dans les deux hémisphères.

Pendant la phase clonique, on constate des bouffées d'ondes pointues associées aux contractions musculaires rythmées et des ondes lentes au moment des pauses.

L'activité musculaire excessive durant la crise est souvent à l'origine d'artefacts.

Au cours d'une absence, l'EEG est plus hétérogène (fig.4) et comprend des décharges de pointes-ondes, de 2 à 4 Hz au cours de l'absence elle-même. Le tracé de fond est mal caractérisé {1,2,3}.

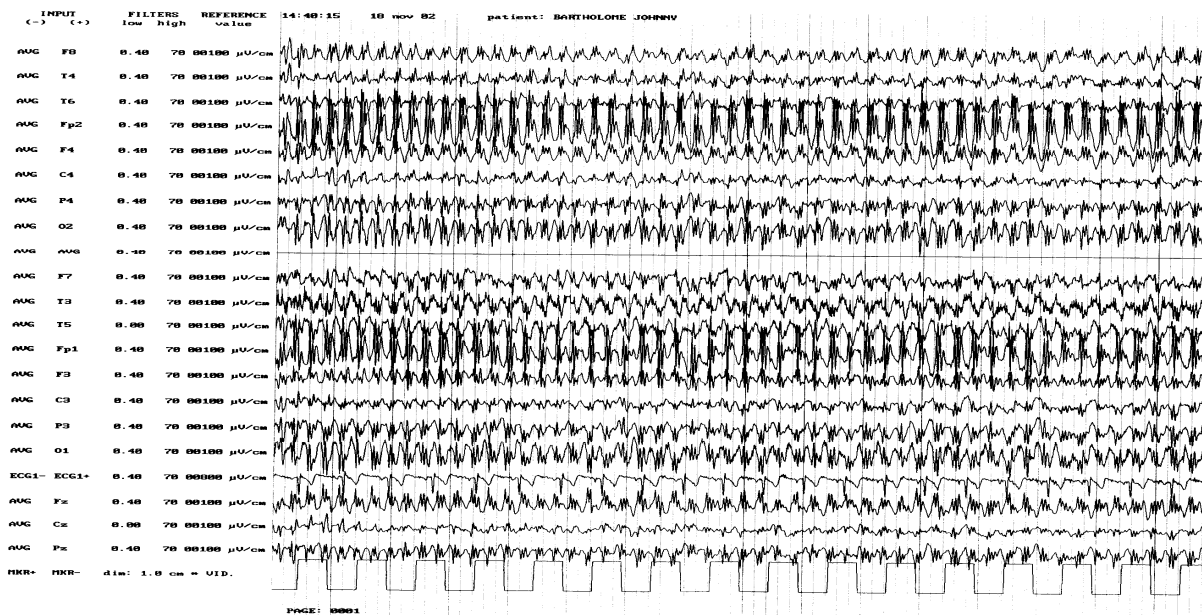


Figure 4: Exemple d'EEG d'une absence enregistrée dans le cas d'une JME {2}.

#### 1.4.Traitement:

Un traitement médicamenteux immédiat est impossible, vu la courte durée des accès de convulsion, sauf pour les crises qui se caractérisent par une succession d'accès tonico-cloniques. Les antiépileptiques servent surtout dans la prévention des crises et seront utilisés dans ce but de façon chronique. Tous les antiépileptiques exercent des effets indésirables, soit dose dépendante, liés au mécanisme d'action et touchant le système nerveux central (sudation, diminution de la concentration et de la motivation...), soit idiosyncrasiques, mais parfois graves (réaction cutanée, hépatique, hématologique...).

Tous les antiépileptiques sont toxiques en usage chronique et ce, d'autant plus que la posologie est élevée. Celle-ci doit être adaptée individuellement, en favorisant la dose la plus faible possible.

D'une façon très générale, on peut conclure que les interventions thérapeutiques ont pour but de stabiliser le potentiel de membrane des cellules nerveuses et de diminuer leur excitabilité. Les principaux mécanismes anticonvulsants impliquent généralement:

1. une augmentation de l'inhibition médiée par GABA: benzodiazépine, phénobarbital, valproate...
2. une diminution du flux de Na<sup>+</sup>: phénytoïne, valproate...
3. une inhibition du courant calcique à l'origine des décharges électriques.

Lorsque les crises ne sont pas fréquentes et déclenchées par une privation de sommeil, l'éducation du patient à d'autres habitudes de sommeil peut améliorer son état. Pour les patients photosensibles, il est utile de leur expliquer quels sont les stimuli à éviter.

Le traitement par l'acide valproïque en monothérapie ou en association avec le clonazepam conduit à un contrôle de 80% des patients. De plus, le traitement par un seul médicament réduit le risque d'effets indésirables et d'interactions médicamenteuses. Ce sont les médicaments de 1<sup>ère</sup> ligne dans le traitement de l'épilepsie, car ils occasionnent peu d'effets indésirables sévères et semblent induire moins d'effets négatifs sur la fonction cognitive et sur le comportement.

L'arrêt de la thérapie est suivi d'une rechute dans 90% des cas (le plus haut taux de rechute des épilepsies). L'interruption brusque ou même une réduction trop rapide peuvent précipiter une crise convulsive {20}.

### 1.5.Pronostic:

Le pronostic est bon avec une diminution de la propension des crises avec l'âge, de même que la photosensibilité, qui se résout le plus fréquemment à la fin de la seconde décennie. La réponse au traitement est moins bonne lorsque des absences sont associées à l'épilepsie myoclonique juvénile.

Dans les syndromes épileptiques en général, le taux de mortalité est élevé. Il y a peu d'études directement réalisées sur l'enfant, c'est pourquoi, les informations sont dérivées des adultes. Dans 25% des cas, la mort survient pendant la crise: suffocation, brûlure, noyade... Quinze pour-cent des décès sont inexplicables mais peuvent éventuellement être liés au statut convulsif de l'épileptique (peuvent être dus à un arrêt cardiaque, cérébral, ou pulmonaire...).

Il n'est pas rare que les enfants souffrant d'épilepsie et d'absence présentent des difficultés scolaires {1,5}.

### 1.6.Génétique:

Chez les enfants et les adolescents, on considère que 70 à 75% des épilepsies sont idiopathiques. Dans 30 à 35% de ces cas, on peut suspecter une base génétique. Chez 25% des patients, une histoire familiale d'épilepsie est évidente.

A ce jour, la majorité des gènes identifiés comme responsables d'une IGE (épilepsie idiopathique généralisée) proviennent d'études menées sur un nombre extrêmement restreint de familles à large pédigrée. Dans ces cas, les mutations répertoriées affectent majoritairement des canaux ioniques (canalopathies) ou des récepteurs aux neurotransmetteurs. Ces mutations ne peuvent cependant pas être utilisées, à ce stade, en tant que marqueurs diagnostiques. {5, 6}

Concernant la JME, les études de liaison démontrent que ce syndrome est génétiquement hétérogène avec un mode de transmission complexe. Différents loci présentant une association à cette pathologie ont été identifiés suite à des études épidémiologiques (tableau 1). Il s'agit de:

- **1p:** associé à des absences chez l'enfant et l'adolescent évoluant en JME {4};
- **3q26:** trois mutations du gène codant un canal chlore sont associées aux quatre sous-types d'IGE: épilepsie et absence juvéniles ou pendant l'adolescence (CAE et JAE), JME, épilepsie avec crise «grand mal» au réveil (EGMA) {7};
- **5q34:** l'association de ce locus au syndrome JME a été observée dans une famille canadienne et la transmission serait autosomique dominante. Le gène muté code la sous unité catalytique  $\alpha 1$  du récepteur  $\gamma$  aminobutyrique de sous-type A (GABA A) {8};

- **15q14:** Elmslae et ses collaborateurs ont apporté des preuves de liaison entre le phénotype JME et le gène situé sur ce locus et codant la sous unité  $\alpha 7$  du récepteur neuronal à l'acétylcholine nicotinique (nAChR). Le locus 15q14 a pu être étudié grâce à la collaboration de 34 familles de Grande Bretagne et de Suisse. Le mode de transmission reste cependant incertain (autosomique dominant ou récessif) {9,10};
- **6p11-p21.2:** fin des années 80, début des années 90, plusieurs chercheurs avaient mis en évidence l'existence d'un locus de susceptibilité dénommé EJM1 sur le chromosome 6p. Toutefois, des études plus précises divergeaient sur la localisation du gène responsable: à l'intérieur ou en dehors du locus HLA.

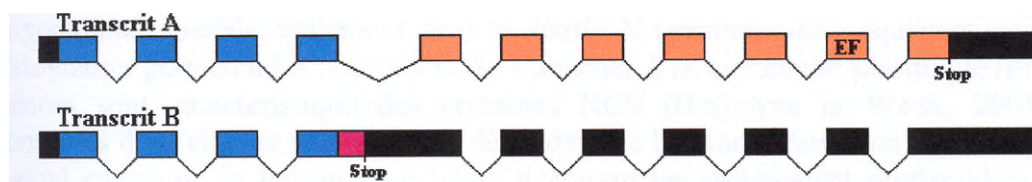
Les études menées par Greenberg et Durner {11}, ont localisé un gène dans le complexe HLA. Un article récent a mis en évidence l'existence de deux polymorphismes nucléotidiques dans le promoteur du gène BRD2 codant une sérine thréonine kinase {12}. Quoique leur effet exact ne soit pas encore élucidé, ces mutations affectent probablement le niveau d'expression de cette protéine qui, chez la souris, phosphoryle le facteur de transcription E2F et participe ainsi à la régulation de l'expression de différents gènes impliqués notamment dans le cycle cellulaire. Cette découverte suggère que des anomalies du développement neuronal pourraient être la cause d'épilepsie.

D'autre part, les recherches conduites par Delgado-Escueta sur d'autres familles ont localisé le gène en dehors de la région HLA, dans le locus 6p11-12.

Plus précisément, le locus **6p12.1** semble être impliqué dans l'étiologie de la JME. Il correspond au gène EFHC1, s'étend sur ~63Kb et contient 11 exons. Il code une protéine de 640 acides aminés. La comparaison de sa séquence aux bases de données a permis d'identifier différents domaines conservés:

- domaine EF-hand qui suggère un rôle de senseur, de liaison et de modulation du calcium neuronal;
- répétition (3 fois) à l'extrémité amino-terminal de la protéine d'un domaine conservé de rôle inconnu dénommé DM 10, présent par exemple, dans les nucléosides diphosphates kinases;
- des sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase A;
- des sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase C;
- des sites potentiels de phosphorylation par la protéine CK2 (caséine kinase2);
- des sites potentiels de glycosylation;
- des sites potentiels de myristoylation.

Le transcrit de EFHC1 (fig.5) subit un épissage alternatif dans l'exon, 4 qui aboutit à la production d'une protéine EFHC1 de 278 acides aminés, protéine tronquée pour sa partie c-terminale, éliminant le domaine EF-hand ainsi que deux des trois domaines DM10 {14}.



**Figure 5:** Représentation schématique des deux transcrits du gène EFHC1;

En noir: les séquences non codantes; en bleu, les séquences communes aux transcrits A et B; en orange et en rose, les parties codant pour les séquences spécifiques des formes A et B respectivement; EF: domaine EF-hand.

Tableau 1: Résumé des loci associés à la JME

Loci	Gène	Protéine	Référence
1p	non caractérisé	non caractérisé	{4}
3q26	CLCN-2	Canal chlore	{7}
5q34	GABRA 1	Sous-unité $\alpha$ 1 du récepteur de GABA A	{8}
15q14	CHRNA 7	Sous-unité $\alpha$ 7 du récepteur neuronal à nAch	{9, 10}
6p21.2 6p12.1	1)BRD2 2)EFHC1	1) Sérine thréonine kinase Ring3 2) Protéine de fonction inconnue	{12, 14}

Quarante-deux familles de Los Angeles, du Brésil et du Mexique ont permis d'approfondir les connaissances concernant le locus 6p12.1 et le gène EFHC1.

Chez 33 familles mexicaines présentant un phénotype de JME, seize mutations de types isosémantiques, faux sens ou introniques, ont été mises en évidence (fig.6.). Cinq des mutations faux-sens sont observées chez 21 individus atteints et issus de 6 familles différentes; aucune d'entre elles n'a jamais été identifiée chez des individus sains. Parmi celles-ci, la mutation la plus fréquemment rencontrée est une substitution dans l'exon 4 de la phénylalanine 229 par une leucine. De plus, 4 de ces 5 mutations affectent des résidus conservés au sein des protéines orthologues (souris, cochons et bœufs). Une sixième mutation faux-sens (Arg182His) est observée chez 13 membres d'une même famille (Belize) et chez 24 membres de 12 familles différentes. Cette mutation a aussi été mise en évidence chez 38% des patients japonais atteints de JME, alors qu'elle est présente chez seulement 8% de leur «contrôle». En conclusion, 19 des 33 familles présentent des variants du gène EFHC1 qui peuvent contribuer au phénotype JME. De plus, il y a très peu de chance de trouver différentes modifications au même locus dans des familles non apparentées avec la même maladie, à moins que le gène en question ne soit impliqué dans la pathologie. Il est intéressant de noter que la mutation du gène de la sous-unité  $\alpha$ 1 du récepteur GABA<sub>A</sub> et associée au syndrome JME, est de type faux-sens, comme la majorité des mutations rencontrées dans le gène de EFHC1.

La transmission des mutations de EFHC1 associées au syndrome JME est autosomique dominante avec une pénétrance totale de 78%.

Toutefois, leur héritage est encore controversé (transmission polygénique ou autosomique récessive); comme pourraient le laisser penser les quatre phénotypes de JME, certainement dus à des variations de l'expression de gènes, ou à des interactions avec d'autres gènes (majeurs ou mineurs), comme celui de la photosensibilité.

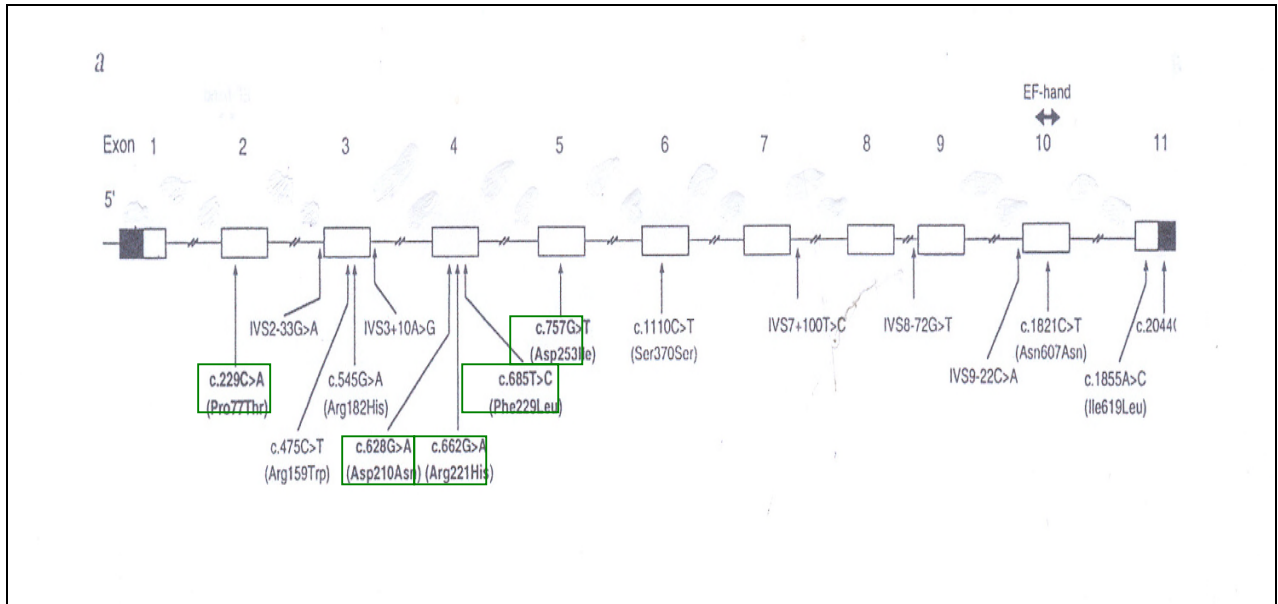


Figure 6: Mutations faux-sens, introniques et isosémantiques du gène EFHC1. Les mutations encadrées sont rencontrées uniquement chez les patients atteints d'épilepsie myoclonique juvénile.

### 1.7.Hypothèses fonctionnelles: la protéine EFHC1 et l'excitabilité neuronale

Nous venons de le souligner, la protéine EFHC1 contient un domaine EF-hand et des sites potentiels de myristoylation: c'est la raison pour laquelle nous rappelons ci-dessous les connaissances de base sur ces sujets.

#### 1.7.1.Domains EF-hand:

Ils sont formés de deux hélices  $\alpha$  perpendiculaires connectées par une boucle, constituée de douze acides aminés (fig.6).

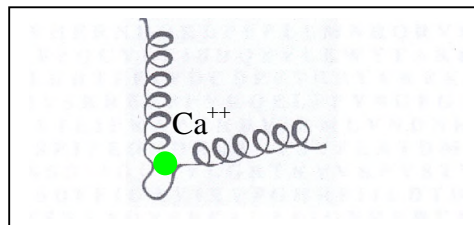
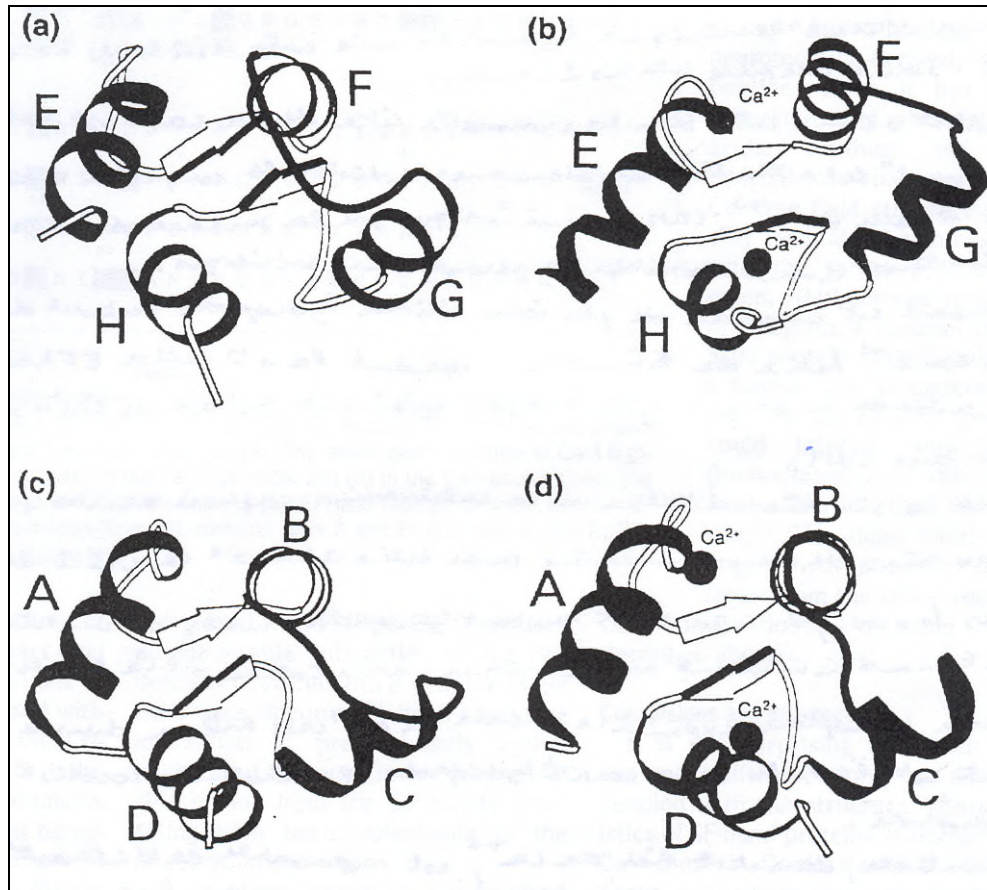


Figure 7: Motif «EF-hand» (hélice boucle hélice) {15}.

Le plus fréquemment, lorsque l'on trouve des domaines EF-hand dans un polypeptide, leur nombre varie de 2 à 8. Ceux-ci sont présents dans différentes protéines telles que les senseurs calciques neuronaux, la calmoduline, l'ATPase calcique, les canaux potassiques et calciques activés par le calcium... Les protéines possédant des domaines EF-hand montrent une bonne corrélation entre fonctions et caractéristiques structurales (fig.7). En effet, celles qui ont un rôle de senseur, c'est-à-dire intervenant dans la réception des influx stimulateurs et dans la transduction de ceux-ci nécessitant une réponse rapide, ont une affinité faible pour le calcium et subissent d'importants changements conformationnels lors de la fixation de cet ion. Les protéines dites «tampon», qui limitent les modifications trop rapides de la concentration intracellulaire en calcium, ont une affinité élevée et varient peu structurellement lorsque ce cation s'y fixe.



**Figure 8:** Changements conformationnels de protéines à domaines EF-hand suite à la liaison du calcium. Domaine carboxy-terminal de la calmoduline (a) état «fermé» en l'absence de calcium, (b) conformation «ouverte» en présence de Ca<sup>++</sup>. Domaine carboxy-terminal de la calbindin D (c) état «fermé» en l'absence de calcium, (d) conformation «fermée» liée au Ca<sup>++</sup>{15}.

Ces variations d'affinité d'une protéine à l'autre augmentent l'échelle dynamique dans laquelle le calcium peut réguler ses activités. En effet, lorsque la concentration en calcium s'élève ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ), on observe une activation des domaines EF-hand qui changent alors de conformation. Des domaines EF-hand inactifs sont également trouvés dans les senseurs calciques neuronaux (NCS) et il a été démontré que ces domaines sont essentiels à l'interaction avec diverses protéines ( ex: guanylate cyclase...).

Il existe d'autre part des protéines ne possédant qu'un seul domaine EF-hand (ex: la glycoprotéine Wnt,...), mais elles sont moins fréquentes. Le produit de EFHC1 en fait partie {15, 16, 18}.

### 1.7.2.Sites de myristoylation:

Peu de choses sont connues sur la dynamique et la localisation des protéines senseurs de calcium (à l'exception de la calmoduline et de la protéine kinase C). Toutefois, l'examen des NCS laisse entrevoir la possibilité que les groupements myristoyls déterminent la localisation de ces protéines selon différentes voies. La recoverine rétinale illustre très bien ce cas: l'exposition des groupes myristoyls, suite à la liaison du calcium, induit le transfert de cette protéine vers la membrane cytoplasmique. Ceci aboutit également à un changement structural de la recoverine, ce qui lui permet d'interagir avec des protéines cibles.

Deux comportements sont rencontrés: le groupe myristoyl de NCS1 est accessible, même pour de faibles concentrations de calcium, et est nécessaire à sa localisation périnucléaire, quel que soit le niveau de concentration du calcium.

La neurocalcin  $\delta$ , quant à elle, a son groupement myristoyl séquestré lorsque la concentration calcique est faible et l'expose quand le niveau de calcium augmente, ce qui conduit à sa migration périnucléaire {17}.

### 1.7.3.Le calcium: généralités:

Les informations dont nous disposons sur EFHC1 nous incitent à penser que cette protéine pourrait intervenir dans le contrôle des concentrations calciques synaptiques.

Le calcium, on le sait, contrôle une variété d'effets cellulaires: contraction musculaire, métabolisme et cycle cellulaire, transduction de signaux, excitabilité neuronale...De plus, il joue un rôle central dans la fonction neuronale et le déclenchement du relargage des neurotransmetteurs, de même que dans de rapides changements de l'expression des gènes. Cet ion tient une place de médiateur ou de second messenger par l'intermédiaire de diverses protéines cytoplasmiques et modifie la polarisation des membranes biologiques via des canaux ioniques.

Le flux calcique (entrée d'ions  $Ca^{++}$  vers l'intérieur de la cellule) sert de relais entre les messages extracellulaires et la machinerie de transduction intracellulaire, qui s'active ou non en fonction des informations reçues. Ces données peuvent prendre la forme d'une rapide diffusion du signal ionique dans la cellule ou d'une variation locale de plus faible magnitude. A ce titre cet ion constitue le signal de transduction le plus commun rencontré dans toutes les cellules vivantes, depuis la simple bactérie jusqu'au neurone spécialisé.

Le maintien d'une concentration cytoplasmique de  $Ca^{++}$  à des niveaux bas (100 nM, soit 20000x inférieure à celle du milieu environnant) est fondamental à la viabilité cellulaire. En effet, un taux élevé et prolongé de calcium est mortel pour la cellule qui doit continuellement rejeter ce cation vers l'extérieur ou le stocker dans des réservoirs tels que le réticulum endoplasmique grâce à des pompes et canaux ioniques {19} .



## **2.La technologie des siRNA («small interfering RNA»):**

Parmi les différentes approches possibles qui permettent d'étudier les propriétés d'une nouvelle protéine, la mise au point de modèles cellulaires dans lesquels le gène n'est pas exprimé, peut constituer une aide fondamentale. Dans ce but, nous avons choisi la technologie des siRNA qu'il nous paraît opportun de résumer ci-après:

### **2.1.Définition et origine:**

La technique consistant à induire l'inhibition d'un gène spécifique dans une cellule vivante par l'introduction d'un RNA double brin est couramment désignée par les termes suivants : - RNAi = «RNA interférence»

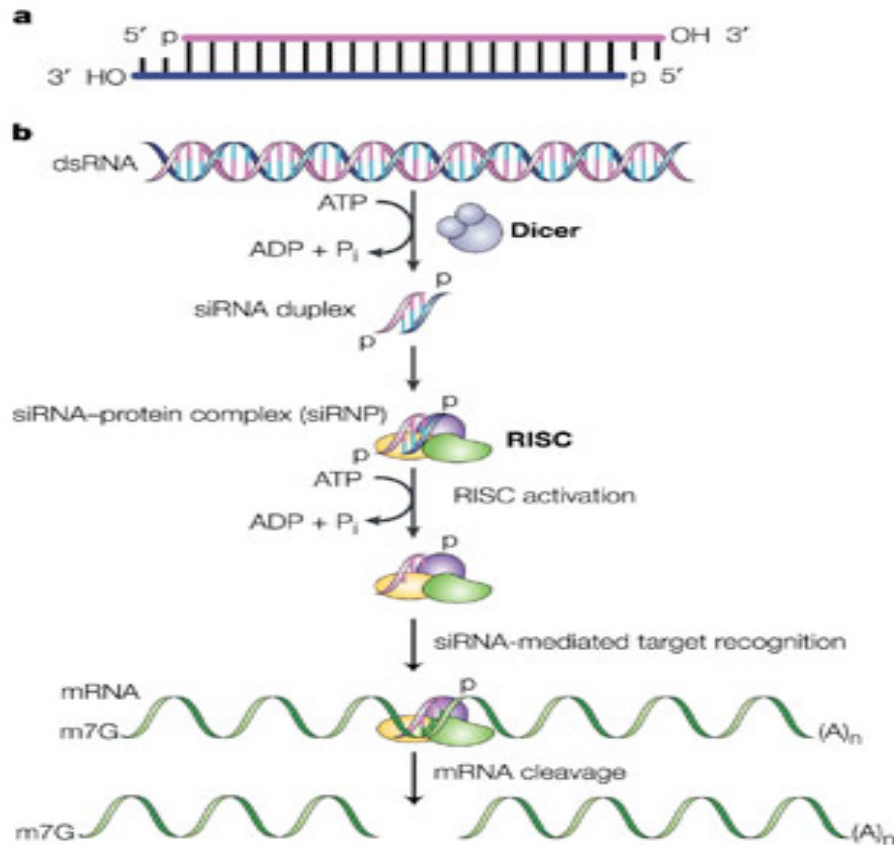
- PTGS = "Post transcript gene silencing"

L'interférence d'ARN est un phénomène naturel par lequel des cellules empêchent la traduction de certains ARNs. Ce processus fut conservé au cours de l'évolution eucaryote, reflétant ainsi son importance {21}.

On peut mettre en évidence des PTGS dans les plantes (*Arabidopsis*,...), les mycètes (*N.crassa*) et les invertébrés (*Drosophila Melanogaster*, *C.elegans*), chez lesquels ils remplissent le rôle de protecteur du génome contre des éléments mobiles tels que les transposons et les virus {22}. Ceux-ci peuvent riposter et se défendre par différents mécanismes dont la modification des séquences codantes, ce qui affecte l'inhibition médiée par les siRNA qui ne reconnaissent plus l'ARNm. De plus, ces derniers pourraient participer à la régulation normale des gènes.

### **2.2.Mécanismes d'action:**

Les ARNdb présents dans une cellule sont instables. Ils sont reconnus par l'enzyme Dicer qui les découpe en morceaux appelés «small interfering RNA» (siRNA). Le produit de cet enzyme a une structure spécifique: il possède un phosphate en 5', est hydroxylé en 3', et a deux bases non appariées à chaque extrémité 3'(fig.9a). Dicer possède un domaine de fixation aux ARNs, un domaine hélicase, un motif PAZ (Polyubiquitin Associated Zinc Finger) et deux domaines RNaseIII. Un motif PAZ est également présent dans la protéine argonaute 2, qui est un constituant du complexe multiprotéique de dégradation séquence spécifique de l'ARNm dénommé RISC (RNAi Silencing Complex). Il est possible que les interactions entre Dicer et argonaute 2 facilitent l'incorporation des siRNA dans ce complexe afin de dégrader les molécules d'ARNm (fig.9b). L'efficacité de l'inhibition médiée par les ARNdb dépend de leur longueur et augmente avec le rapport «longueur/21» {22,23}. Le mécanisme d'action exact par lequel le siRNA participe à la dégradation de l'ARNm est encore méconnu, mais il existe différentes hypothèses, dont celle qui considère que les siRNA constituent un «guide» pour le complexe enzymatique de dégradation séquence spécifique de l'ARNm. Des études mutationnelles ont démontré que chaque brin du siRNA revêt un rôle distinct, par exemple, c'est le brin sens qui guide l'appariement à l'ARN messenger cible. Les siRNA exercent leur action dans le compartiment cytoplasmique et pendant la translocation du noyau vers le cytoplasme. Ils sont inactifs au niveau nucléaire {22,26,27}.



**Figure 9:** a. Représentation schématique d'un siRNA de 19 nucléotides avec l'extrémité 5' phosphorylée. L'extrémité 3' possède deux nucléotides non appariés et n'est pas phosphorylée, ce qui est caractéristique des produits de clivage de la RNase III.

- b. Voie des siRNA. Le long ARNdb est clivé en siRNA par un membre de la famille de RNase de type III, dénommé Dicer, dans une réaction nécessitant de l'ATP. Le siRNA est ensuite incorporé dans le complexe RISC ce qui ne requiert pas d'ATP. Ce dernier est cependant nécessaire pour dérouler les siRNA. Le brin antisens guide RISC vers l'ARNm de séquence complémentaire au siRNA, ce qui engendre le clivage endonucléotidique de l'ARN ciblé.

### 2.2.1. ARNdb versus siRNA:

Comme on peut aisément le comprendre, l'inhibition induite par les ARNdb est très efficace puisqu'un «cocktail» de siRNA dirigés contre un même ARNm est généré. Toutefois, le risque que cela s'effectue au détriment de la spécificité, est important. En effet, la probabilité qu'un des siRNA du mélange reconnaisse une séquence proche augmente. De plus, chez les mammifères, il a été démontré que la présence dans une cellule d'ARNdb de plus de 30pb peut s'accompagner d'effets aspécifiques appelés «réponse à l'interféron». Le mécanisme de cette réponse consiste en une activation de PKR, une protéine kinase dépendante d'ARNdb qui phosphoryle et inactive le facteur d'initiation de la transcription EIF2 $\alpha$ . L'ARNdb active également la 2',5'oligoadénylate synthase, dont le produit stimule la

Rnase L. Cette dernière dégrade tous les ARNm, aboutissant à un arrêt complet et non spécifique de la synthèse protéique et à la mort cellulaire par apoptose {22,24}.

### 2.3.Applications en recherche:

L'objectif de la génomique fonctionnelle est d'étudier le rôle des différents gènes par l'inactivation individuelle de chacun d'entre eux, suivi de l'observation des éventuelles modifications du phénotype.

Il existe différents mécanismes qui permettent de rendre un gène silencieux:

- on peut réaliser un animal invalidé (knock out) pour le gène dont on cherche la fonction;
- on peut intervenir au niveau post-traductionnel, soit par la technologie des antisens, soit par *la technologie des siRNA*.

Un des avantages de l'ARNi sur la conception d'un animal «KO» est la possibilité de cibler spécifiquement un produit d'épissage. En effet, l'épissage alternatif est très utilisé dans les espèces eucaryotes pour augmenter la diversité. Par exemple, 40 à 60% des gènes humains encodent au moins deux protéines alternatives. L'inhibition au niveau du gène risque donc d'atteindre simultanément des protéines de fonctions différentes et importantes. Cela pourrait introduire des erreurs dans l'interprétation des résultats de l'étude d'une forme particulière obtenue après épissage {22}.

Les oligonucléotides antisens peuvent également provoquer une diminution de l'expression du gène par différents mécanismes {24, 32}:

- activation de la RNase H avec clivage des duplex ARN/ADN;
- inhibition de la maturation des ARNs;
- blocage de la traduction des ARNs.

Toutefois, différents problèmes limitent leur utilisation. Tout d'abord, afin d'augmenter leur stabilité et donc leur efficacité, les oligonucléotides doivent être modifiés chimiquement, ce qui empêche de les faire synthétiser par la cellule. D'autre part, ils ne sont souvent efficaces qu'à des concentrations plus élevées que les siRNA, ce qui peut avoir un impact sur leur toxicité.

Les siRNA, quant à eux, sont composés de molécules naturelles, ce qui permet d'induire leur production par une cellule. D'autre part, ils sont généralement actifs à plus faible concentration que les oligonucléotides antisens.

### 2.4.Application médicale:

L'ARNi peut, dans un futur proche, constituer un potentiel thérapeutique. L'insertion de séquences permettant aux vecteurs viraux de produire des siRNA, peut être utilisée en thérapie génique pour le traitement de cancers, de maladies infectieuses.

Prenons l'exemple de ces dernières: des études récentes démontrent que les siRNA peuvent être un moyen d'immunisation intracellulaire permettant la prévention des infections par le HIV, HCV et le Poliovirus. . Dans la lutte contre le Sida, différents essais ont été effectués sur des lignées cellulaires animales, dans lesquelles les siRNA sont dirigés contre le corécepteur du HIV CCR5 des cellules infectables et contre les transcrits des gènes viraux gag, pol et env. Les résultats montrent une diminution très importante de la réplication virale {29, 30, 31}. Quant aux recherches effectuées sur l'hépatite C, l'utilisation de siRNA ciblant des séquences du génome de HCV a montré la spécificité de cette technologie, mais a également mis en évidence le risque de ne pouvoir cibler qu'une seule souche virale à la fois. Afin de contourner cette difficulté et pour éviter l'émergence de virus résistants, un effet synergique de plusieurs siRNA dirigés contre différents gènes d'un même virus peut constituer une solution envisageable {32}.

### **3.Objectifs du mémoire:**

La collaboration entre notre laboratoire de Physiologie et le groupe du Professeur Delgado-Escueta (Los Angeles, CEP, Californie-USA) nous a permis d'obtenir la séquence complète du gène et de ses mutations associées à la JME avant leur publication.

Notre travail consiste à participer à la caractérisation des propriétés fonctionnelles de la protéine EFHC1 «normale».

Etant donné le caractère multidisciplinaire et très vaste de ce projet, plusieurs collaborateurs travaillent sur ce sujet.

Le premier objectif de ce travail est de déterminer la distribution du transcrit de EFHC1 dans des lignées cellulaires et dans différents organes.

Nous désirons notamment réaliser des expériences de RT-PCR quantitative afin:

1. de quantifier l'expression de l'ARNm de EFHC1 dans divers tissus;
2. de déterminer si la concentration de l'ARN de EFHC1 varie au cours du développement chez la souris;
3. de déterminer le niveau d'expression du transcrit de EFHC1 dans les cellules Neuro2A et HEK-293 car ces lignées cellulaires constitueront le modèle auquel sera appliquée la technologie des siRNA. La quantification en temps réel de l'ARNm de EFHC1 permettra ultérieurement de contrôler l'efficacité des siRNA.

Le second objectif de ce travail, consiste à développer des modèles de déficience enEFHC1, en utilisant la technologie des siRNA, et cela afin :

1. d'étudier les propriétés propres à la lignée cellulaire exprimant peu ou pas de EFHC1;
2. d'apporter un contrôle supplémentaire dans la vérification de la spécificité des anticorps polyclonaux dirigés contre EFHC1;
3. de déterminer le rôle de EFHC1 en relation avec:
  - les hypothèses électrophysiologiques qui sous-tendent les mécanismes déclenchant la JME;
  - les partenaires protéiques identifiés au laboratoire par la méthode du «Yeast two hybrids».

Une autre approche permettant d'étudier les propriétés et fonctions de EFHC1 réside dans l'établissement de lignées cellulaires qui expriment de façon stable le gène raccourci d'un ou deux exons (ceux dans lesquels surviennent le plus fréquemment les cinq mutations). Celles-ci pourront fournir des informations sur la fonction de la protéine et constitueront une première étude de viabilité dans la perspective de la réalisation d'une souris «knock-out» conditionnel pour ces deux exons.

## B. Matériel et méthodes:

Le matériel et les méthodes que nous avons *personnellement* utilisés au cours de notre travail vont être présentés.

### 1. Matériel:

#### 1.1. Oligonucléotides:

La réalisation de ce travail a nécessité l'utilisation d'une série de différents oligonucléotides qui sont énumérés ci-dessous (tableau 2). Ces derniers ont été fournis par les firmes Invitrogen et Eurogentec. Les recherches nécessaires à la synthèse des oligonucléotides siRNA furent réalisées à partir des sites <http://design.dharmacon.com>, <http://quiagen.com> et <http://WWW.ambion.com>.

Tableau 2: Séquences des différents oligonucléotides utilisés.

	Séquences	Concentration
mJMESiRNA1 Oligonucléotide sens 1	CCCAATTGTTGACTGTGACCGATTTTCAAGAGAAATCG GTCACAGTCAACAATTTTTTTGGAAA	10µM
mJMESiRNA2 Oligonucléotide antisens 1	CTAGTTTCCAAAAAATGTTGACTGTGACCGATTTCT CTTGAAAATCGGTCACAGTCAACAATTGGGTGCA	10µM
mJMESiRNA3 Oligonucléotide sens 2	CCCAATCCGCCACGTGAACATTTATTCAAGAGATAAA TGTTACCGTGGCGGATTTTTTTGGAAA	10µM
mJMESiRNA4 Oligonucléotide antisens 2	CTAGTTTCCAAAAAATCCGCCACGTGAACATTTATCT CTTGAATAAATGTTACGTGGCGGATTGGGTGCA	10µM
mouse JME PCRq for Oligonucléotide sens	TCATCGGTGCCGTGATTGA	3µM
mouse JME PCRq rev Oligonucléotide antisens	TGGATCCGGTCTGAATTGAG	3µM
HPRT for Oligonucléotide sens	TGACTGGCAAACAATGCA	2,5µM
HPRT rev Oligonucléotide antisens	AGCTTGCTGGTGAAAAGGACC	2,5µM
EGFP1 Forward Oligonucléotide sens	ACGAGAAGCGGATCACATGGT	10µM
JME1 Reverse Oligonucléotide antisens	CTTTTGTCAAAGGCCACATGCG	10µM
JME2 Forward Oligonucléotide sens	GTCCTTCGATTCTATGCAATCTG	10µM
SV40 Reverse Oligonucléotide antisens	CATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGG	10µM
FJMElong Oligonucléotide sens	TGGTGTCCAATCCCGTGCATG	10µM
RevJMElong Oligonucléotide antisens	TGCTGTCATCTTCTAGATAATAGT	10µM
RJME903 Oligonucléotide antisens	GCTACCCAAACCTTTTTGCCAAT	10µM
ForB3 Oligonucléotide sens	TGACATAGGAACCACAATAGGCTTAC	10µM
RevB93 Oligonucléotide antisens	AAAATAGTTACCAATACAGCTACCCAAAC	10µM

## 1.2. Duplex d'ARN:

Des expériences d'interférence à l'ARN furent réalisées à l'aide de duplex d'ARN dont les séquences figurent ci-après (tableau 3). Les duplex furent commandés à la firme Eurogentec et fournis sous forme hybridée.

Tableau 3: Séquences des duplex de siRNA dirigés contre les protéines EFHC1 et EGFP.

	Séquences	Concentration
DuplexJME1	UUGUUGACUGUGACCGAUUdTdT	100nM
DuplexJME1'	AAUCGGUCACAGUCAACAAdTdT	100nM
DuplexJME2	CAGGUCCUUCGAUUCUAUGdTdT	100nM
DuplexJME2'	GAUAGAAUCGAAGGACCUGdTdT	100nM
DuplexEGFP	CCACUACCUGAGCACGCAGdTdT	100nM
DuplexEGFP'	CUGGGUGCUCAGGUAGUGGdTdT	100nM

## 1.3. Plasmides:

### 1.3.1. Le plasmide pH1:

Le plasmide pH1 (fig10), gracieusement fourni par le Professeur Masaru Okabe (Université d'Osaka, Japon), est destiné à la construction du plasmide final pH1CAG/HcRed1, utilisé pour l'expression des siRNA en cellules eucaryotes. pH1 possède un gène de résistance à l'ampicilline régi par un promoteur procaryote. L'ADN double brin correspondant aux siRNA est inséré en aval du promoteur eucaryote H1 après l'élimination de la séquence d'espacement de  $\pm 200$  bp appelé «stuffer».

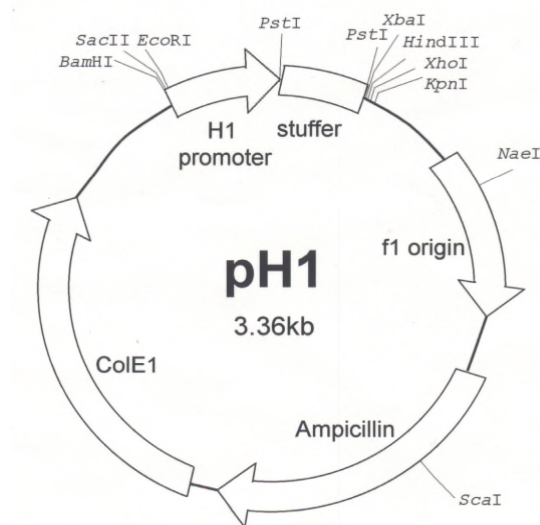


Figure 10: Cartographie du plasmide pH1.

### 1.3.2. Le plasmide pRed:

Le plasmide pRed (fig.11), également obtenu de l'équipe du Professeur Masaru Okabe, est utilisé pour la production de siRNA en cellules eucaryotes. Il possède un gène de résistance à l'ampicilline régi par un promoteur procaryote. Le gène codant une protéine fluorescente HcRed1 est sous la dépendance d'un promoteur eucaryote. Lorsque nous avons reçu ce plasmide, la séquence correspondant à un siRNA dirigé contre l'EGFP y était insérée en aval du promoteur H1.

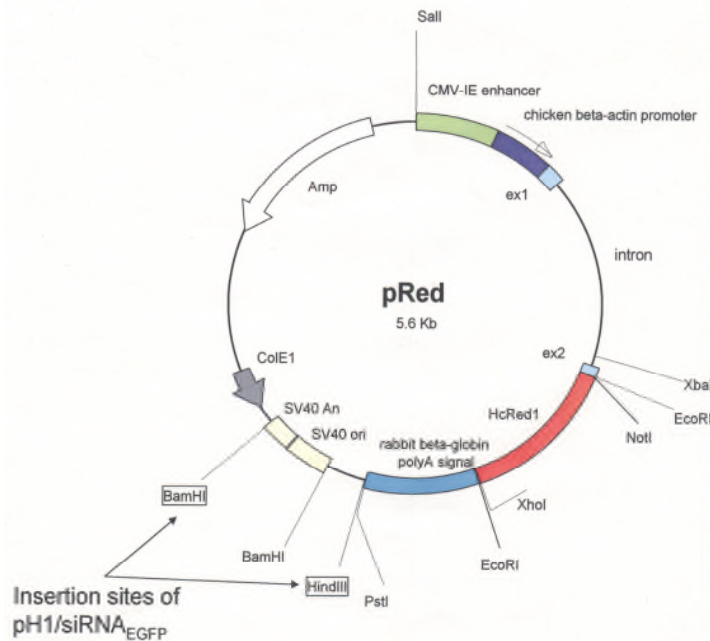


Figure 11: Cartographie du plasmide pRed.

### 1.3.3. Le plasmide pEGFP-EFHC1:

Le plasmide pEGFP-EFHC1 (fig.12) fourni par le laboratoire du professeur Delgado-Escueta permet la production en cellules eucaryotes de la protéine fusion EFHC1-EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) dans laquelle EFHC1 se trouve en C-terminal de l'EGFP. Ce plasmide possède un gène de résistance à la kanamycine et à la néomycine dont l'expression est sous la dépendance d'un promoteur procaryote et d'un promoteur eucaryote.

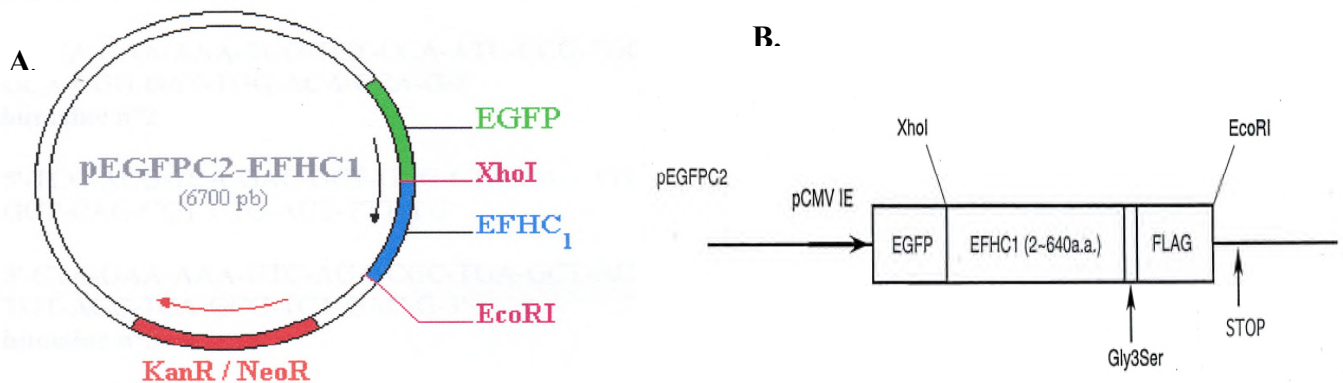


Figure 12: Cartographie du plasmide pEGFPC2 (A.) et description de la protéine fusion produite (B.)

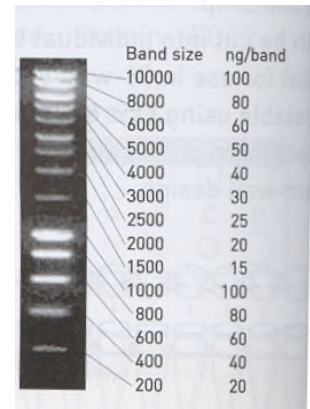
## 1.4. Standards de taille moléculaire:

### 1.4.1. «Standards ADN»:

Trois standards sont utilisés pour déterminer la taille de séquence d'ADN après migration sur gels d'agarose.

1. Le «Smart Ladder» (fig.13), commercialisé par la firme Eurogentec, permet de visualiser 14 bandes couvrant des tailles comprises entre 200 et 10.000pb.

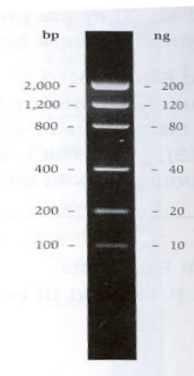
Chaque bande possède une intensité propre qui permet une quantification approximative de l'échantillon analyse.



*Figure 13:* Profil électrophorétique du «Smart Ladder» (Eurogentec).

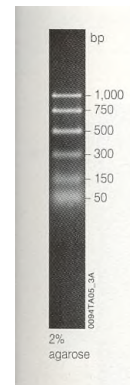
2. Le «Low density DNA Smart Ladder» fourni par la firme Invitrogen, se sépare en 6 bandes correspondant à des tailles allant de 100 à 2000 bp (fig 14).

Chaque bande possède une intensité propre qui permet une quantification approximative de l'échantillon analyse.



*Figure 14:* Profil électrophorétique du «Low density DNA Smart Ladder» (Invitrogen).

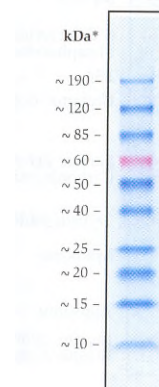
3. Le «Bench Top PCR Markers» fourni par la firme Promega, se sépare en 6 bandes correspondant à des tailles de 50 à 1000bp (fig.15).



*Figure 15:* Profil électrophorétique du « Bench Top PCR Markers» (Promega).

### 1.4.2. «Standard Protéines»:

Le standard utilisé pour apprécier la taille des protéines est le «Prestained Protein Ladder» (fig.16), commercialisé par la firme Invitrogen. Après migration, 10 bandes correspondant à des tailles de 9,3 à 172,6 kDa se sont dissociées. La quatrième bande, colorée en rose, facilite le repérage après la migration.



*Figure 16:* Profil électrophorétique du «Prestained Protein Ladder» (Invitrogen).



## 1.5. Anticorps:

### 1.5.1. Anticorps dirigés contre la protéine EFHC1:

Deux anticorps polyclonaux (ep021061 et ep021062) ont été produits chez le lapin et sont dirigés contre des séquences peptidiques de 15 acides aminés différentes. Ils ont été commandés chez la firme Eurogentec.

### 1.5.2. Anticorps dirigés contre la protéine GFP:

Anticorps polyclonal de lapin reconnaissant la protéine fluorescente verte EGFP.(Invitrogen) (1/5000).

### 1.5.3. Anticorps secondaires:

Anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline (Sigma) (1/5000);

Anticorps polyclonal de cochon anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline (Dako) (1/500);

Anticorps polyclonal de singe anti-IgG de lapin couplé à la fluorescéine (Jackson ImmunoResearch) (1/5000).

## 1.6. Lignées cellulaires:

### 1.6.1. Lignée cellulaires HEK-293:

Lignée permanente de cellules embryonnaires humaines de rein, cultivée dans un milieu comprenant 90% de DMEM (Dubleco's mod eagle medium; Gibco), 10% de sérum fœtal bovin (Greiner) et 1% de PS (Penicillin-Streptomycine, ICN).

### 1.6.2. Lignée cellulaires Neuro2A:

Lignée permanente de neurones de souris, cultivée dans un milieu comprenant 95% de DMEM (Dubleco's mod eagle medium; Gibco), 5% de sérum fœtal bovin (Greiner) et 1% de PS (Penicillin-Streptomycine).

## 1.7. Souche bactérienne:

La souche *E. coli* DH5 $\alpha$  est utilisée pour la production d'ADN plasmidien car elle possède des mutations des gènes *recA1* et *endA1* qui augmentent la stabilité de l'insert et par conséquent, la qualité de l'ADN extrait. Cette souche est commercialisée chez Invitrogen (USA).

**Génotype:** F- $\phi$ 80dZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 deoR *recA1* -A1 *hsdR17*(r<sub>k</sub><sup>-</sup>,m<sub>k</sub><sup>+</sup>) *phoA* sup E441<sup>-</sup> *thi-1* *gyrA96* *relA1*.

## **1.8.Espèces murines:**

### 1.8.1.Souris NMRI:

- Souris non consanguines
- Performances zootechniques:
  - 13 petits sevrés par portée
- Durée de vie moyenne: 23,7 mois
- Bonnes caractéristiques de croissance
- Coûts de production moins élevés que pour les souris consanguines.

### 1.8.2.Souris C57BL/6:

- Souche consanguine la plus utilisée en recherche
- Performances zootechniques:
  - 4,3 petits sevrés par portée
  - intervalle entre deux mise-bas: 33 jours
- Longue durée de vie
- Dépilations spontanées réversibles (à partir de 5 semaines)
- Mutation des gènes de coloration (front et ventre).

## **2.Méthodes:**

### **2.1.Culture cellulaire:**

Les cellules sont cultivées dans des boîtes de Petri de 10 cm de diamètre (Cell Star, Greiner Bio-one), dans 10 ml de milieu DMEM enrichi de sérum fœtal de veau dans des proportions propres à la lignée cellulaire (voir point 1.6.). Les cellules croissent dans une atmosphère humide à 37°C et sous 5% de CO<sub>2</sub>. Lorsque les cellules arrivent à confluence, elles sont diluées et remises en culture après avoir renouvelé le milieu. Seules les cellules HEK-293 doivent être trypsinisées (trypsin-EDTA 1×, ICN biomedical) pour être récoltées, en effet, les cellules Neuro2A adhèrent plus faiblement et peuvent être détachées par un simple jet de pipette.

### **2.2.Transfection de lignées cellulaires:**

#### **2.2.1.Transfection par co-précipitation au phosphate de calcium:**

Les cellules HEK-293 sont cultivées dans des boîtes de 10 cm contenant le milieu requis. Lorsqu'elles atteignent 45 à 50% de confluence, le milieu est renouvelé. La solution suivante est alors préparée: 62,5µl de CaCl<sub>2</sub> 2M, un volume contenant 15µg de plasmide et de l'eau pour arriver à 500µl. Après avoir homogénéisé et incubé cette préparation 15 minutes, 500µl de BBS 2X (BES 50mM, NaCl 280mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5mM, pH 6,95) y sont additionnés. Le tout est ajouté, goutte à goutte, aux cellules HEK-293. Le lendemain, le milieu de culture est remplacé.

#### **2.2.2.Transfection au Fugen:**

Le réactif de transfection Fugen 6 (Roche) est une solution lipidique de composition inconnue qui entoure l'ADN et facilite ainsi son passage à travers la membrane cellulaire. Les cellules Neuro2A sont dénombrées à la lame de Thoma puis 300.000 d'entre-elles sont placées dans des boîtes 6 puits (Cell star, Greiner Bio-one) et cultivées. Le lendemain, 1,5µl de Fugen sont ajoutés par µg de plasmide. Après une incubation de 15 min, 1,5% du volume final de milieu DMEM est introduit et laissé 5 min. L'ancien milieu est alors remplacé par du milieu frais supplémenté en sérum. Le lendemain, le milieu de culture est renouvelé.

### **2.3.Sélection des transfectants stables:**

Lorsque des transfusions sont réalisées, de nombreuses cellules internalisent l'ADN de façon transitoire, mais peu nombreuses sont celles qui l'intègrent de façon stable. La phase transitoire correspond aux 48 heures qui suivent la transfection, pendant laquelle jusqu'à 50% de cellules contiennent l'ADN exogène. Seul un faible pourcentage de cellules incorpore le plasmide transfecté dans leur génome. Un agent de sélection permettra d'isoler ces cellules qui pourront se développer et former des clones.

Quarante-huit heures après la transfection, chaque boîte de pétri contenant les cellules transfectées est divisée en 5 boîtes dans lesquelles est ajouté l'agent de sélection (G418 ou néomycine 800µg/ml, GIBCO, Invitrogen Corporation). Inhibiteur de la synthèse protéique, la néomycine est inactivée suite à une phosphorylation exercée par l'aminoglycoside phosphotransférase (APH) dont le gène est présent dans le plasmide pEGFPc2. Le milieu

est renouvelé tous les trois jours, pendant les deux semaines qui suivent, jusqu'à l'obtention de clones isolés. Lorsque les colonies sont visibles à l'œil nu, le milieu est remplacé par une solution de PBS contenant 1% de PS et les clones sont prélevés à la pipette automatique pour être déposés dans l'un des puits d'une plaque 96 puits, préalablement remplis de 150 µl de milieu sélectif. Une série de passages par trypsinisation est réalisée lorsque les clones arrivent à confluence:

- passage en plaque 24 puits: resuspension dans 1 ml de milieu sélectif;
- passage en plaque 6 puits: resuspension dans 4 ml de milieu sélectif;
- passage en boîte de 10 cm: resuspension dans 10 ml de culture.

Les cellules sont passées au FACS lorsqu'elles sont dans des boîtes 6 puits, ce qui permet de sélectionner les clones présentant une fluorescence appropriée.

## 2.4. Immunocytochimie:

L'immunocytochimie est une technique qui permet la détection d'antigènes et leur localisation cellulaire par des anticorps spécifiques couplés soit, à des fluorochromes, soit à des enzymes

Les cellules sont cultivées sur des lamelles en verre et déposées dans une boîte de culture à 24 puits. Les lamelles ont été préalablement traitées à l'aide d'une solution de polyornithine 0,1mg/ml (50µl/lamelle) pendant 45 min, puis rincées une fois à l'eau. Le tout est incubé 45 min à température ambiante, la goutte est aspirée tandis que le puits est rincé trois fois par 50µl d'eau. Après avoir compté les cellules (lame de Thoma), une goutte de 50µl contenant 5000 cellules est déposée sur chaque lamelle. Après une heure, les cellules adhèrent au support et 500µl de milieu approprié sont ajoutés dans les puits des cellules et ensuite incubés 24h ou 48h à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Elles sont fixées dans de la paraformaldéhyde (VWR) 4% pendant 15 min. et rincées trois fois par du TBS à pH 7,4, puis dans du PBS pH 7,4. La perméabilisation des cellules est réalisée par l'ajout d'une solution de TBS contenant 0,1% de Triton X100 pendant 10 min. Après un rinçage, les cellules sont incubées pendant deux heures dans la solution de blocage contenant du TBS-Tween20 0,05% et du lait 1,5%. Ensuite, les cellules sont incubées pendant une nuit en présence de l'anticorps primaire ep02106 dilué 70× dans la solution de blocage. Une lame qui constitue le contrôle négatif, sans anticorps primaire, est toujours réalisée en parallèle.

Après trois lavages de 10 min dans du TBS, l'anticorps secondaire d'âne anti-lapin, couplé à la fluorescéine (dilué 500×) est incubé pendant deux heures à l'abri de la lumière, puis rincé trois fois 10 min dans du TBS. Au besoin, les noyaux cellulaires peuvent être colorés à l'aide de l'éthidium homodimère 1 (20mM, Molecular Probe) dilué dans du TBS au cours d'une incubation d'une minute. L'excès est éliminé par 3 rinçages de 10 min dans du TBS. Les lamelles, préalablement rincées une fois à l'eau, sont montées dans une goutte de Fluoprep (BioMériaux) sur des lames porte-objets et séchées. Les cellules sont observées au microscope confocal à fluorescence (1025 MRC BIORAD).

## 2.5. La cytométrie en flux:

### 2.5.1. Définition:

La cytométrie en flux permet l'étude précise et rapide de particules biologiques isolées et suspendues dans une veine liquide (le flux) qui les entraîne une à une devant une station de mesures, à la cadence de 500 à 3000 par seconde. Une caractéristique importante de la cytométrie en flux est son effet non destructeur sur les cellules analysées qui peuvent donc être replacées en culture. Cette technique permet également de trier

individuellement les cellules et de les séparer physiquement des autres cellules ne répondant pas aux mêmes propriétés.

### 2.5.2.Fonctionnement:

Les cellules prélevées par le FACS sont propulsées une à une, au débit de 500 à 3000 cellules par seconde, dans un jet d'eau salin (PBS) microscopique qui croise un intense faisceau lumineux monochromatique généré par un laser. Un photodétecteur capte la lumière de diffusion axiale («forward scatter»,FSC) dont l'intensité est proportionnelle au volume de la cellule. Un photomultiplicateur détecte la lumière de diffusion axiale («Side scatter», SSC) diffractée par les cellules. Son intensité augmente avec l'hétérogénéité du cytoplasme et le degré de la condensation de la chromatine nucléaire. D'autres photomultiplicateurs également captent les émissions de fluorescences dans la direction orthogonale (fig.17).

Pour étudier les propriétés d'une population cellulaire mêlée à d'autres, il est nécessaire de séparer les différents types de cellules. Les cytomètres-trieurs actuels utilisent le tri électronique par déflexion d'une microgoutte d'eau électrostatiquement chargée. La veine de liquide qui entraîne les cellules est soumise à une vibration ultrasonique très précise, ce qui provoque la fragmentation du fluide et l'internalisation d'une cellule par goutte d'eau après un temps d'attente. Ce délai correspond au temps qui sépare l'analyse d'une cellule, du chargement électrostatique éventuel de la gouttelette contenant la cellule. Les cellules sont ainsi déviées de leur chute initiale et récupérées dans des tubes collecteurs. .

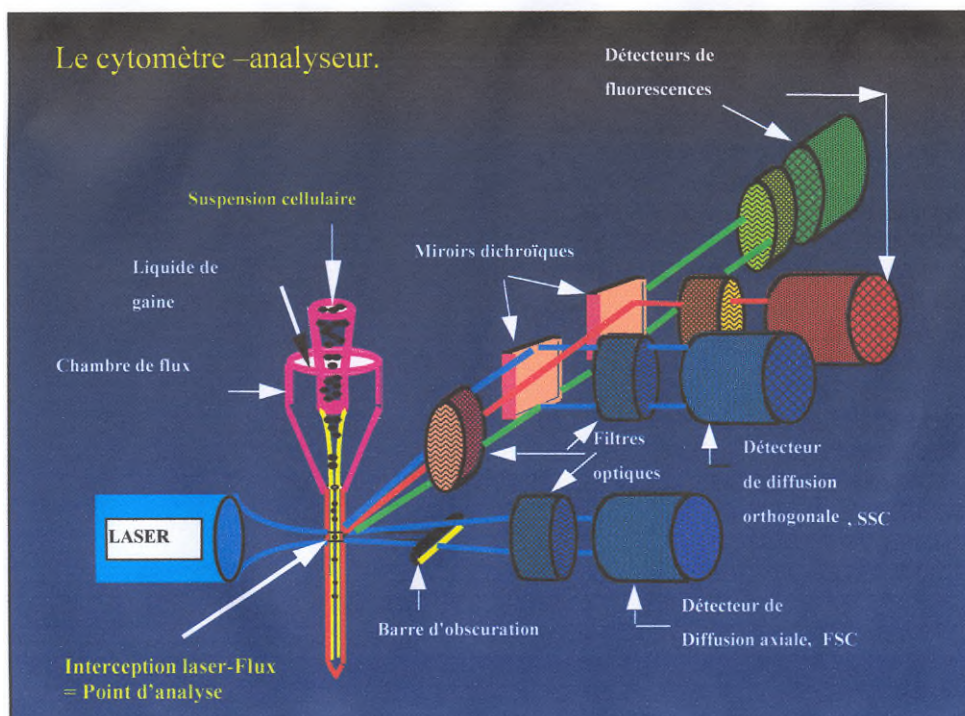


Figure 17: Les différents constituants d'un cytomètre en flux ou FACS.

## **2.6.Prélèvement d'organes:**

Les animaux utilisés sont des souris blanches NMRI ou des C57BL/6. Ces dernières sont sacrifiées selon les normes en vigueur (commission d'Ethique Animal de l'ULG, dossier n°172). Auparavant, elles sont isolées dans une pièce séparée afin d'éviter de propager leur stress aux autres animaux; en second lieu, elles sont anesthésiées par une injection intrapéritonéale de Kétamine (100mg/kg) et de Valium (diazépan - 5mg/Kg). Une dislocation cervicale permet de s'assurer du décès. Les organes peuvent alors être prélevés, puis rapidement placés sur de la carboglace. Ils sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à leur utilisation.

## **2.7.Manipulation des protéines:**

### 2.7.1.Extraction différentielle des protéines:

Une solution (solution d'homogénéisation) de Tris-HCl 50mM à pH 7,4 contenant divers inhibiteurs de protéases (Benzamidine 5mM, N-éthylmaleimide 5mM, EDTA 5mM, PMSF 1mM, cocktail d'inhibiteur de protéases, Roche) est ajoutée aux cellules ou à l'organe. Un volume de 400 $\mu\text{l}$  de solution est ajouté à  $20 \cdot 10^6$  cellules et, pour un organe, le volume de solution à additionner est égal au poids en grammes multiplié par dix. Un homogénéisateur de Potter, verre fritté contre verre fritté, est utilisé pour le broiement (une vingtaine de passage). Le surnageant est ensuite centrifugé une 15 min à 100000g à  $4^{\circ}\text{C}$ . Le surnageant, enrichi de protéines solubles est conservé et le culot est broyé à l'aide d'un homogénéisateur de Potter dans la solution d'homogénéisation contenant 1% de Triton  $\times 100$  (Serva). Après centrifugation, dans les mêmes conditions que ci-dessus, le surnageant, enrichi en certaines protéines membranaires, est conservé et le culot est mis en suspension dans la solution d'homogénéisation contenant 2% de SDS (sodium dodécyl sulfate, ICN Biomedicals Inc). Une centrifugation de 15 min à 26000g à température ambiante, permet de récupérer le surnageant, enrichi en certaines protéines nucléaires et du cytosquelette.

Le kit de la firme Bio-Rad Protein Assay est utilisé conformément aux instructions. La technique est basée sur le principe de dosage de Lowry.

### 2.7.3.Western blot:

Cette technique permet la mise en évidence dans un extrait tissulaire ou cellulaire, de protéines d'intérêt reconnues, à l'aide d'anticorps spécifiques. Les protéines sont d'abord séparées par électrophorèse puis transférées sur une membrane ou la protéine d'intérêt peut être visualisée à l'aide d'un anticorps spécifique, lui même reconnu par un anticorps secondaire couplé à un système de détection.

### Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE):

La séparation est réalisée dans un gel d'acrylamide dénaturant et discontinu composé d'un gel de concentration 4% et d'un gel de séparation 12%.

Les échantillons sont amenés à la concentration protéique finale voulue et ils sont mélangés avec un cinquième du volume de tampon de chargement 5 $\times$  concentré (SDS 10%, mercaptoéthanol 25%, Tris HCl 337,5 mM pH 6,8, sucrose 50% ou glycérol 50% et quelques grains de bleu de bromophénol). Les protéines sont dénaturées 5 min à  $100^{\circ}\text{C}$  au bain-marie et déposées sur le gel.

La migration s'effectue à voltage constant (180V) et à ampérage limitant (20mA/gel) dans le tampon d'électrophorèse (Tris base 18mM, glycine 192mM, SDS 0,5%, pH 8,3).

### Electro-transfert semi-sec:

Les protéines sont transférées par électrotransfert semi-sec à l'aide de l'appareil Transblot (Bio-Rad) sur une membrane de polyvinylidène difluorure (PVDF, Amersham Pharmacia Biotech). Sont successivement déposés, de la borne positive vers la borne négative, trois papiers Wathman humidifiés dans le tampon de transfert (Tris HCl 25mM, glycine 192mM, méthanol 20%, pH8,5), la membrane PVDF, préalablement trempée dans le méthanol, puis dans de l'eau, le tampon de transfert et le gel rincé dans la solution de transfert ainsi que trois autres papiers Wathman. L'appareil est réglé pour débiter 0,8 mAmpères / cm<sup>2</sup> et 25 Volts pendant 48 minutes.

Le gel est coloré une heure à température ambiante sous agitation dans une solution de bleu de Comassie 0,1%, méthanol 30% et d'acide acétique 10% pour s'assurer que le transfert s'est bien déroulé. Ensuite, le gel est transféré dans une solution de méthanol 40% et acide acétique 10% afin de stopper la coloration.

### Immunodétection:

La membrane est incubée pendant 1 heure dans une solution de blocage des sites de liaisons aspécifiques (lait écrémé en poudre à 5% reconstitué dans du TBS-Tween20 0,05%). Les membranes sont lavées trois fois 10 min dans du TBS-Tween 0,05% et incubées avec l'anticorps polyclonal de lapin ep021061, dirigé contre EFHC1 qui est dilué à 1/200 dans une solution de TBS-Tween20 0,05% comprenant 3% de lait. L'incubation dure une nuit à 4°C sous agitation. Les contrôles sans anticorps primaires sont réalisés en parallèle.

Après trois lavages de 10 min dans du TBS-Tween20 0,005% et, sous agitation, les membranes sont incubées 1h à 37°C avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-lapin couplé à la phosphatase alcaline (Sigma) dilué à 1/500 dans du TBS-Tween20 0,05%. Trois lavages de 10 min sous agitation dans du TBS-Tween20 0,05% sont à nouveau réalisés.

Préalablement à la révélation, les membranes sont rincées dans une solution de Tris HCl 0,1M et NaCl 0,1M à pH 9,5 pendant 5 min, puis elles sont incubées, à l'abri de la lumière, dans la solution Tris à pH 9,5 à laquelle on ajoute 0,5% de NBT(nitrobleu tétrazolium; Roche) et 0,375 µl de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl; Roche). La réaction est stoppée par de l'eau. Les membranes sont séchées sur du papier Wathman.

## **2.8.Manipulation d'acides nucléiques:**

### 2.8.1.Préparation de cellules compétentes:

Une préculture consistant en 2ml de LBensemencé par la souche *E.coli* DH5 $\alpha$  est incubée une nuit à 37°C. Le lendemain, 200 ml de LB sont inoculés par cette préculture, et placés à 37°C sous une agitation de 250 rpm. Lorsque la densité optique de la culture atteint une valeur située entre 0,35 et 0,375, la culture est dispensée dans des tubes Falcon de 50 ml préalablement refroidis et le tout est placé 5 à 10 min sur glace. Après une centrifugation de 7 min à 1600g et à 4°C, chaque culot est doucement remis en solution dans 5ml de solution de transformation froide (CaCl<sub>2</sub> 60 mM, glycérol 15%, PIPES 10 mM), stérilisée par filtration («Acrodisc Syringe Filters», Gelman Laboratory). Après avoir centrifugé 5 min à 1100g et 4°C, le culot est resuspendu dans les mêmes conditions et incubé 30 min sur glace. A la suite d'une dernière centrifugation de 5min à 1100g et 4°C, les bactéries sont mises en suspension dans 1ml de solution de transformation froide. Elles peuvent être utilisées immédiatement ou conservées à - 70°C.

### 2.8.2. Transformation des bactéries compétentes:

La transformation dans les cellules compétentes permet d'amplifier un plasmide selon les étapes suivantes. Le plasmide ( $\pm 5\mu\text{l}$ ) est ajouté aux cellules DH5 $\alpha$  qui sont alors incubées 15 min sur glace. Ensuite, un choc thermique à 42°C, pendant une minute, augmente la perméabilité de la membrane des bactéries qui sont immédiatement placées sur glace pendant 1 min. Ensuite, 250 $\mu\text{l}$  de milieu LB sont additionnés et l'ensemble est placé 1h à 37°C sous agitation. Les bactéries sont alors étalées sur boîte de LB contenant l'agent sélectif adéquat.

### 2.8.3. Extraction d'ADN plasmidien:

#### Mini-préparation de plasmides:

Une colonie s'étant développée sur un milieu sélectif approprié est repiquée et inoculée dans 2 ml de milieu LB auxquels un agent sélectif adéquat est ajouté. Cette culture est incubée une nuit à 37°C et sous agitation (250 rpm). La purification de petites quantités de plasmide est réalisée à l'aide du kit «QIAprep Miniprep» de Qiagen. Après 10 min de centrifugation à 6000g, le culot bactérien est resuspendu dans 250  $\mu\text{l}$  de tampon P1. Sont ensuite ajoutés, successivement, et en homogénéisant à chaque étape, 250 $\mu\text{l}$  de solution de lyse P2 et 350 $\mu\text{l}$  de tampon de neutralisation N3. Le tout est centrifugé 10 min à 13000g et le surnageant contenant les plasmides est transféré sur une colonne de silice Qiaprep. Après centrifugation pendant 60 sec à 13000g, la colonne est lavée avec 750 $\mu\text{l}$  de solution de lavage PE. Une centrifugation à vide permet d'éliminer toutes traces des tampons précédents. L'ADN est alors élué de la colonne dans 50 $\mu\text{l}$  de Tris-HCl 10mM pH 8,5. La composition des tampons n'est pas décrite dans le protocole.

#### Midi-préparation de plasmides:

Une culture d'un clone d'intérêt est incubée pendant une nuit à 37°C sous 250 rpm dans 50 ml de milieu LB contenant l'agent de sélection approprié. Les bactéries sont collectées par centrifugation pendant 15 min à 6000g et à 4°C. Le culot bactérien est resuspendu dans 4 ml de tampon P1 (Tris-HCl 50mM, pH 8,5; EDTA 10mM; RNase 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), puis, 4ml de tampon P2 (NaOH 200mM; SDS 1%) sont ajoutés à la suspension. Après avoir mélangé par inversion, le tout est incubé à température ambiante pendant 5 min. Quatre millilitres de tampon P3 (Acétate de potassium 3M, pH5,5) sont ajoutés, l'échantillon est homogénéisé, puis incubé sur glace pendant 15 à 20 min. Après 30 min de centrifugation à 4°C, le surnageant est déposé sur une colonne Quiagen 100 préalablement équilibrée par 4 ml de tampon QBT (NaCl 750 mM; MOPS 50mM, pH 7,0; isopropanol 15%, Triton X-100 0,15%). La colonne est lavée par 20ml de tampon QC (NaCl 1M; MOPS 50mM, pH 7,0; isopropanol 15%) puis l'ADN est élué dans 5ml de tampon QF (NaCl 1,25 M; Tris-HCl 50 mM, pH 8,5; isopropanol 15%). L'ADN plasmidien est précipité par l'ajout de 3,5ml d'isopropanol et récupéré par 30 min de centrifugation à 15000g et à 4°C. Le culot d'ADN est lavé avec 2 ml d'éthanol 70% et est centrifugé à 15000g pendant 10 min. Il est ensuite séché sur glace pendant 10 min avant d'être resuspendu dans 100 $\mu\text{l}$  de tampon Tris-HCl (pH 8,5). L'ADN en solution sera conservé sur glace ou stocké à -20°C. Le plasmide récupéré est alors dosé par mesure de la densité optique: l'absorbance à 260nm est multipliée par le facteur de dilution et par 50 (1DO 260 = 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'ADN).



#### 2.8.4. Digestion d'ADN par des enzymes de restriction:

La quantité souhaitée de plasmide (au maximum 1,5 µg) est digérée dans un volume final de 15 µl comprenant 1/10 de tampon de réaction 10× et de l'enzyme à raison de 3U par 1µg d'ADN. Le milieu réactionnel est complété par de l'eau. Après 2h d'incubation à 37°C, les produits de digestion peuvent être analysés sur gel d'agarose. Les enzymes et leur tampons proviennent de la firme Invitrogen.

#### 2.8.5. Purification d'ADN:

##### Purification d'ADN en solution:

Le recours à ce type de purification permet de changer le milieu réactionnel de solutions contenant des acides nucléiques, ce qui rend possible la réalisation de digestions ultérieures. Le kit utilisé le «High Pure PCR Product Purification Kit» commercialisé par Roche, est utilisé selon les instructions suivantes: à 100 µl de solution comprenant l'ADN sont ajoutés 500 µl de tampon de liaison (Thiocyanate de guanidine 3M; Tris-HCl 10mM pH 6,6; éthanol 5%) et cette préparation est homogénéisée. L'échantillon est alors déposé sur la colonne de purification et est centrifugé 30 sec à 13000g. La colonne est ensuite lavée par 500 µl, puis 200 µl de tampon de lavage (NaCl 20mM; Tris-HCl 2mM pH 7,5; éthanol 80%), et centrifugée à chaque étape. L'ADN est récupéré dans 30 µl de tampon d'élution (Tris-HCl 10mM pH 8,5; EDTA 1mM).

##### Extraction et purification d'ADN d'un gel d'agarose:

Le kit «QIAquick Gel Extraction» de QIAGEN permet d'isoler un fragment d'ADN particulier d'un gel d'électrophorèse. Un gel d'agarose est réalisé et y sont déposés dans l'ordre, le marqueur de poids moléculaire, 10 µl de l'échantillon à purifier et, dans les autres puits qui ont été fusionnés, le reste de l'échantillon. Cette disposition est nécessaire car l'échantillon à purifier ne devra en aucun cas subir l'action du bromure d'éthidium, ni être exposé aux UV, étant donné leur caractère mutagène. La séparation du fragment à isoler se fait par migration électrophorétique qui est suivie aux UV sur les deux premières colonnes du gel, incubées préalablement dans du bromure d'éthidium. Un report sur la portion du gel contenant l'échantillon permet de découper la portion contenant le fragment à purifier. Après avoir pesé la portion du gel d'agarose qui est introduit dans un tube, 3 volumes du tampon QG sont ajoutés sur base de la relation 100µg = 100 µl. Le tout est placé 10 min à 50°C. Un volume d'isopropanol est ajouté et le mélange est déposé sur la colonne QIAquick et centrifugé 1 min à 13000g. La colonne est lavée une première fois par 500µl de tampon QG et une seconde fois par 750 µl de tampon PE. La colonne est centrifugée à vide afin d'éliminer les traces de solution de lavage, puis, l'ADN est élué par 50 µl de Tris-HCl pH 8,5. La composition des tampons QG et PE n'est pas connue.

#### 2.8.6. Hybridation des oligonucléotides en solution:

Les oligonucléotides sont amenés à une concentration de travail de 100µM. A 8µl des deux oligonucléotides sens et antisens 100µM sont ajoutés 2,5ml de NaCl 3M et 42µl d'H<sub>2</sub>O. La solution est placée pendant 5 min dans de l'eau bouillante pour dénaturer les oligonucléotides, puis, refroidie lentement pour permettre leur hybridation.

### 2.8.7.Ligation d'ADN:

Environ 100 ng de vecteur ouvert ainsi que 0,5 µl d'ADN insert double brin sont placés dans un tube Eppendorf. Deux microlitres de tampon ADN 5× et l'eau nécessaire à atteindre un volume final de 10 µl y sont ajoutés. A ce mélange sont ensuite additionnés 10 µl de tampon de ligation 2× et 1 µl de T4 ligase (5U/µl). Le tout est incubé 30 min à température ambiante, puis, peut être utilisé directement pour la transformation ou conservé à -20°C. La composition des tampons «DNA dilution buffer (5×)» et «Ligation buffer (2×)» n'est pas communiquée par la firme (Roche). Néanmoins, le tampon de ligation doit contenir de l'ATP nécessaire au travail de la T4 ligase.

### 2.8.8.Extraction d'ARN total:

Les différents organes de souris conservés à -80°C sont placés dans du «RNA Instapure LS» ( Eurogentec) à raison de 2ml par 100mg de tissu, puis broyés à l'aide du Polytron (Bioblock Scientific, Kinematica AG). Dans le cas des lignées, les cellules cultivées dans une boîte de 10 cm sont détachées de façon appropriée et les culots sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Les cellules sont lysées par remise en suspension dans 200µl d'Instapure par 20.10<sup>6</sup> cellules. Ensuite, quel que soit le type d'échantillon, 10% de chloroforme et 10% d'eau traitée au DEPC sont ajoutés à l'extrait. Le mélange est ensuite incubé 15 min sur glace puis centrifugé 15 min à 13000g et à 4°C. Un volume équivalent d'isopropanol est ensuite ajouté à la phase aqueuse récupérée. Le tout est incubé 30 min sur glace et l'ARN est récupéré par 30 min de centrifugation, aux mêmes conditions que précédemment. Après addition de 500 µl d'éthanol 75%, les échantillons sont centrifugés 10 min et les culots sont stockés à -80°C dans de l'éthanol absolu.

### 2.8.9.Traitement à la DNase:

A 100µl de solution comprenant l'ARN total, sont ajoutés 100µl d'un mélange comprenant 4U de DNase (Life Technologies), 40U de RNase Out (Life Technologie), 20µl de tampon Tris-HCl 1M pH7,5, 40µl de MgCl<sub>2</sub> 10mM. Les échantillons sont incubés 1h à 37°C et 3min à 95°C. Cinq cents microlitres de phénol acide et 500µl de chloroforme sont ajoutés successivement (vortexer à chaque étapes), puis les échantillons sont centrifugés 10 min dans des conditions similaires. La phase aqueuse récupérée est précipitée une nuit à -80°C, en présence d'un dixième de volume d'acétate de sodium (3M, pH 5,5) et 2,5 volumes d'éthanol absolu froid. Le lendemain, après une centrifugation de 15 à 30 min à 13000g à 4°C, les culots sont séchés puis mis en solution dans de l'eau traitée au DEPC et dosés par lecture optique à 260 et 280 nm. Le rapport de ces deux absorbances (les ARN sont entre 1,7 et 2,0) donne une estimation de la pureté des échantillons. La valeur obtenue à 260 nm est multipliée par le facteur de dilution puis par 40. En effet, une unité de densité optique à 260nm équivaut à une concentration en ARN de 40µg/ml.

### 2.8.10.Transcription inverse:

A 10µg d'ARN sont ajoutés 2 µl d'hexanucléotides 2µg/µl (Amersham Pharmacia) et de l'eau traitée au DEPC pour arriver à un volume final de 20 µl. Après des incubations successives de 5 min à 70°C, 1 min à 4°C et 2 min à 37°C, 20 µl du mélange pour la RT-PCR sont ajoutés aux ARNs. Ce mélange comprend, par échantillon: 4µl de DTT 0,1M, 2µl de RNase out (40U/µl), 8µl de tampon (Tris-HCl 250mM pH 8,3, KCl 375mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM), 2µl de dNTP 10 mM, 2µl d'eau et 2µl de M-MLV(Moloney Murine Leukaemia Virus, transcriptase inverse, 200U/µl, Invitrogen). Le tout est placé 1 heure à 37°C, puis la réaction est arrêtée par une incubation de 5 minutes à 95°C. Les tubes sont stockés à -20°C.

### 2.8.11. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR):

Une ADN polymérase thermostable permet d'amplifier spécifiquement et de façon exponentielle, une séquence d'ADN comprise entre deux amorces.

L'ADN est dénaturé entre 90°C et 94°C pendant 30 à 60sec puis les amorces s'hybrident à leurs séquences complémentaires, choisies de façon à encadrer la séquence à amplifier. La température d'hybridation dépend de la longueur et du pourcentage en bases GC des amorces utilisées. La durée de l'étape d'hybridation varie entre 30 et 60 sec. L'ADN polymérase synthétise alors les brins complémentaires à la séquence cible à une température optimale pour l'activité de l'enzyme. La longueur du fragment détermine le temps d'élongation. Trente secondes sont nécessaires pour synthétiser un fragment de 500 bases.

Dans les conditions standards, le volume du mélange est de 100 µl et la concentration finale des réactifs est la suivante: MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; dNTPs 0,2 mM; amorce sens 0,5 µM; amorce antisens 0,5 µM, Taq polymérase 0,025 U/µl (Gibco-BRL, 5U/µl), Tris-HCl 10mM pH 8,3 et KCl 50mM.

### 2.8.12. PCR quantitative en temps réel:

Le kit de PCR utilisé est commercialisé par QiAgen (Quantitect Sybr Green PCR kit) et permet une quantification précise en temps réel de l'ADN. L'enzyme utilisé est inactif à température ambiante (HotStarTaq Polymerase) ce qui prévient la formation de produits d'amplification, suite à un mauvais appariement pendant la préparation de l'échantillon et assure ainsi une haute spécificité de la PCR. Le Sybr Green 1 est un fluorochrome qui se lie à toutes les molécules d'ADN double brin, émettant un signal après son appariement. Les maxima d'excitation et de quantification de Sybr Green 1 sont respectivement de 494nm et de 521nm. Un standard interne fluorescent est également présent dans le mélange: ROX. Il permet de normaliser le signal fluorescent de Syber Green 1 et de corriger les variations dues aux imprécisions de pipetage ou aux fluctuations de la fluorescence. ROX possède un spectre d'émission totalement différent de celui de Syber Green 1 afin d'éviter les interférences. Les expériences ont été réalisées sur le thermocycler Rotor Gene RG 3000 (Corbett Research, Westburg).

A 3µl du produit de transcription inverse sont ajoutés 1µl d'amorces sens, 1µl d'amorces antisens (tableau 2), 7,5µl H<sub>2</sub>O traitée au DEPC et 12,5µl de Quantitect SYBR Green PCR Green Master Mix. Les conditions suivantes sont alors appliquées:

1. activation de la Taq polymérase par une incubation de 15 min à 95°C,
2. dénaturation à 94°C, pendant 15 secondes,
3. hybridation des amorces à 58°C pendant 30 secondes,
4. élongation à 72°C pendant 30 secondes.

Cette séquence est répétée cinquante fois maximum.

Le mélange inclus dans ce Kit contient: de la Hot StarTaq Dna Polymerase, du tampon Quantitect SYBR Green PCR, un mélange de dNTP comprenant du dUTP, du SYBR Green, du ROX et du MgCl<sub>2</sub> 5mM.

## C.Résultats:

Lors d'études mutationnelles sur différentes familles de patients qui présentent une épilepsie myoclonique juvénile, le Professeur Delgado-Escueta et ses collaborateurs ont observé une corrélation entre des mutations dans le gène EFHC1 et le phénotype JME. Ce gène correspond à une nouvelle protéine de fonction inconnue. Pour débiter l'étude de EFHC1, nous avons voulu, dans un premier temps, localiser l'expression de son ARNm. Différentes lignées cellulaires et différents tissus ont été analysés.

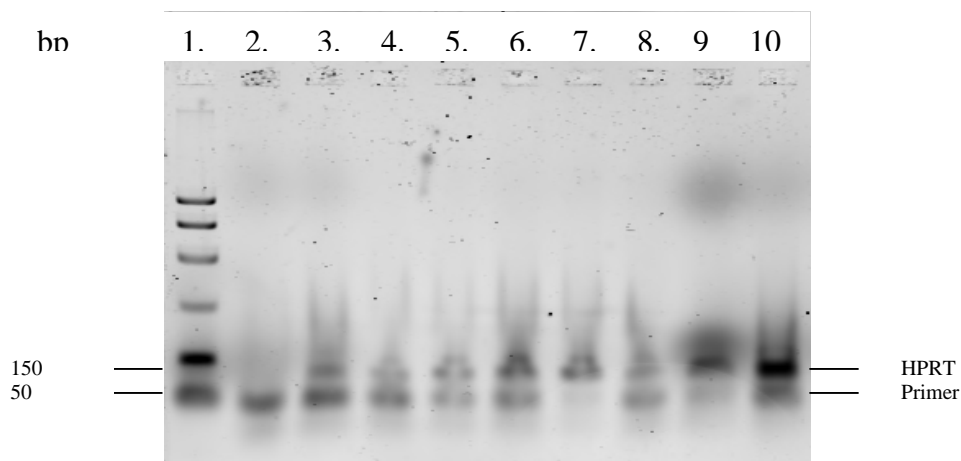
### **1.Mise en évidence de l'ARNm de EFHC1 dans différentes lignées cellulaires:**

Afin d'étudier l'expression du gène EFHC1, nous avons réalisé des expériences de transcription inverse suivies de polymérisation en chaîne à partir d'ARNs totaux isolés de lignées établies de souris, de rat et d'homme (tableau 4). Les amorces utilisées pour l'étude des deux transcrits de EFHC1 humaine et du transcrit de EFHC1 murine ont été choisies à l'aide du programme Primer Express™ 1.0 (Applied Biosystems). Afin de ne pas amplifier l'ADN génomique, elles ont été choisies à la jonction entre deux exons. Les ADNc amplifiés par PCR ont été analysés après migration sur gel d'agarose.

**Tableau 4:** Lignées cellulaires investiguées par RT-PCR pour détecter l'expression de l'ARNm de EFHC1.

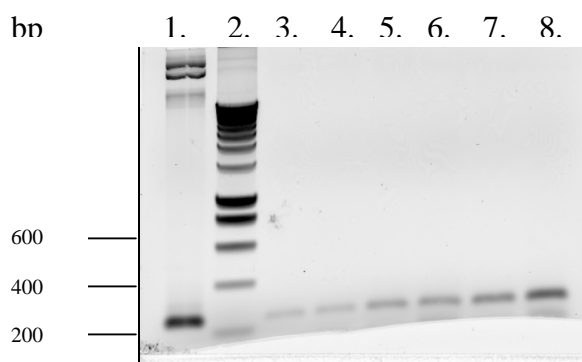
	Origine histologique	Espèce
Neuro2A	Cellules de neuroblastome	souris
HEK-293	"Human embryonic kidney"	humain
PBMC	"Peripheral blood mononuclear cells" (lymphocytes et monocytes)	humain
SKNBE	Cellules de neuroblastome	humain
C6	Cellules de glioblastome	rat
Jurkatt	Lymphocyte T isolés de leucémie Lymphoïde aigüe	humain
LN18	Cellules de glioblastome	humain

Nous avons employé des amorces dirigés contre l'ARNm du gène de l'Hypoxanthine PhosphoRibosyl Transférase ou HPRT, classiquement repris comme gène constitutionnel {33}, pour s'assurer de la qualité des échantillons obtenus après la réaction de transcription inverse. Comme le montre la figure 18, les transcrits du gène HPRT sont détectés dans tous les échantillons à la taille attendue (93bp).



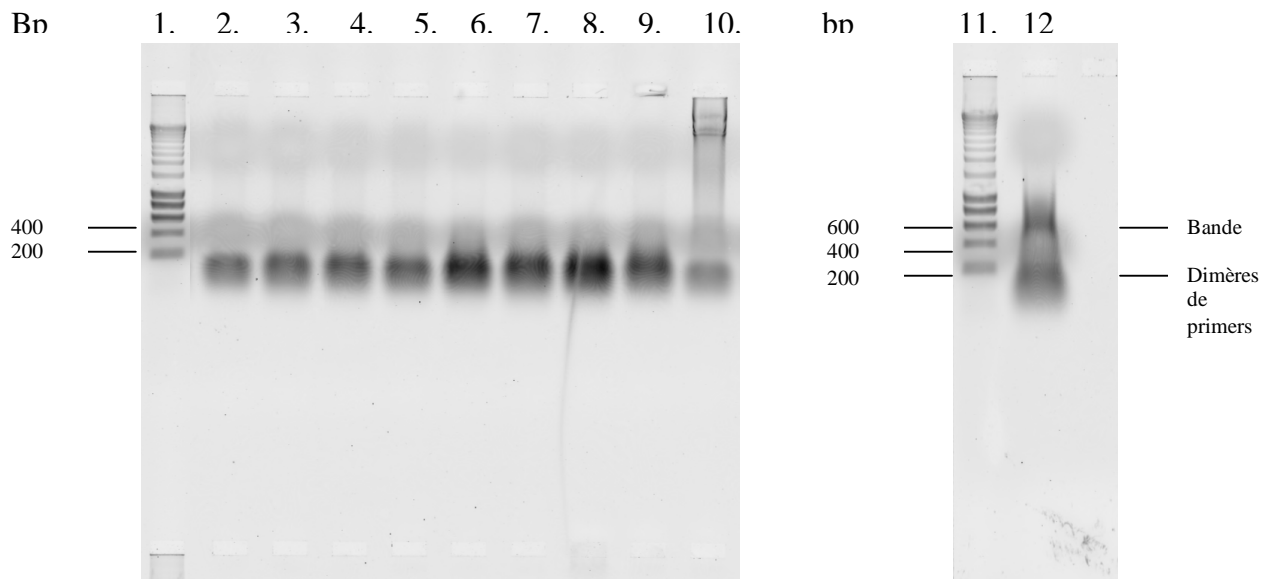
**Figure 18:** Analyse par RT-PCR de l'expression de l'ARNm de HPRT dans les lignées cellulaires étudiées (gel d'agarose 2%): 1.Smart Ladder, 2.H<sub>2</sub>O, 3.Neuro2A, 4.HEK, 5.HEK transfectées avec EFHC1 long, 6.PBMC, 7.SKNBE, 8.C6, 9.Jurkatt, 10.LN18. On peut observer le produit d'amplification de HPRT à 93bp et la présence de dimères de primers à  $\pm$  40bp.

Le long transcrite (forme A) du gène EFHC1 a été mis en évidence dans les lignées cellulaires HEK-293, HEK-293 transfectées avec la forme longue de EFHC1, dans des PBMC, des cellules SKNBE, Jurkatt et LN18 (fig. 19). Toutefois, l'intensité de la bande détectée dans les cellules HEK-293 est très faible malgré 40 cycles d'amplification.



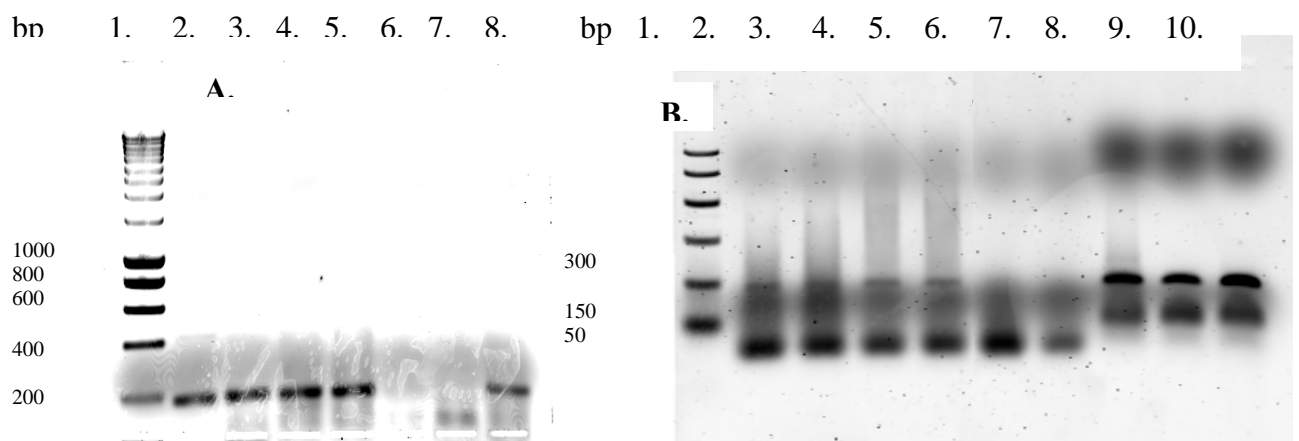
**Figure 19:** Analyse par RT-PCR de l'expression de l'ARNm de EFHC1 dans les lignées cellulaires: (3) HEK-293,(4) HEK-293 transfectées avec EFHC1 long,(5) PBMC, (6) SKNBE,(7) Jurkatt,(8) LN18. (1) contrôle positif constitué du plasmide de la courbe standard PCR quantitative EFHC1 (2).Smart Ladder.

La forme courte, transcrite à partir du gène EFHC1, n'a pas été détectée par nos expériences de RT-PCR dans les lignées cellulaires HEK-293,HEK-293 transfectées avec EFHC1 long, PBMC, SKNBE, Jurkatt, LN18 (fig.20). Par contre, la réaction de transcription inverse à partir d'un extrait d'ARNs totaux de PBMC (fig. 20 puits n°11) montre une bande à la taille attendue (801bp) pour la forme courte. L'absence de bande dans le puits numéro 4 contenant également un extrait d'ARNs totaux de PBMC ne peut être expliquée à l'heure actuelle. Des expériences complémentaires de séquençage de la bande observée dans l'échantillon numéro 11 doivent être réalisées. D'autre part, l'utilisation d'un plasmide contenant la séquence du transcrite B de EFHC1 constituerait un témoin positif de la réaction de PCR.



**Figure 20:** Analyse par RT-PCR de l'expression de l'ARNm de EFHC1 dans les lignées cellulaires: 1.Smart Ladder, 2.HEK-293, 3.HEK-293 transfectées avec EFHC1 long, 4.PBMC, 5.SKNBE, 6.Jurkatt, 7.LN18. 8. et 9.H<sub>2</sub>O, 10. contrôle négatif constitué du plasmide EGFP-EFHC1 long, 11.PBMC.

Nous avons également tenté de mettre en évidence les transcrits de EFHC1 dans une lignée murine, Neuro2A (neuroblastome) ainsi que dans une lignée de rat, C6 (glioblastome). Comme le montre la figure 21, nous observons l'expression du transcrit dans ces deux lignées (fig. 21.A et B.).



**Figure 21:** Analyse par RT-PCR de l'expression de l'ARNm de EFHC1 dans les lignées de souris et de rat: **A.** 1. «Smart Ladder», 2. C6 amplifié avec les primers FJMELong et RJMELong, 3. C6 amplifié avec les primers ForB3 et RevB3, 4. cerveau amplifié avec les primers FJMELong et RJMELong, 5. cerveau amplifié avec les primers FJMELong et RJMELong,, 7. eau primers FJMELong et RJMELong, 9. eau primers ForB3 et RevB3, 8.cerveau amplifié avec les primers ForB3 et RevB3. **B.** 1. «Smart Ladder», 2. 3. et 8. témoins positifs (cortex), 4. et 5.Neuro2A, 6. et 7. H<sub>2</sub>O, 9. et 10. témoins positifs (plasmide de la courbe standard PCR quantitative EFHC1). Le produit est de 197bp pour les amorces ForB3 et RevB3 et de 201 pour FJMELong et RJMELong.

## **2.PCR quantitative en temps réel:**

Le choix d'une PCR quantitative, plutôt que d'une RT-PCR classique, est fondé sur le désir de réaliser un suivi de l'expression de l'ARNm dans différentes circonstances:

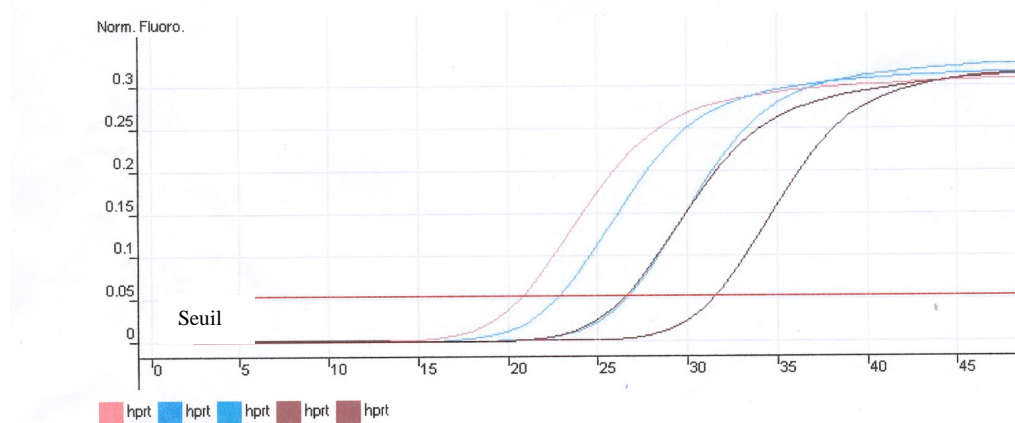
1. Il serait intéressant de savoir si le gène de EFHC1 est transcrit durant la vie fœtale ou si cet ARNm est produit uniquement après la naissance, ce qui pourrait être mis en relation avec l'âge d'apparition des manifestations de la JME. La PCR quantitative est un outil qui permet de déterminer le stade du développement embryonnaire à partir duquel apparaît le transcrit, et de suivre d'éventuelles variations de la quantité d'ARNm durant le développement.
2. La détermination de la quantité du transcrit de EFHC1 endogène dans les HEK-293 et les Neuro2A, est une indication intéressante. En effet, ces deux lignées cellulaires seront utilisées comme modèle pour la technologie de l'ARNi. Le dosage en temps réel du transcrit de EFHC1 dans les Neuro2A transfectées de façon transitoire avec le plasmide pRed (codant pour les siRNA), pourrait constituer une approche qui permettrait de juger de façon objective de son inhibition. En effet, l'éventuelle diminution de la fluorescence que l'on pourrait observer en immunocytochimie, si les siRNA sont efficaces, ne constituera qu'une observation subjective. Cela ne permettra en rien de fournir une interprétation aussi graduée que dans le cas des PCR quantitatives.
3. La mesure de la concentration d'ARNm de EFHC1 sur des cultures cellulaires d'âges différents permettra de déterminer si ces acides ribonucléiques varient en fonction du temps. Des cultures primaires provenant de la souris, ainsi que des lignées établies de souris et d'homme seront testées, afin de détecter d'éventuelles variations quantitatives d'une espèce à l'autre (tableau 5).

**Tableau 5:** Types cellulaires et lignées investigués par PCR quantitative pour l'expression de EFHC1.

	Origine histologique	Espèce
Neuro2A	Cellules de neuroblastome	souris
HEK-293	"Human embryonic kidney"	humain
Cellules Hippocampiques Après 8 jours in vitro	Hippocampe	souris
Cellules Hippocampiques Après 18 jours in vitro	Hippocampe	souris
Cellules souches neuronales	Cellules du striatum prélevées chez des embryons de 16 jours	souris

## 2.1. Interprétation des données:

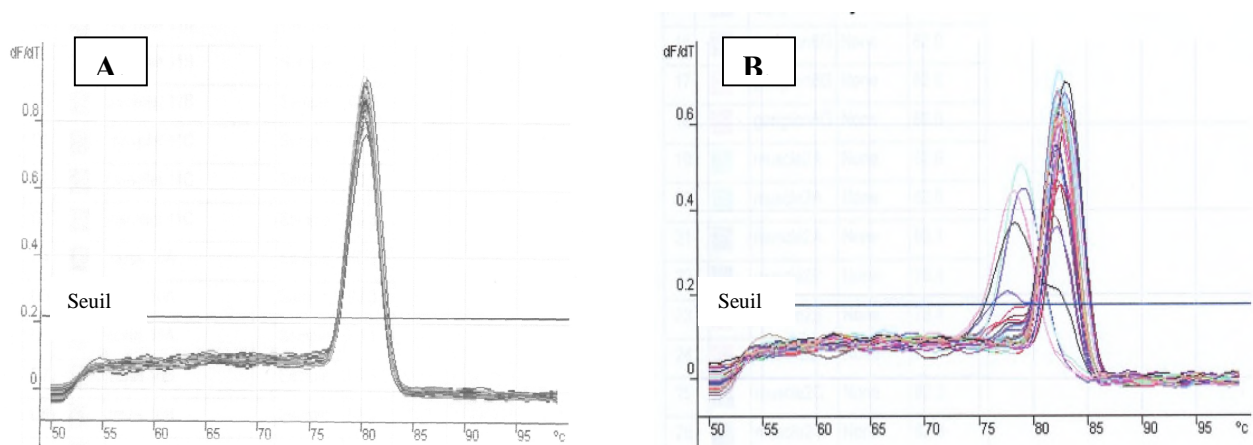
L'analyse de la PCR quantitative en temps réel utilise la notion de Ct qui correspond à la valeur à laquelle la ligne de base croise la courbe d'amplification, c'est à dire, au moment, exprimé en nombre de cycles, auquel le signal est détecté, juste au-dessus du bruit de fond et en phase exponentielle (fig.22). Plus le nombre de molécules d'ADN complémentaire est élevé, plus le Ct est rapidement atteint.



**Figure 22:** Graphique représentant la fluorescence en fonction du nombre de cycles.

L'établissement d'un seuil minimal de fluorescence, permet de déterminer le Ct.

La détermination de la ligne de base peut être réalisée automatiquement par le programme utilisé (ROTOR gene 4.6 RG3000). Le programme recherche l'endroit sur le graphique où la ligne de base donne une valeur estimée optimale pour chaque concentration donnée de la courbe. Basée sur les standards qui ont été définis, cette fonction passe en revue toutes les valeurs possibles de la ligne de base pour obtenir la meilleure correspondance avec les valeurs de la courbe standard. La courbe de dénaturation permet de s'assurer de la spécificité des résultats obtenus suite à la PCR. Pour réaliser cette courbe, la température est augmentée lentement, de 65°C à 95°C. A basse température, tous les produits de PCR sont sous la forme double brins et la fluorescence est élevée. A la température de dénaturation, les produits d'amplification sont dénaturés, ce qui entraîne une diminution rapide de la fluorescence qui est mesurée en continu. On porte sur le graphique la dérivée première des courbes de fluorescence en fonction de la température, ce qui donne des pics aux  $T_m$  respectifs des produits obtenus dans les échantillons (fig.23A.). L'apparition de pics à différentes températures est la résultante de la présence de dimères d'amorces ou de produits PCR non spécifiques (fig.23B.).

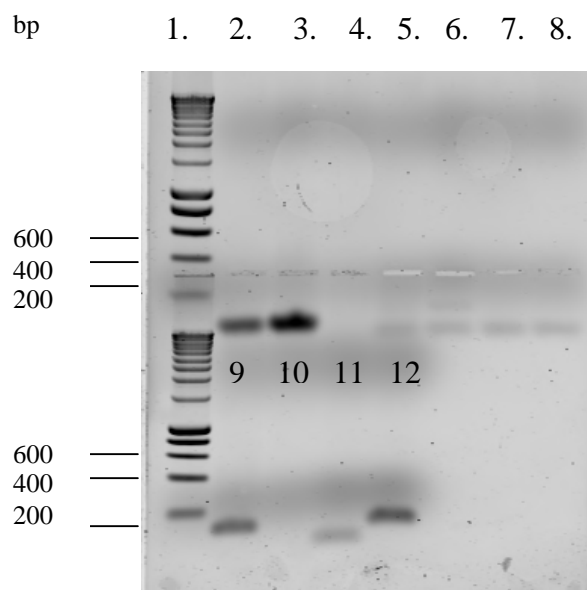


**Figure 23:** Courbe de dénaturation,  $dF/dT$  en fonction de la température (°C). **A.**

Présence d'un pic unique à la température de dénaturation attendue. **B.** Présence de pics à une température de fusion inférieure à celle du produit de PCR attendu.



Les produits de l'amplification peuvent être déposés sur un gel d'agarose afin de vérifier que la taille du fragment d'ADN amplifié correspond à celle attendue; cela permet de visualiser la présence de dimères d'amorces (fig.24).



**Figure 24:** Analyse sur gel d'électrophorèse des produits de PCRq obtenus dans des échantillons contenant: 1. Smart Ladder, 2.  $10^7$  copies/ $\mu$ l de «plasmide JME», 3.  $10^8$  copies/ $\mu$ l de «plasmide JME», 4. l'eau, 5. et 6. 3  $\mu$ l d'ADNc de cortex de souris, 7. et 8. 3  $\mu$ l d'ADNc de cervelet de souris, 9.  $10^7$  copies/ $\mu$ l de «plasmide JME», 10. l'eau, 11. 3 $\mu$ l d'ADNc de LN18 (dimères de primers), 12. 3 $\mu$ l d'ADNc de foie de souris.

Le caractère qualitatif des résultats est, grâce à la mise en œuvre d'une PCR quantitative en temps réel, enrichi d'une valeur chiffrée. En effet, les résultats obtenus peuvent être exprimés en unités arbitraires. A la suite du calcul du rapport entre le résultat du gène cible (EFHC1) et le résultat obtenu pour l'«housekeeping gene» (HPRT), on parlera de quantification relative. Une seconde façon de présenter les concentrations trouvées est de les exprimer en nombre de copies par quantité d'ARN, ou encore par masse de tissu.

## 2.2.Choix du standard externe:

Au vu de la reproductibilité, de la haute sensibilité et du large rang dynamique de la PCR quantitative, il convient d'utiliser un standard externe approprié. En effet, pour obtenir des résultats significatifs, il est nécessaire de contrôler diverses variables, telles que la quantité de matériel de départ, la formation de l'ADNc par la transcriptase inverse ou de l'absence de dégradation de l'ARN pendant la synthèse de l'ADNc. Pour cela il faut normaliser les conditions d'extraction de l'ARNm, la quantité d'ARN pour la RT-PCR.... Un contrôle externe efficace permet de diminuer les erreurs dues à des variables aléatoires. Seul un gène exprimé ubiquitairement (housekeeping gene) et ne présentant pas de variations d'un tissu à l'autre ou au cours des traitements expérimentaux, peut servir de contrôle externe.

Le standard externe utilisé est l'hypoxantine phosphoribosyl transférase (HPRT), protéine intervenant dans la synthèse des purines et dont le gène se situe en Xq26. La présence de pseudogènes de HPRT a rendu l'élaboration des amorces plus délicate. Nous avons utilisé celles décrites par J.Vandesompele {33}, qui n'amplifient aucun produit des pseudogènes.

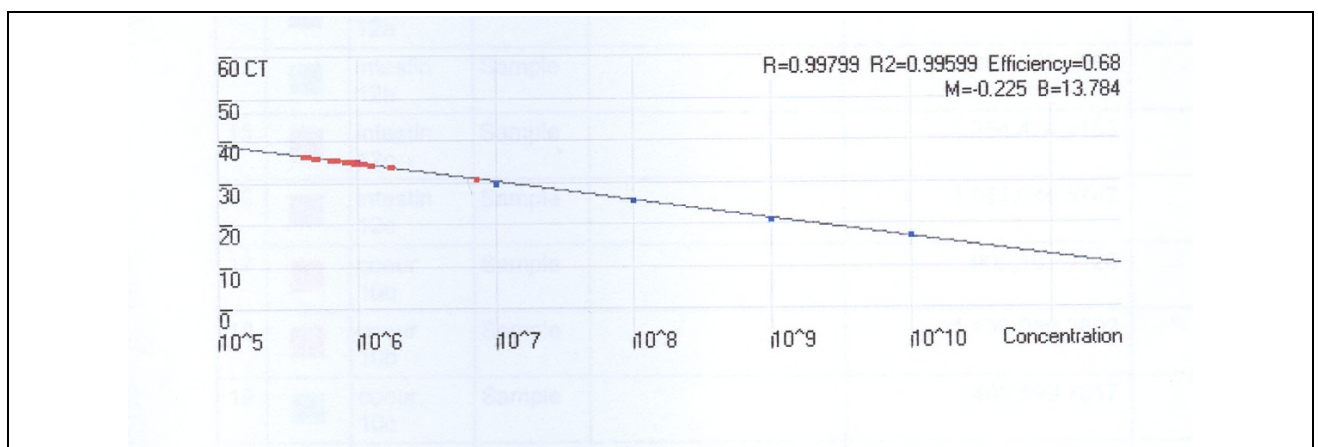
### 2.3. Quantification de l'ARNm:

Pour s'assurer que les résultats obtenus ne sont pas surestimés par une amplification inappropriée de l'ADN génomique, deux mesures sont prises:

- 1) un traitement à la DNase des extraits d'ARN totaux,
- 2) un choix d'amorces qui chevauchent deux exons. Leurs séquences sont donc complémentaires à l'ADNc et non pas à l'ADN génomique.

Afin de quantifier le nombre de copies d'ARNm, nous avons établi une courbe standard pour chaque transcrite.

Les courbes standards (fig.25) ont été réalisées grâce à la PCR effectuée sur un plasmide contenant le fragment d' HPRT qui va être amplifié à des concentrations de  $10^8$  à  $10^1$  copies/ $\mu$ l ou sur un plasmide contenant la séquence EFHC1 qui, lui, sera amplifiée à des concentrations allant de  $4,6 \cdot 10^{10}$  à  $10^3$  copies/ $\mu$ l. La construction de ces deux plasmides comprend la réalisation d'une PCR sur les ADNc murins d'HPRT et d'EFHC1 puis leur ligation dans le vecteur PCR II Topo, à l'aide du kit Topo TA cloning (Invitrogen) et enfin leur extraction par midipréparation.

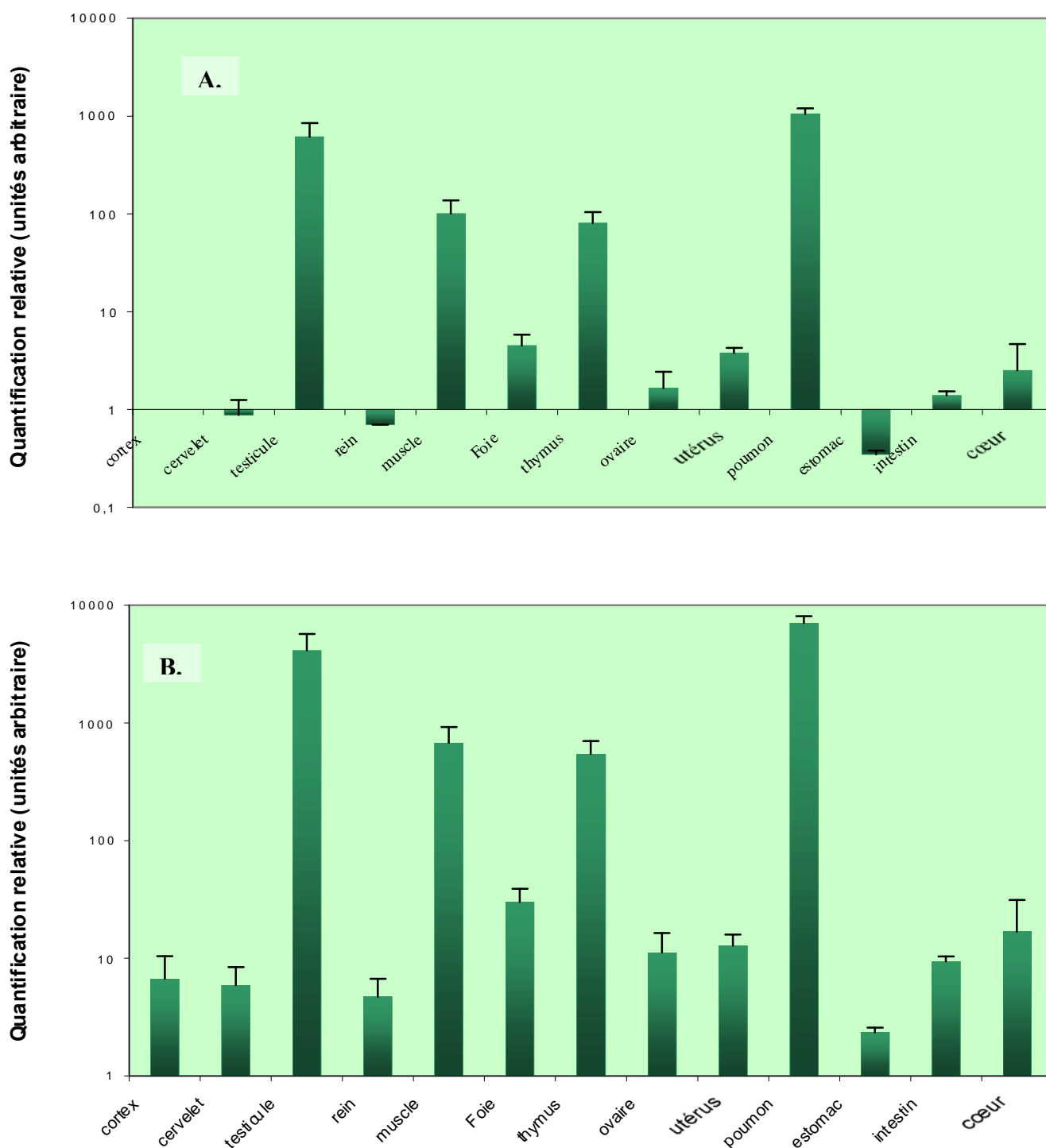


**Figure 25:** Courbe standard établie pour la quantification de l'expression de l'ARNm de l'«housekeeping gene» HPRT. Le point d'intersection entre la ligne de base et la courbe d'amplification, exprimé en nombre de cycles (Ct) est porté en fonction du nombre de copies d'ARNm de EFHC1 contenues dans chaque échantillon (concentration).

### 2.4. Distribution tissulaire de l'ARNm de EFHC1 chez la souris:

Les expériences de quantification de l'ARNm de EFHC1 par RT-PCR quantitative au sein de différents organes de souris montrent que ce transcrite est présent dans tous les organes testés. Les résultats sont présentés à la figure 26.A et exprimés par le rapport du nombre de copies du transcrite de EFHC1 sur le nombre de copies du transcrite de HPRT pour chaque organe étudié. C'est dans le poumon et le testicule que le nombre de copies d'ARNm est le plus élevé. Le transcrite est également fortement exprimé dans le thymus et le muscle. Par contre, l'expression de l'ARNm de EFHC1 est comparable dans le cortex, le cervelet, le rein, l'ovaire, l'utérus, l'estomac, l'intestin et le cœur.

Etant donné la relation entre EFHC1 et la JME, nous avons voulu comparer l'expression du transcrite de EFHC1 dans les organes étudiés en fonction du cortex cérébral (fig.26B.). Les expériences ont été réalisées sur les organes de trois, quatre ou cinq souris différentes (=n) et répétées trois fois. Nous avons observé, par rapport au cortex cérébral, une expression plus élevée extrêmement significative dans l'estomac et le poumon ( $p < 0,001$ ); très significative dans le testicule, le muscle, l'intestin et le thymus ( $p$  compris entre 0,01 et 0,001); et significative dans le foie et l'utérus ( $p$  compris entre 0,05 et 0,01). Il n'y a pas de différence significative d'expression de l'ARNm d'EFHC1 entre le cœur, le rein, l'ovaire et le cortex cérébral.

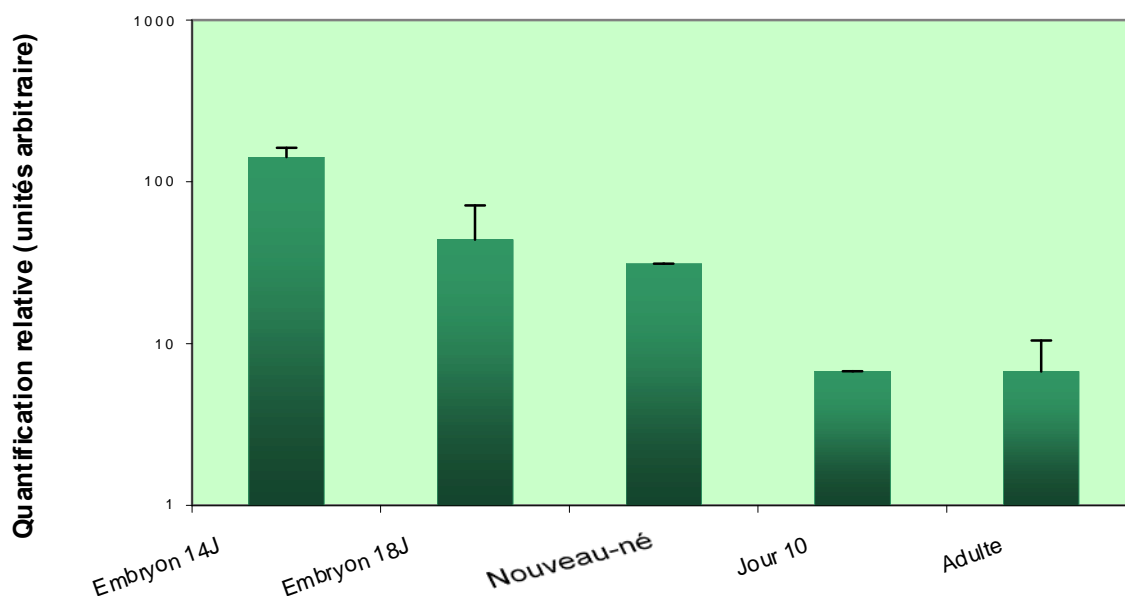


**Figure 26:** Quantité relative du transcrite de EFHC1 exprimé dans différents organes de souris NMRI. **A.** Rapport du nombre de copies détectées d'ARNm de EFHC1 sur le nombre de copies détectées de l'ARNm d'HPRT dans les organes étudiés. **B.** Valeurs rapportées en fonction du rapport obtenu pour le cortex cérébral: dans le cortex (n=5), le cervelet (n=3), le testicule (n=3), le rein (n=3), le muscle (n=3), le foie (n=3), le thymus (n=3), l'ovaire (n=3), l'utérus (n=3), le poumon (n=3), l'estomac (n=4), l'intestin (n=3) et le cœur (n=3).

La distribution tissulaire, quelle que peu surprenante de l'ARNm de EFHC1, nous a incité à consulter la littérature traitant de l'amplification de transcrits de gènes exprimés dans le cerveau et suspectés d'être impliqués dans une forme d'épilepsie. Un exemple intéressant est celui de la protéine Fsg1 homologue murin de BRD2 (Bromodomain 2) {12}. En effet, BRD2 qui est suspecté d'intervenir dans l'épilepsie myoclonique juvénile (introduction 1.6), est exprimé ubiquitairement (dont le cerveau) à des niveaux faibles et de façon beaucoup plus élevée dans le testicule et l'ovaire. Un autre cas rencontré est celui du gène C6orf33 qui code pour la protéine LMPB1 (lysosomal membrane protein in brain 1) {13}. La distribution tissulaire de l'ARNm de ce gène a été étudiée par Northern blot et montre qu'il est exprimé spécifiquement dans le cerveau et le testicule. Bien que localisé dans la région EJM1, les études menées jusqu'à présent ne montrent aucune évidence de l'implication de C6orf33 dans l'étiologie de la JME.

## **2.5.Evolution de l'expression de l'ARNm au cours du développement:**

Nous désirions examiner si l'ARNm de EFHC1 était déjà exprimé dans le cortex cérébral de l'embryon de souris et dans le cas d'une réponse positive, connaître son évolution au cours du développement. Dans ce but, les ARNs totaux du cortex cérébral de deux embryons de 14 jours, de deux embryons de 18 jours, d'un nouveau-né et d'un souriceau de 10 jours ont été extraits. Après la réaction de transcription inverse, la quantification par PCR en temps réel du transcrit de EFHC1 a été réalisée de façon similaire à celle utilisée lors de l'étude de la distribution tissulaire. Comme on peut le constater sur la figure 27, l'expression la plus élevée de l'ARNm de EFHC1 est rencontrée chez l'embryon de 14 jours. On observe une diminution progressive de la concentration de ce transcrit jusqu'au 10<sup>ème</sup> jour qui suit la naissance. La quantité détectée chez l'adulte est proche de celle du souriceau de 10 jours. Il semble que la diminution de l'expression de EFHC1 se soit arrêtée. Ce serait donc dans les phases les plus précoces de l'embryogenèse que le transcrit du gène EFHC1 est exprimé le plus fortement dans le cerveau de souris. Nous pouvons donc penser que cette protéine pourrait être impliquée dans le développement embryonnaire. Les mutations de ce gène pourraient avoir des répercussions sur l'embryogenèse cérébrale et interviendraient éventuellement, à ce stade, dans la genèse de la JME. Toutefois, nous ne savons pas comment cet ARNm est traduit à ces différents âges. A ce stade, il serait intéressant d'étudier l'expression du transcrit à des phases plus précoces de l'embryogenèse. Si ce profil d'expression se confirme chez l'homme et s'il est corrélé à la production de la protéine, l'âge précoce des premiers symptômes de JME pourrait éventuellement être mis en rapport avec ces données.

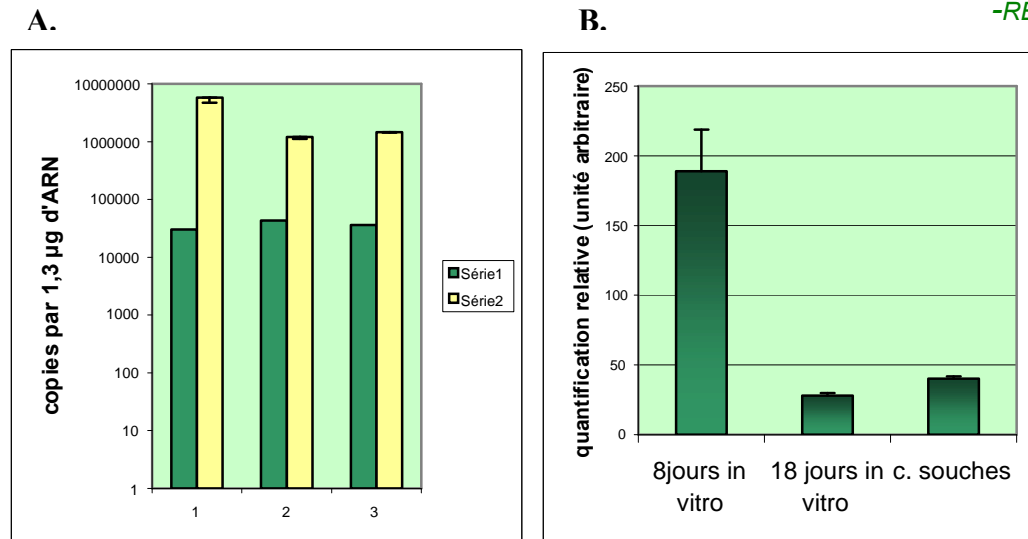


**Figure 27:** Quantité relative d'ARNm codant EFHC1 exprimé dans le cortex de souris NMRI d'âge différent: embryon de 14 jours: n=2, embryon de 18 jours: n=2, nouveau-né (jour de la naissance): n=1, souriceau de 5 jours: n=1, souriceau de 10 jours: n=1, souris adulte: n=5

Une étude préliminaire, qui consiste à déterminer si la quantité d'ARNm de EFHC1 varie en fonction du temps, a également été entreprise sur des cultures primaires de neurones d'hippocampes réalisées à partir d'embryons de souris de 16 jours. Les résultats obtenus doivent être envisagés à titre indicatif, étant donné qu'ils résultent d'expériences conduites avec un n=1. Toutefois, celles-ci ont été répétées deux fois. Des cellules souches neuronales de souris ont été investiguées en parallèle. Les résultats sont présentés figure 28. La quantification en temps réel du transcrite de EFHC1 sur des neurones d'hippocampes 8 et 18 jours *in vitro*, montre une diminution en fonction de l'âge de la culture.

A notre connaissance, le choix de HPRT comme standard externe était le plus propice à la réalisation de la distribution du transcrite de EFHC1 au cours du développement. De plus, nos résultats montrent que la variation de l'expression de l'ARNm de HPRT dans les différentes conditions testées est limitée (figure 28a). Afin de compléter l'étude, nous pourrions également étudier l'expression de transcrits d'autres "housekeeping gene" {34}.

Lorsque nous appliquons le rapport copies de EFHC1 sur copies de HPRT, la quantité d'ARNm de EFHC1 est approximativement 7 fois supérieure dans les neurones d'hippocampes après 8 jours de culture *in vitro*, par rapport à une culture plus âgée de 10 jours (fig.28B.). Dans les cellules neuronales souches on détecte 1449849 copies d'EFHC1 par 1,3µg d'ARN initial (fig.28A.) Il est nécessaire d'augmenter l'effectif afin d'exclure les erreurs expérimentales possibles et de confirmer les valeurs obtenues. La reproduction de résultats similaires sur des cultures d'hippocampes en fonction de l'âge permettrait d'envisager que la quantité d'ARNm de EFHC1 diminue avec le développement et la maturation. Ceci serait en accord avec les résultats obtenus sur les cerveaux des embryons et des souriceaux. Il est difficile d'interpréter les données obtenues pour les cellules souches nerveuses puisqu'il s'agit d'une valeur unique.



**Figure 28:** Analyse de l'évolution au cours du temps de l'ARNm de EFHC1. A. Quantification absolue: nombre de copies du transcrite de HPRT (série 1) et de EFHC1 (série 2) pour 1,3 µg d'ARN initial. 1. cellules d'hippocampes après 8 jours *in vitro*, 2. cellules d'hippocampes après 18 jours *in vitro*, 3. cellules souches nerveuses. B. Quantité relative d'ARNm codant EFHC1 exprimé dans des cellules d'hippocampes après 8 jours *in vitro*, des cellules d'hippocampes après 18 jours *in vitro* et des cellules souches nerveuses.

## 2.6. Quantification de l'ARNm de EFHC1 dans les lignées cellulaires HEK-293 et Neuro2A:

Le second objectif de ce travail consiste à développer des modèles de déficience en EFHC1, notamment en utilisant la technologie des siRNA. Une possibilité de vérifier l'efficacité des siRNA testés consiste à doser les quantités de transcrits exprimés dans les cellules transfectées. Nous prévoyons d'expérimenter les siRNA dans les lignées cellulaires HEK-293 et Neuro2A. L'expression de l'ARNm de EFHC1 présent de façon endogène dans ces lignées cellulaires a donc été quantifiée par RT-PCR en temps réel. La valeur obtenue pour le rapport EFHC1 sur HPRT est de 7,8 pour les Neuro2A et de 0,005 pour les HEK. Cette dernière valeur est très faible, à la limite de la détection, ce qui semble corrélér avec les résultats obtenus par RT-PCR classique. Rappelons qu'en effet, seule une faible amplification a pu être obtenue après 40 cycles de polymérisation sur cette lignée cellulaire. Ces données constituent une indication très importante pour la mise en œuvre de la technologie de l'interférence à l'ARN, dont l'objectif est de diminuer spécifiquement la quantité de ce transcrite.

### **3.siRNA:**

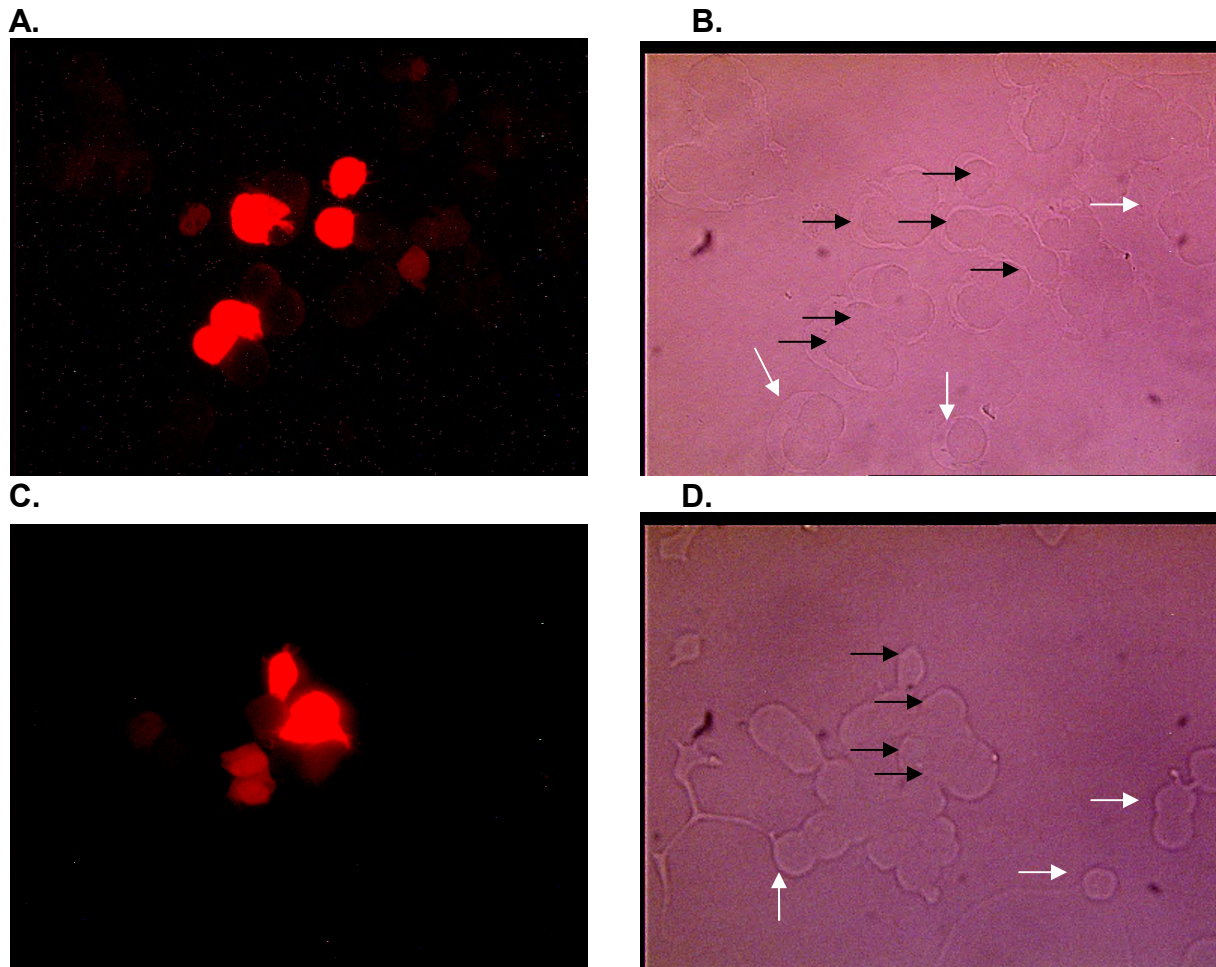
La conception de lignées cellulaires n'exprimant plus (ou seulement faiblement) la protéine EFHC1, a pour objectif d'étudier leurs propriétés, afin d'obtenir une piste de réflexion quant au rôle possible de EFHC1. Ces lignées cellulaires permettraient également de vérifier la spécificité des anticorps polyclonaux dirigés contre cette protéine. Comme nous l'avons signalé, l'utilisation des siRNA présente plusieurs avantages par rapport aux autres approches. Tout d'abord, ils sont généralement plus efficaces et à plus faible concentration que les ARNs antisens. D'autre part, on peut les faire produire par les cellules au départ d'un plasmide. Ceci offre la possibilité de développer, à terme, des lignées dépourvues de façon stable de EFHC1, uniquement si cette protéine n'est pas indispensable à la survie des cellules. Une première tentative au moyen d'un plasmide pAVU6+27 codant des siRNA dirigés contre EFHC1, a été réalisée précédemment au sein du laboratoire et s'est avérée inefficace (B.Lakaye, communication personnelle). C'est la raison pour laquelle les recherches ont d'abord consisté en une comparaison des deux approches possibles tendant à éteindre l'expression d'un gène: transfection de ou de duplex d'ARN.

#### **3.1.Comparaison de l'efficacité du plasmide pRed et des duplex d'ARN dirigés contre l'EGFP:**

Pour ce faire, nous avons ciblé le gène rapporteur EGFP, ce qui facilite considérablement l'analyse des résultats. La séquence de l'ARNm ciblée est identique pour le plasmide et pour les duplex.

Lorsque nous avons reçu le plasmide pRed, un oligonucléotide générant un siRNA dirigé contre l'ARNm de EGFP était inséré en aval du promoteur H1. L'efficacité de pRed fut testée en transfectant des cellules HEK-293 ainsi que des Neuro2A (fig.29). Pour optimiser les conditions de transfection des HEK-293 et des Neuro2A, les méthodes au phosphate de calcium et au Fugen furent comparées. Différents temps, ainsi que plusieurs volumes de Fugen, furent testés. Les taux de transfection ont pu être établis par la détection de la fluorescence rouge de la protéine HcRed 1 au microscope confocal à fluorescence. En revanche, cette même détection par les lasers du cytomètre à flux se montra infructueuse, empêchant donc l'analyse des cellules transfectées. En effet, le cytomètre possède un premier laser émettant à 488nm, et le second à 647nm, ce qui est incompatible avec le spectre d'excitation de HcRed1 ( $618 \pm 4$  nm).

Les taux les plus élevés de cellules HEK-293 transfectées, de 50 à 60 %, sont obtenus par co-précipitation au phosphate de calcium 48h après transfection, alors que la technique du Fugen donnait un pourcentage inférieur à 10%. Pour les Neuro2A, c'est la méthode au Fugen qui est la plus concluante, avec des rapports de cellules transfectées allant de 40 à 50 % 24h après transfection.



**Figure 29:** Visualisation par microscopie à fluorescence (A. et C.) ou par microscopie visible (B. et D.) de cellules Neuro2A après transfection par le plasmide pRed. Agrandissement 50×. Les flèches blanches indiquent des cellules n'ayant pas incorporé pRed et les noires celles qui l'ont intégré.

Une première démarche fut de co-transfecter les HEK-293 par les plasmides pEGFP et pRed, en augmentant la concentration de ce dernier. Des co-transfections furent également réalisées sur les mêmes cellules avec le plasmide pEGFP et les duplex d'ARN. Dans ce cas, seule une concentration de 100nM en duplex a été testée.

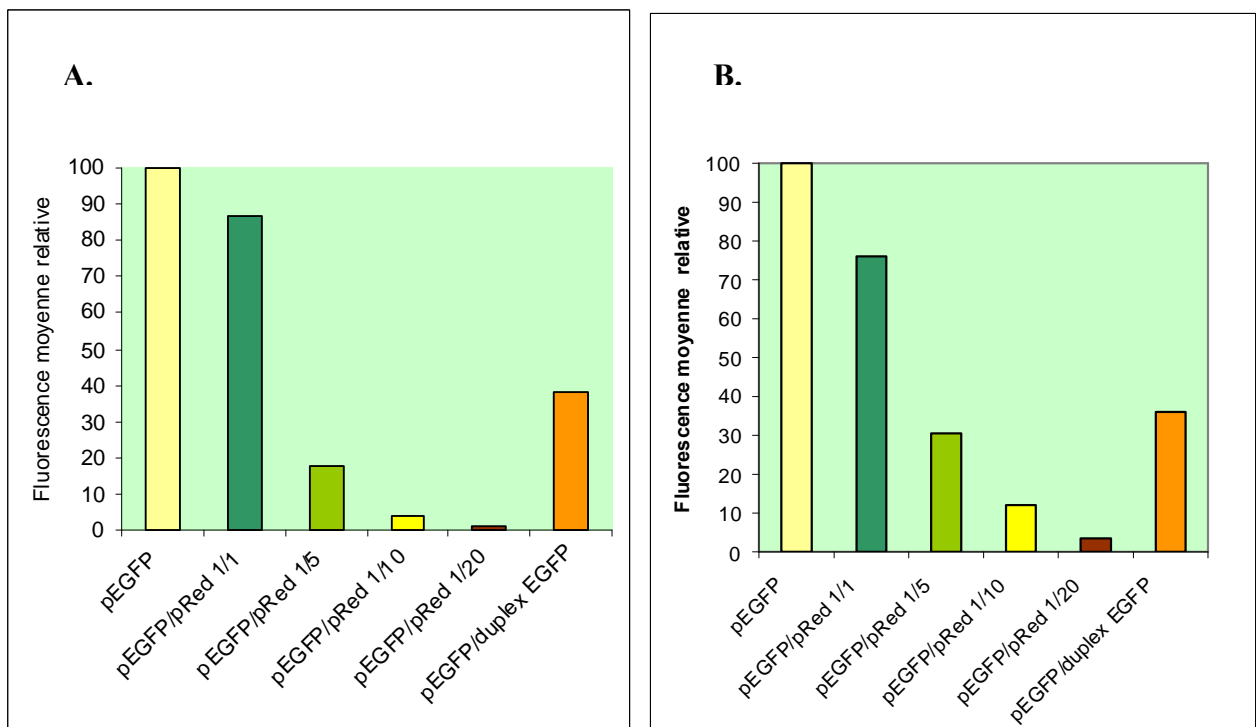
Une seconde démarche consista à transfecter le plasmide pRed (2 concentrations testées) ou le duplex d'ARN dans trois clones exprimant de façon stable la protéine EGFP. Le degré d'expression protéique à «éteindre» peut influencer l'efficacité des siRNA: c'est pourquoi des transfections furent réalisées sur trois clones présentant une intensité de fluorescence moyenne exprimée en unités arbitraires de fluorescence (clone 1, UFA: 150), élevée (clone 2, UAF:200) ou faible (clone 3:50).



Comme on peut le voir sur les figures 30A et B, d'une façon générale, l'intensité de fluorescence de EGFP diminue légèrement plus après 24h qu'après 48h. Cette observation peut s'expliquer par le fait que les cellules continuent à se diviser alors que le plasmide et les duplex ne se répliquent pas.

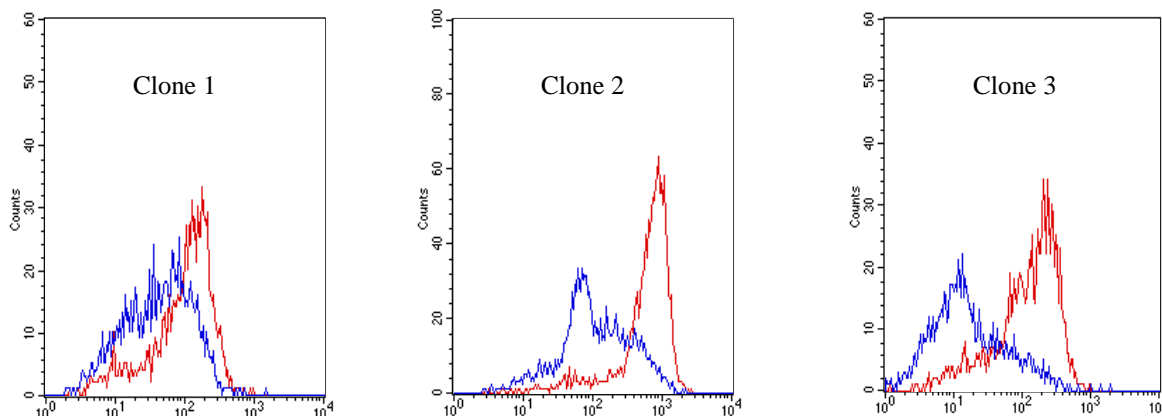
On peut également observer que la diminution de la fluorescence est proportionnelle à l'augmentation de la concentration du plasmide pRed.

A première vue, on peut conclure que le plasmide est plus efficace que le duplex puisqu'à un rapport pEGFP/pRed de 1/20, condition couramment citée dans la littérature, l'inhibition de la fluorescence est presque complète.

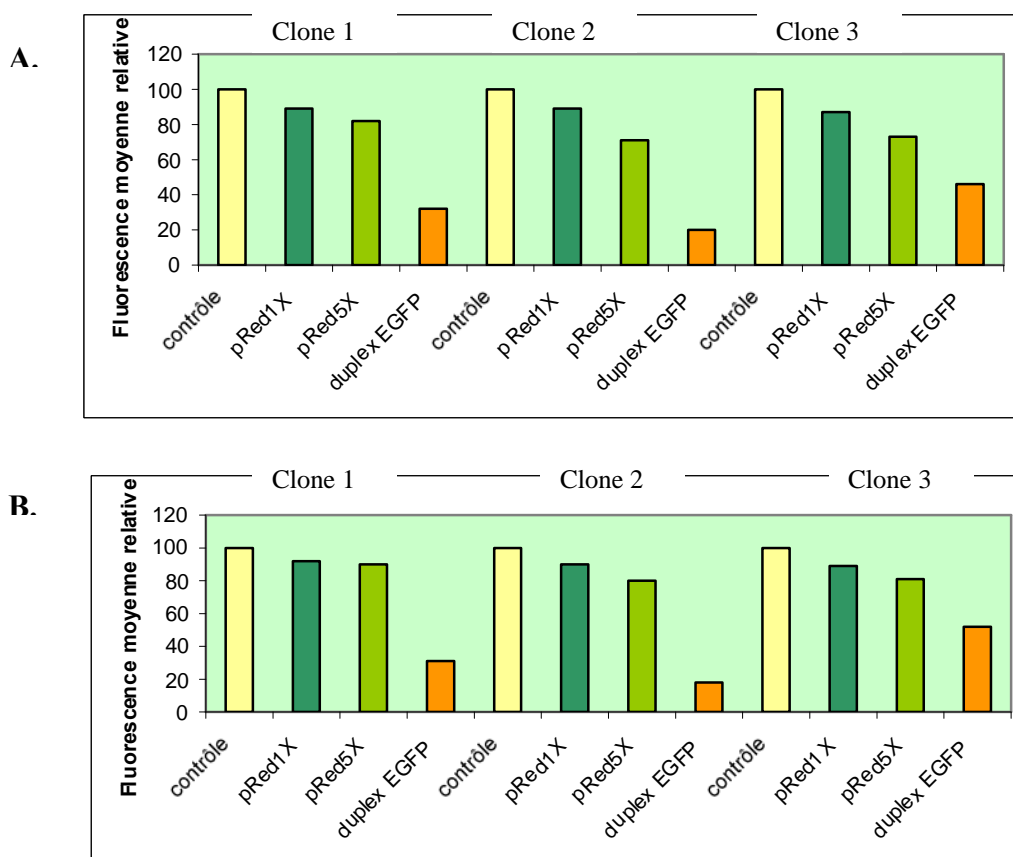


**Figure 30:** Fluorescence moyenne relative de cellules HEK-293 après co-transfection par des plasmides pEGFP et pRed à des concentrations croissantes, ou du duplex d'ARN dirigé contre EGFP. **A.** Fluorescence détectée 24h après la transfection, **B.** Fluorescence détectée 48h après la transfection (n=2 pour chaque condition).

L'analyse des résultats obtenus avec les clones transfectés de façon stable montre par contre que le duplex d'ARN inhibe mieux l'expression de l'EGFP quel que soit le temps ou le clone considéré (fig.31 et 32), ce qui paraît surprenant au vu des résultats précédents.

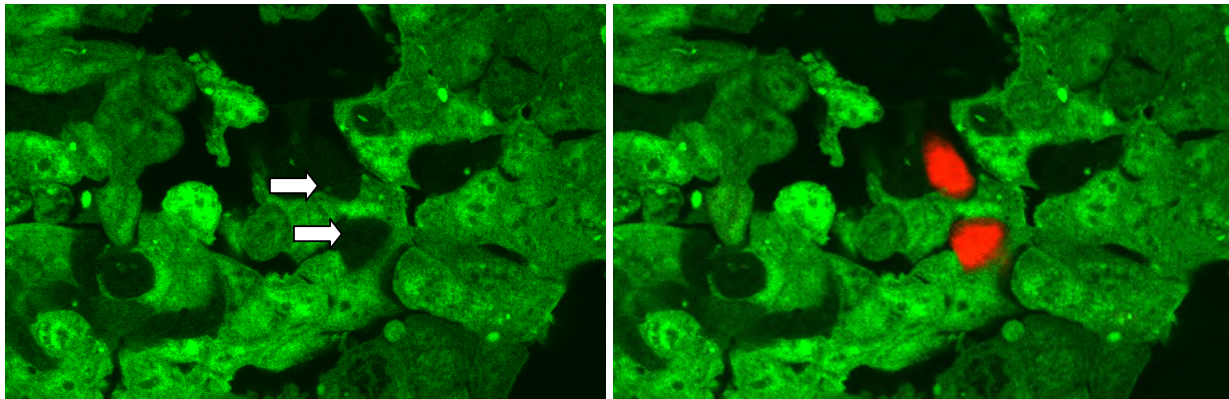


**Figure 31:** Fluorescence moyenne relative détectée par cytométrie en flux, des clones transfectés de façon stable. En rouge contrôle, en bleu: après transfection par le duplex d'ARN dirigé contre EGFP.



**Figure 32:** Fluorescence moyenne relative des clones HEK-293 exprimant l'EGFP de façon stable, après transfection du plasmide pRed à deux concentrations (1× et 5×), ou du duplex d'ARN dirigé contre l'EGFP. **A.** 24h après transfection, **B.** 48h après transfection (n=3 pour chaque condition et chaque clone).

Toutefois, l'analyse en microscopie par fluorescence des clones transfectés par pRed montre que peu de cellules expriment la protéine rouge HcRed1 (fig.33). Dans ces conditions, il n'est pas possible d'obtenir des degrés élevés d'inhibition sur l'ensemble de la population cellulaire. Par contre, lorsque le plasmide est présent dans une cellule, il y a bien diminution de la fluorescence de l'EGFP, ce qui démontre que le plasmide est «actif».



*Figure 33:* Visualisation par microscopie confocale de l'expression de l'EGFP (A.) ou de l'EGFP et de HcRed1 (B.). Les flèches indiquent les cellules dans lesquelles il y a une disparition de la fluorescence de l'EGFP. Grossissement 50x.

### 3.2.Construction d'un plasmide codant des siRNA dirigés contre EFHC1:

Etant donné les résultats encourageants obtenus quant à l'inhibition médiée par le plasmide pRed, nous avons entrepris de modifier ce plasmide dans le but obtenir l'inhibition de l'ARNm de EFHC1.

#### 3.2.1.Conception des siRNA:

Sayda M. Elbashir a établi toute une série de recommandations en vue de synthétiser les siRNA {25}. Par exemple, elle conseille de:

- sélectionner une région de l'ARN ciblé possédant la séquence suivante;

ARNm cible:	<b>AA</b>	<b>N 19</b>	<b>UU</b>
si ce n'est pas possible:			
ARNm cible:	<b>NA</b>	<b>N 19</b>	<b>NN</b>

- choisir un segment de l'ARNm possédant une proportion de 50% (30 à 70%) de guanines et de cytosines et pas davantage, car elles ont tendance à participer à la formation de structures quaternaires;

- désigner des oligonucléotides possédant 2 bases en 3' non appariées qui sont favorables à la reconstitution du complexe d'inhibition;

- ne pas sélectionner les introns en tant que séquences cibles, puisqu'ils sont épissés dans le noyau;

- vérifier que la séquence ciblée ne correspond qu'à un seul gène;

- éviter de cibler les régions 5' et 3' non traduites car elles interagissent avec de nombreuses protéines régulatrices, ce qui interfère avec la liaison de RISC à l'ARNm. Il est préférable de se concentrer sur des régions proches de l'ATG. Toutefois, de nombreux exemples ont, depuis,

montré que les régions situées vers la fin ou même en aval de la séquence codante, peuvent aussi bien convenir;

- produire plusieurs siRNA de séquences différentes pour vérifier leur efficacité et leur spécificité.

Toutes les recherches nécessaires à la synthèse d'amorces, au «design» de sondes ou d'oligonucléotides pour les siRNA, ont été réalisées à partir des sites <http://design.dharmacon.com>, <http://quiagen.com> et <http://WWW.ambion.com>.

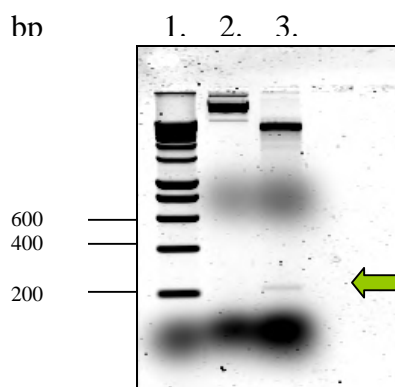
Chaque oligonucléotide comprend de 5' en 3', la séquence sens de 19 nucléotides issue de EFHC1, une séquence de jonction de 9 nucléotides qui formera une boucle, la séquence anti-sens de 19 nucléotides, puis un signal de terminaison de transcription de cinq thymidines. Les deux séquences ciblées sont issues du gène de EFHC1 de souris et ont respectivement un et deux nucléotides différents de la séquence humaine.

Le choix de synthétiser directement deux jeux de siRNA résulte du fait que la probabilité d'inhiber l'expression du gène au départ d'un seul siRNA est faible, comme en atteste la littérature.

### 3.2.2.Constructions:

La stratégie employée consiste à insérer les oligonucléotides dans le plasmide pH1 en aval du promoteur H1, à la place de la séquence d'espacement. Ensuite, une digestion *Bam*HI *Hind*III permettra d'isoler le promoteur suivi de la séquence générant les siRNA, et le tout sera cloné dans le plasmide pRed.

Le plasmide pH1 a tout d'abord été digéré par *Xba*I. Après s'être assuré de la linéarisation, il a ensuite été digéré par *Pst*I pour éliminer la séquence d'espacement de 200 bp (fig.34).

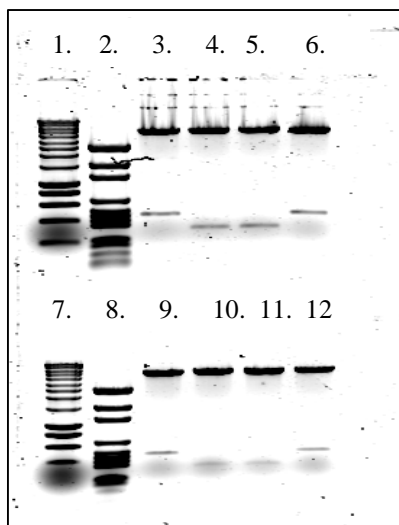


**Figure 34:** Analyse sur gel d'électrophorèse de la digestion du plasmide pH1. De gauche à droite:

1. marqueur de poids moléculaire, 2. plasmide pH1 non digéré, 3. plasmide pH1 digéré par *Pst*I et *Xba*I.

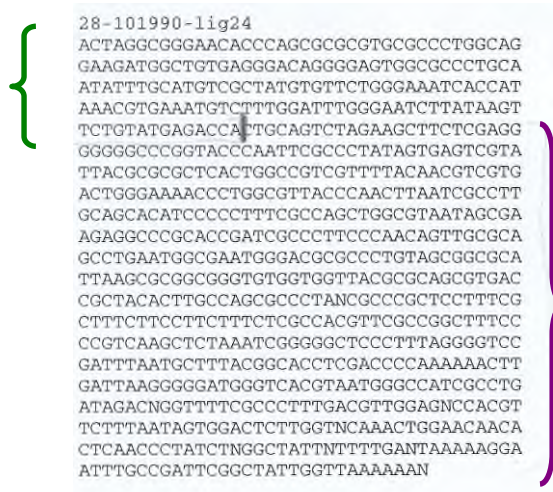
Le plasmide a ensuite été purifié sur gel puis une ligature avec les oligonucléotides double brin a été réalisée. Après transformation, de nombreux clones résistants à l'ampicilline ont été analysés par digestion à l'aide des enzymes *Bam*HI et *Hind*III. Malheureusement, à chaque fois, un seul fragment de  $\pm 450$  bp correspondant au promoteur H1 suivi de la séquence d'espacement a été libéré.

Diverses conditions de digestion et de ligature ont alors été testées. Ceci nous a permis d'obtenir, après analyse d'une centaine de minipréparations, 4 clones porteurs d'un fragment d'environ 350pb compatible avec le remplacement du «stuffer» par les oligonucléotides (fig.35).



**Figure 35:** Analyse sur gel d'électrophorèse des digestions du plasmide pH1 après ligature avec les oligonucléotides double brin générant les siRNA et purification par minipréparation. 1. et 7.: «Smart Ladder», 2. et 8.: «Low DNA Smart Ladder», 3., 6., 9. et 12.: fragment libéré de  $\pm 450$ bp. 4., 5., 10. et 11.: fragment libéré de  $\pm 350$ bp.

Malheureusement, après séquençage, il s'est avéré que ces 4 clones correspondaient à des plasmides sans insert (fig.36). Les raisons de ces échecs ne nous sont pas connues mais pourraient être dues à des erreurs introduites fortuitement lors de la synthèse des oligonucléotides au niveau des extrémités assurant l'insertion dans le plasmide. Pour des raisons de temps, nous avons décidé de nous orienter vers l'utilisation de duplex dirigés contre EFHC1.

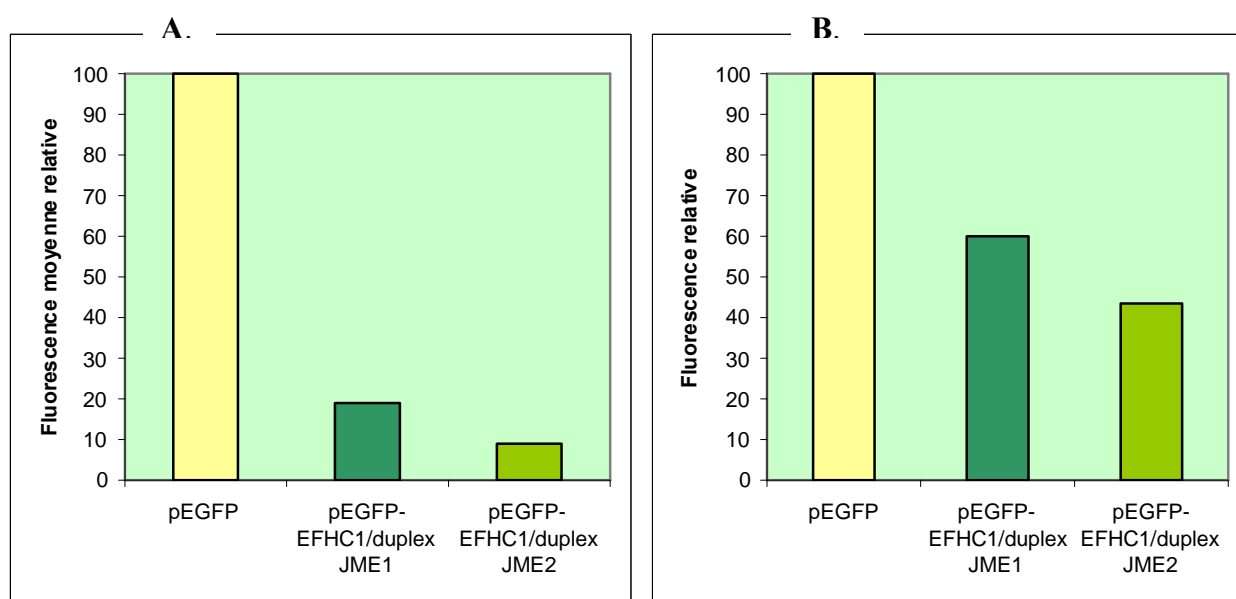


**Figure 36:** Résultat du séquençage: l'accolade verte correspond à la séquence du promoteur H1 et la mauve, au début du plasmide pH1. Aucun insert n'a été introduit dans le plasmide.

### 3.3. Inhibition de l'ARNm de EFHC1 par l'intermédiaire de duplex d'ARN:

Etant donné la facilité qu'offre l'analyse des résultats des co-transfections transitoires dans les HEK-293, ces expériences furent réitérées ici en utilisant le plasmide pEGFP-EFHC1 et le duplex dirigé contre l'ARNm de EFHC1. Deux duplex dénommés JME1 et JME2, dirigés contre le transcrite de EFHC1 de souris, ont été sélectionnés. Le premier présente un nucléotide, distinct de la séquence cible portée par le plasmide EGFP-EFHC1 alors que le second lui est parfaitement complémentaire.

Une diminution très significative de la fluorescence verte provenant de la protéine fusion GFP-EFHC1 fut observée après 24h (fig.37 A.). L'inhibition médiée par les duplex est toujours visible après 48h (fig.37.B.) mais est nettement moindre. Cette constatation est similaire aux exemples précédents. Il apparaît que le duplex JME2 est plus efficace que le premier, ce qui peut s'expliquer par sa meilleure complémentarité avec le transcrite du gène EFHC1. La fluorescence moyenne observée 24h après transfection avec le duplex JME2 est diminuée de 91% par rapport au contrôle. On est très proche d'une inhibition totale de l'expression.



**Figure 37:** Fluorescence des cellules HEK-293 24h (A.) ou 48h (B.) après transfection du plasmide pEGFP-EFHC1 et des duplex d'ARN JME1 ou JME2 (n=3 pour chaque condition).

Ces résultats encourageants nous ont incité à développer un modèle d'inhibition de l'ARNm de EFHC1 sur les Neuro2A. Cette lignée cellulaire provient de neuroblastomes murins et semble plus propice à l'étude de la fonction d'une protéine, suspectée d'être impliquée dans une forme d'épilepsie. La réalisation de Western blot et de marquages immunocytochimiques sur les Neuro2A est un préalable indispensable pour avoir un premier aperçu de l'expression endogène de EFHC1.

Deux anticorps polyclonaux de lapin dirigés contre EFHC1 ont été produits par la firme Eurogentec. Tous deux sont dirigés contre des épitopes différents de la protéine (fig.38). Le premier (ep021061) est susceptible de reconnaître les deux formes de la protéine pouvant être exprimée chez l'homme (voir fig.5) car il est dirigé contre leur partie amino-terminale commune. Le second (ep02106262) est dirigé contre un épitope spécifique de la forme longue de la protéine EFHC1. Rappelons que des recherches, à l'aide du programme BLAST, n'ont pas mis en évidence la présence de la forme courte du transcrite de EFHC1 chez la souris.

La validation de la spécificité antigénique de ces deux anticorps a été réalisée dans notre laboratoire par Western Blot sur des extraits protéiques de bactéries surproduisant EFHC1. Les deux anticorps reconnaissent la protéine d'intérêt, toutefois, ep021061 semble avoir une affinité plus marquée pour son épitope.

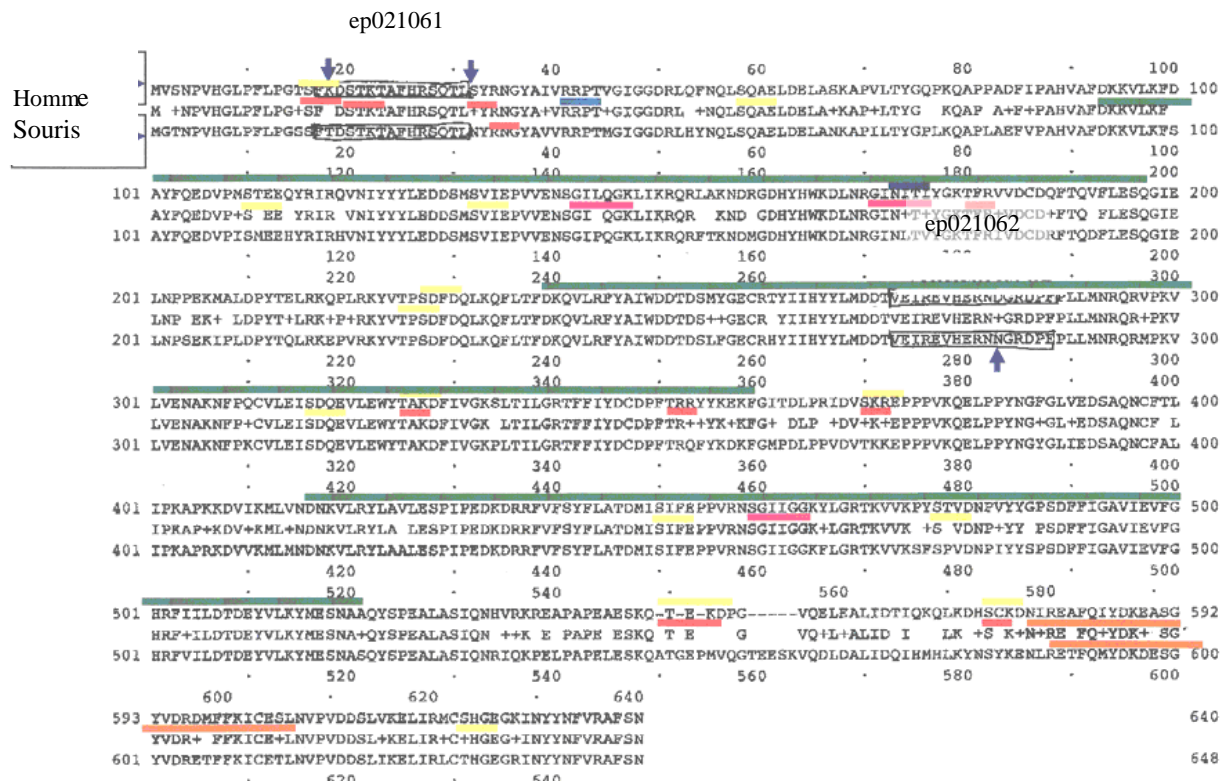


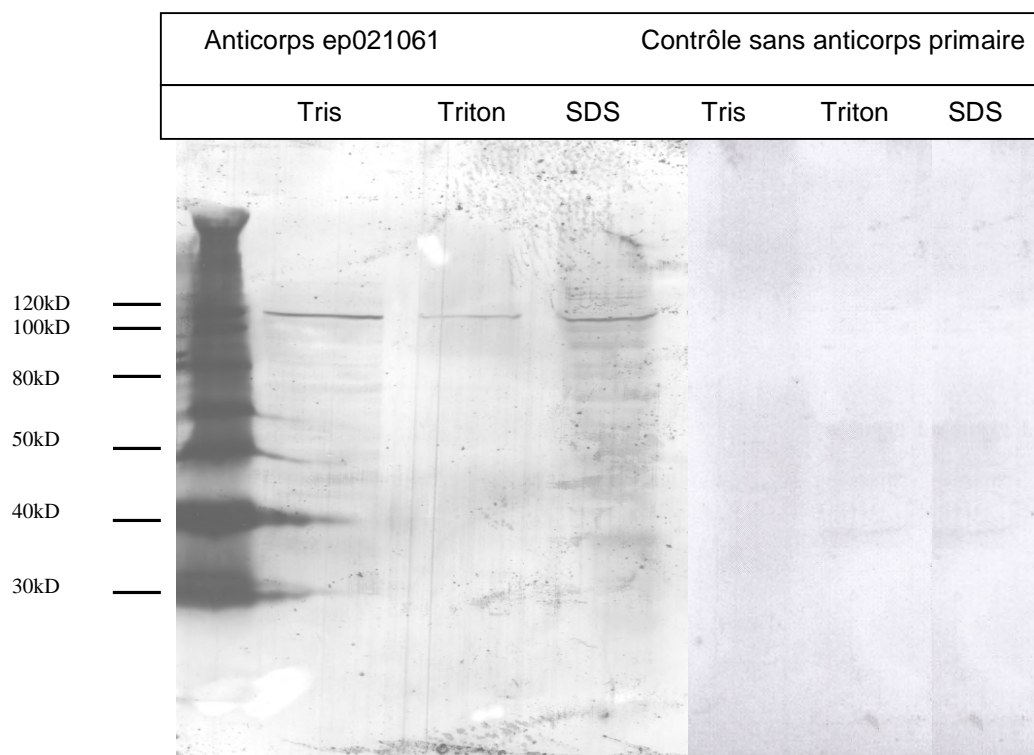
Figure 38: Aligment des séquences peptidiques, humaine et murine, de EFHC1. La position des épitopes qui ont servi pour la génération des anticorps ep021061 et ep021062 est indiquée par des flèches bleues. En vert, domaine DM10, en rose, site potentiel de myristoylation, en bleu, site potentiel de phosphorylation par la PKA, en orange, domaine EF-hand, en rouge, site potentiel de phosphorylation par la PKC, en indigo, site de glycosylation et en jaune, site potentiel de phosphorylation par CK2.

### 3.3.1. Western blot:

Nous avons réalisé une extraction différentielle de protéines des cellules Neuro2A, en les fractionnant en protéines solubles dans une solution saline (Tris), dans un détergent non ionique (TritonX-100) et dans un détergent ionique (SDS). Après ajustement des concentrations en protéines, les trois extraits ont été analysés par Western Blot à l'aide de l'anticorps ep021061 (fig.39). Les conditions de blocage de la membrane et les dilutions de l'anticorps primaire et secondaire ont été préalablement déterminées. Ainsi, la membrane a été bloquée avec du lait 5%, l'anticorps primaire a été dilué 200 fois et le secondaire 500 fois. Nous observons, dans les trois extraits, une bande protéique aux environs de 100kDa (analyse du gel réalisée par le programme Image Master 1D Elite 3.01, Pharmacia). La bande présente dans les extraits réalisés dans le Tris paraît moins intense. La piste correspondant à l'extrait SDS comporte plusieurs autres bandes de très faible intensité.

Le poids moléculaire calculé pour la protéine EFHC1 se situe aux alentours de 70kDa. Etant donné l'intensité de la bande d'environ 100kDa présente dans les trois fractions protéiques réalisées à partir de Neuro2A, on peut supposer qu'il s'agit de EFHC1. La différence de poids observée peut être due à d'éventuelles modifications post-traductionnelles. La localisation subcellulaire de EFHC1 n'est pas encore connue avec précision mais les résultats des Western blot réalisés sur les Neuro2A, semblent indiquer que cette protéine présente une solubilité dans les trois conditions testées et pourrait avoir une distribution assez large au sein de la cellule.

Ces résultats laissent présumer de la production endogène de la protéine EFHC1 dans les Neuro2A.

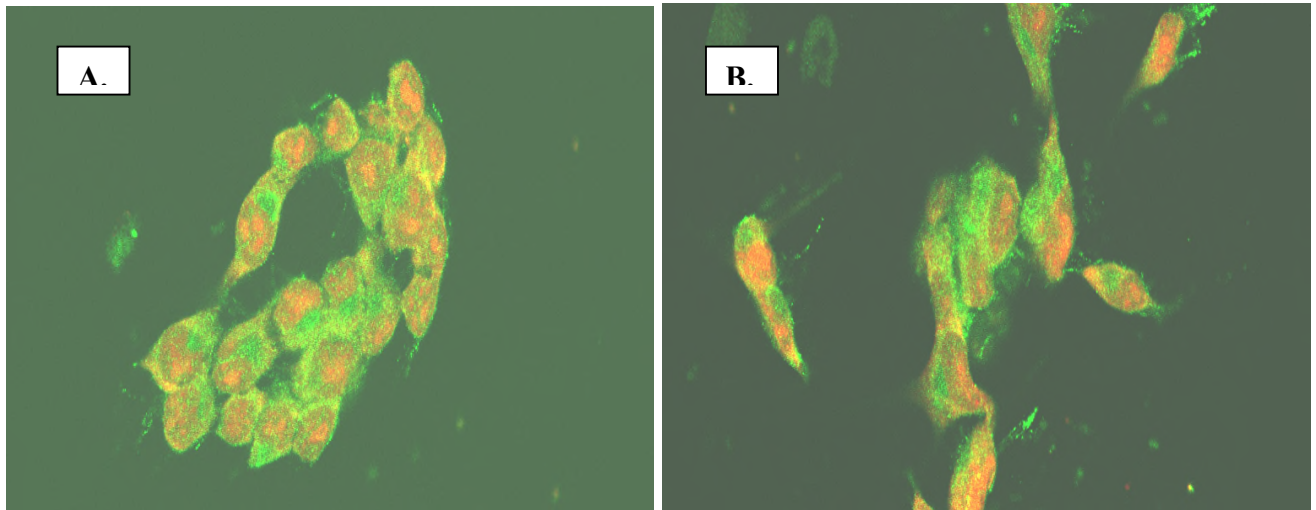


**Figure39:** Western blot réalisé sur des extraits protéiques issus des cellules Neuro2A. Anticorps primaire polyclonal ep021061 anti-EFHC1 produit chez le lapin (1/200). Anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline (1/500).  
Piste Tris: protéines solubles dans une solution saline (tampon Tris).  
Piste Triton: protéines solubles dans une solution avec un détergent non ionique (Triton X100).  
Piste SDS: protéines solubles dans une solution avec un détergent ionique (SDS).  
La position des standard de poids moléculaire est indiquée à gauche.

### 3.3.2. Immunocytochimie:

L'application de l'anticorps ep021061 sur les Neuro2A a fourni des résultats positifs en immunomarquage, observés au microscope confocal à fluorescence (fig.40), ce qui permet de penser qu'il y a bien une production endogène de EFHC1 dans ces cellules. Toutefois, la spécificité de ce marquage reste à démontrer. La distribution de la protéine EFHC1 présente un aspect réticulé et sa localisation semble être essentiellement cytoplasmique. Une certaine quantité de cette protéine pourrait être exprimée au niveau du noyau, ce qui concorde avec les résultats obtenus en Western blot.

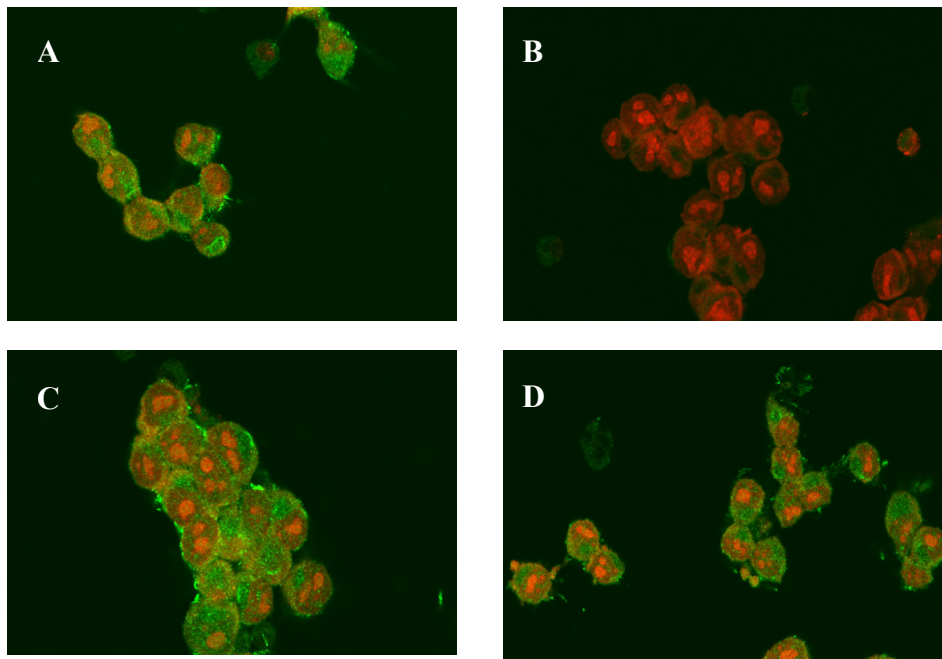




**Figure 40:** Immunomarquage à l'aide de l'anticorps anti-EFHC1 ep021061 dans les cellules Neuro2A (en vert). En rouge: marquage des noyaux par l'éthidium homodimère 1 (20 $\mu$ M). **A.** après 24h. **B.** Après 48h d'adhésion au support. Agrandissement 100x.

### 3.3.3. Transfection des Neuro2A par les duplex d'ARN dirigés contre EFHC1:

Après s'être assuré de la production endogène de EFHC1 par les Neuro2A, l'objectif est d'inhiber spécifiquement le transcrit de cette protéine dans cette lignée cellulaire. La diminution de la fluorescence pour les immunomarquages constituera un argument supplémentaire en faveur de la spécificité des anticorps anti-EFHC1 mais aussi une preuve de l'efficacité des duplex. Ceux-ci ont été transfectés dans les Neuro2A par la méthode au Fugen (voir mise au point des transfection point 2.1.) et les cellules fixées 24 et 48h après transfection. Aucune diminution de l'intensité du marquage par l'anticorps ep021061 (fluorescence) n'a pu être observée par comparaison des cellules transfectées et non transfectées par les duplex (fig.41).

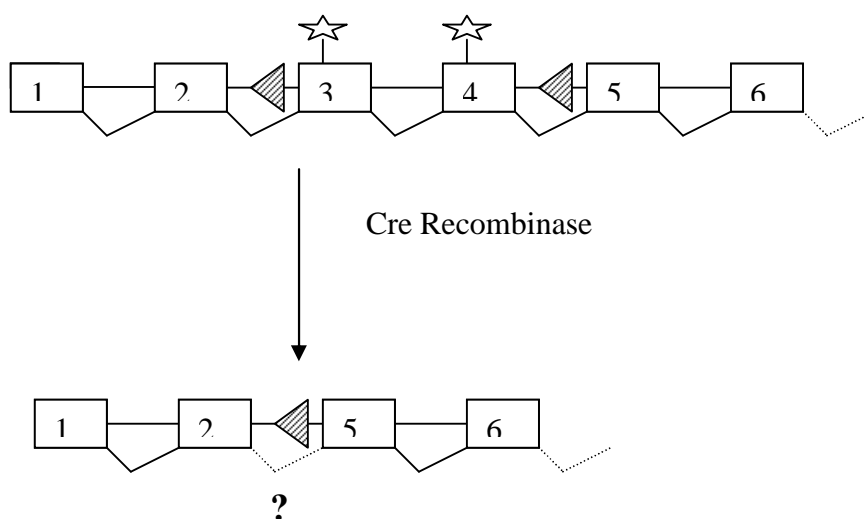


**Figure 41:** Cellules Neuro2A fixées 48h après transfection au Fugen par les duplex dirigés contre l'ARNm de EFHC1. En vert: anticorps secondaire couplé à une protéine émettant dans le vert, et qui reconnaît l'anticorps primaire, produit chez le lapin, spécifique de la protéine EFHC1. En rouge: marquage des acides nucléiques par l'éthidium homodimère 1. A. et B. contrôles négatifs, respectivement sans duplex et sans anticorps primaire. C. transfection par le duplex JME1. D. par le duplex JME2.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette absence d'inhibition: en premier lieu, nous ne disposons d'aucune méthode permettant de nous assurer que la transfection a effectivement fonctionné. D'autre part, il n'est pas possible d'exclure que l'anticorps n'est pas spécifique de la protéine EFHC1. En troisième lieu, il a été démontré dans la littérature que l'inhibition d'un ARNm par le phénomène des siRNA variait d'une lignée cellulaire à l'autre. Un siRNA efficace dans un type cellulaire l'est également dans un autre type, mais, une modulation de l'intensité de l'inhibition est observée {33}. Et enfin, notons qu'il s'agit d'une approche très subjective puisque la détection d'une diminution de la fluorescence est basée sur le jugement de l'observateur.

#### **4.Établissement de lignées cellulaires exprimant une forme tronquée de la protéine EFHC1:**

Un des objectifs du laboratoire consiste à développer une souris «knock in», codant deux des mutations de la protéine EFHC1, rencontrées chez certains patients atteints de JME. Toutefois, comme cette pathologie est polygénique, nous ne sommes pas certains de pouvoir reproduire ce phénotype chez le rongeur. Dès lors, afin de pouvoir étudier le rôle de EFHC1, nous envisageons d'encadrer les exons mutés de sites lox. Ceci permet d'éliminer une partie du gène suite à l'action de la Cre recombinaase (fig.42).



**Figure 42:** Représentation schématique de l'action de la Cre recombinaase sur la construction envisagée pour l'élaboration d'une souris «knock-in». Les sites lox sont stylisés par les triangles hachurés et les deux mutations rencontrées chez certains patients, atteints de JME, par les étoiles.

Nous ne pouvons cependant prédire le déroulement de l'épissage entre les exons 2 et 5 alors côte à côte. Toutefois, s'il se fait correctement, il y aura production d'une protéine excisée car la phase codante des exons deux et cinq est identique.

Il s'avère donc primordial, avant de commencer les constructions génétiques, de savoir si cette forme tronquée de la séquence correspondant aux exons 3 et 4, possède des propriétés différentes de EFHC1.

L'établissement d'une lignée cellulaire exprimant une forme tronquée de la protéine EFHC1 (EFHC1  $\Delta$ exons 3-4) est un premier moyen de répondre à cette question.

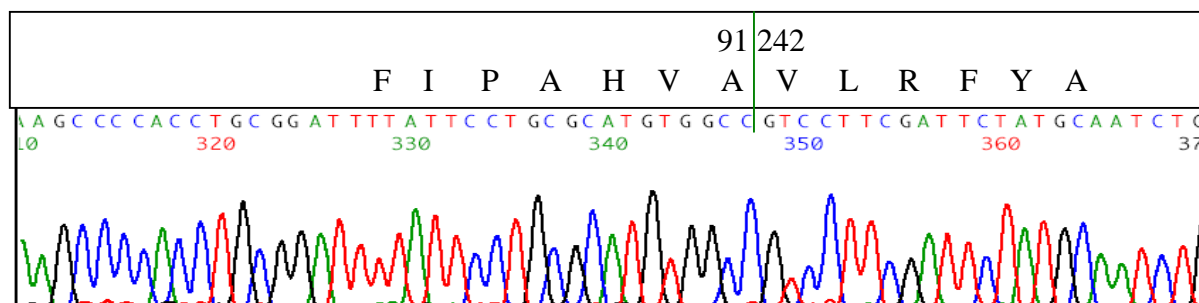
Il sera intéressant de déterminer si des différences de localisation cellulaire ou si des modifications de sa localisation, suite à une augmentation du calcium cytoplasmique, peuvent être mises en évidence entre les lignées cellulaires exprimant la protéine sauvage ou tronquée. En effet, les deux sites de myristoylation perdus pourraient modifier la réponse au calcium, étant donné l'implication de ces sites dans la relocalisation des protéines possédant un domaine EF-hand.

D'autre part, les résultats des expériences menées précédemment par l'équipe du Professeur DELGADO-Escueta, semblent indiquer que les cellules exprimant des formes mutées de EFHC1 présentent, dans les conditions d'apoptose, un comportement différent par rapport à celles exprimant la protéine sauvage (communication personnelle). Des études de mort cellulaire programmée sur les cellules HEK-293 codant pour la forme tronquée de EFHC1 pourraient éventuellement confirmer ces résultats.

## 4.1.Construction:

Dans un premier temps, nous avons voulu amplifier directement par PCR le plasmide excisé des exons 3 et 4 en recourant à la méthode de Wang et Wilkinson {34}. Toutefois, nous n'avons jamais pu isoler de clones positifs au moyen de cette méthode, c'est pourquoi nous avons opté pour une approche séquentielle. Celle-ci consiste à amplifier par PCR deux fragments séparés. Le premier de 382bp va de la fin de la séquence de l'EGFP à la fin de l'exon 2. Le second de 1345 bp va du début de l'exon 5 à la séquence SV40 du plasmide. Après digestion par *Xho*1 et *Eco*R1 respectivement, ils ont été ligaturés simultanément dans le plasmide pEGFP-EFHC1 préalablement digéré par ces deux même enzymes de restriction. Après transformation, plusieurs clones ont été obtenus, mais un seul était porteur d'un plasmide de taille compatible avec l'excision des exons 3 et 4.

Les résultats obtenus à la suite du séquençage furent alignés à ceux de EFHC1. La séquence a bien été excisée des exons 3 et 4, mais également des trois premiers acides aminés de l'exon 5 (fig.43). Le cadre de lecture est donc conservé. On soupçonne les amorces de la PCR d'être à l'origine de cette excision supplémentaire. Ce fut néanmoins cette construction que l'on utilisa pour la transformation cellulaire.



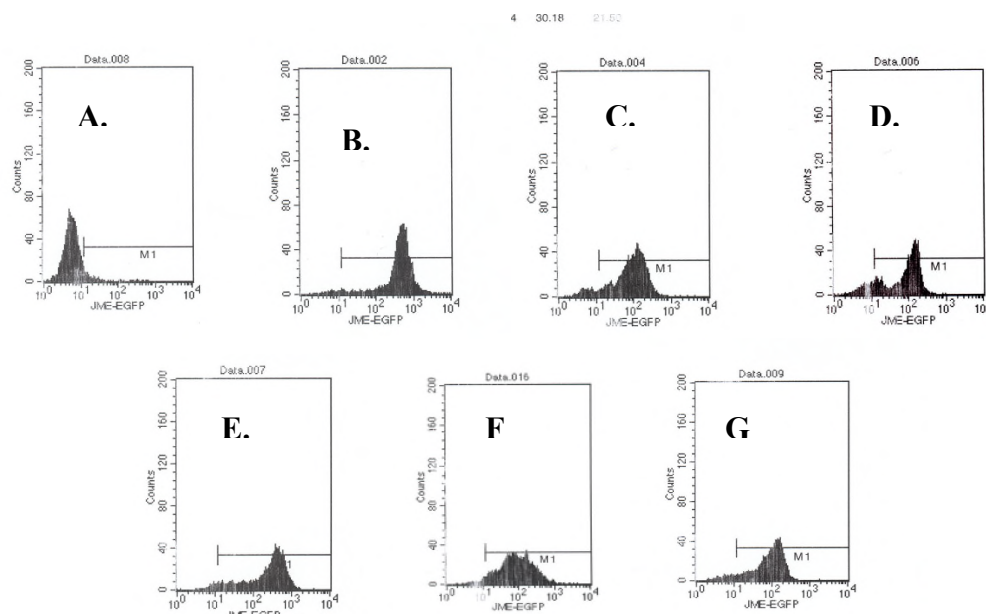
**Figure 43:** Résultat du séquençage du clone ayant intégré le fragment codant EFHC1  $\Delta$  exons 3-4 et traduction de cette séquence. Si l'on se reporte à la figure 36, on peut effectivement constater que l'on a perdu les acides aminés 92 à 241.

## 4.2.Transfection stable:

Malgré des conditions de transfection relativement agressives pour les cellules (transfection par co-précipitation au phosphate de calcium), un nombre très impressionnant de clones se développèrent.

### 4.2.1.Sélection des clones positifs au FACS:

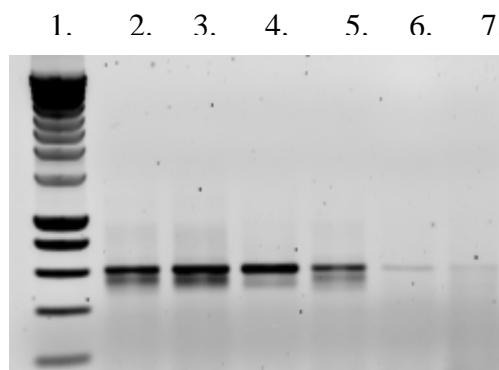
L'intégration du plasmide transfecté dans les chromosomes des cellules HEK-293 est aléatoire, et, seule la détection de la protéine de fusion fluorescente EGFP-EFHC1 indique que la protéine est exprimée. Des clones présentant une intensité de fluorescence nulle peuvent résister à l'agent de sélection dès lors que le gène de résistance est transcrit. Parmi les 200 clones qui se sont développés, 40 furent analysés au FACS, et 6 «positifs» furent retenus (fig.44). Il est nécessaire de fixer un seuil de positivité car les HEK-293 émettent naturellement à la même longueur d'onde que l'EGFP. Il est apparu que l'intensité de la fluorescence est variable d'un clone à l'autre. Pour éviter tout biais dû à une trop grande expression de la protéine fusion, des cellules, présentant une fluorescence élevée, moyenne ou faible, ont été sélectionnées.



**Figure 44:** Analyse en cytométrie en flux des cellules HEK-293 sauvages (A.) ou transfectées de façon stable par le plasmide pEGFH-EFHC1  $\Delta$ exons 3-4 (de B. à G.).

#### 4.2.2. Vérification de l'intégration de la construction:

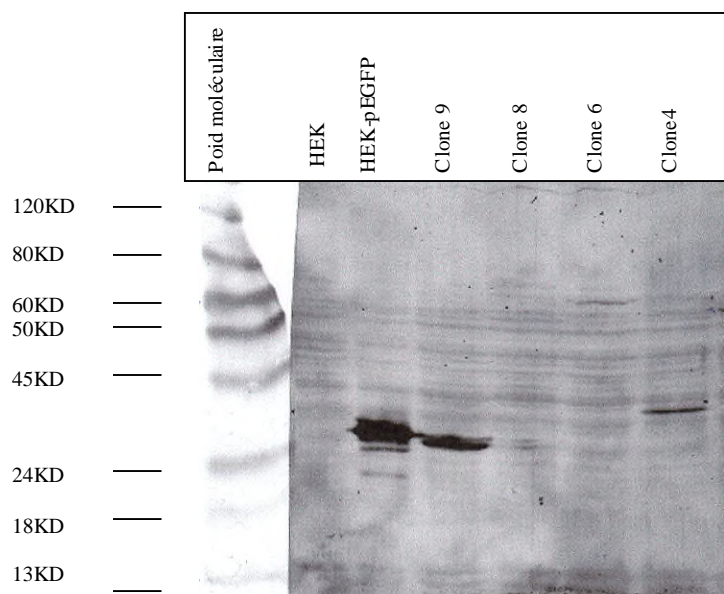
Dans le but de s'assurer que l'ARNm entier de EFHC1 est effectivement produit, une RT-PCR sera réalisée sur les 6 clones positifs. En effet, l'émission de la fluorescence atteste de la traduction de la protéine EGFP mais ne garantit pas qu'il en est de même pour EFHC1. L'amplification d'un fragment de 600pb au moyen des amorces SV40 reverse et JME2 forward permet de vérifier que la partie terminale de la séquence codant EFHC1 n'est pas perdue lors de l'insertion du plasmide dans le génome de la cellule. Le choix de l'amorce SV40 permet de s'assurer que l'ADN génomique correspondant au gène EFHC1 n'est pas amplifié. Toutefois, quatre des 6 clones montrèrent une amplification à la taille attendue (fig.45).



**Figure 45:** Analyse par RT-PCR de l'expression de l'ARNm codant l'EGFP-EFHC1  $\Delta$ exons 3-4 chez les transfectants stables: 1. «Smart Ladder», 2. clone 1, 3. clone 2, 4. clone 3, 5. clone 4, 6. clone 5, 7. clone 6.

Une seconde PCR fut réalisée sur ces 4 clones, de manière à amplifier l'ensemble (2kb) de la séquence codant la protéine fusion (amorces SV40 reverse et EGFP1 forward). Tous les clones furent positifs. La réalisation sur ces 4 clones de Western blot, en utilisant un anticorps anti-EGFP, est également un contrôle nécessaire. De façon très surprenante, aucune bande ne put être mise en évidence à la taille attendue (85kDa) (fig.46). De nombreuses bandes non spécifiques apparaissent aussi bien dans les HEK-293 sauvages qu'après transfection par le plasmide pEGFP seul, ou dans lequel a été introduit la construction. Le clone 9 présente une bande spécifique à 30kDa, ce qui correspond au poids moléculaire de la protéine EGFP seule. Les clones 4 et 6 possèdent des bandes spécifiques à des poids moléculaires plus élevés que 30

kDa, ce qui peut signifier qu'une partie de EFHC1 est produite à la suite de EGFP. Aucune bande particulière n'est mise en évidence pour le clone 8.



**Figure 46:** Mise en évidence des fusions EGFP-EFHC1  $\Delta$ exons 3-4 par Western Blot. La révélation est réalisée à l'aide d'un anticorps primaire polyclonal de lapin dirigé contre EGFP et d'un anticorps secondaire polyclonal de chèvre anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline.

Il est difficile d'expliquer pourquoi un ARNm complet semble être présent alors que seuls des fragments de protéines sont mis en évidence. Plusieurs explications peuvent être envisagées: tout d'abord, il est possible que l'ARNm ne soit pas traduit ou alors qu'il y ait des insertions multiples et que la protéine entière soit présente, mais à des concentrations trop faibles que pour être mise en évidence par Western Blot.

De toute évidence, nous ne disposons d'aucun clone qui remplisse les conditions attendues. La réalisation de transfectants stables, en laissant l'intégration se réaliser au hasard dans le génome, semble très peu efficace. Il serait nécessaire, pour trouver un clone produisant de façon importante la construction, d'isoler et de sélectionner au FACS un nombre beaucoup plus élevé de clones, ou d'utiliser une approche différente.

## ***D. Discussion et conclusions:***

Les propriétés de la protéine EFHC1, mutée dans l'épilepsie myoclonique juvénile, ne sont pas connues. Les objectifs de ce travail ont donc consisté à mettre au point des modèles et des pistes de réflexion qui nous permettraient d'entrevoir le rôle de cette nouvelle protéine.

La première étape de cette étude a été de localiser l'expression de l'ARNm de EFHC1. Le transcrite primaire humain de EFHC1 subit un épissage alternatif, ce qui aboutit à la production de deux formes matures d'ARNm: la forme longue A et la forme courte B. L'investigation par RT-PCR d'une série de lignées cellulaires (cellules d'homme, de souris et de rat) a révélé que la forme longue est présente dans toutes les lignées testées. Toutefois, son expression reste très faible dans les HEK-293. Par contre, le transcrite B n'est exprimé dans aucune des lignées étudiées. La distribution tissulaire et la quantification de l'expression de l'ARNm de EFHC1 a été réalisée chez la souris. L'ARNm de EFHC1 est exprimé ubiquitairement; toutefois, les valeurs obtenues pour le poumon, le testicule, le muscle et le thymus sont significativement plus élevées que dans les autres organes étudiés. Ceci laisserait supposer que EFHC1 joue un rôle de base dans la physiologie de la cellule et non pas uniquement dans les neurones. Afin de mieux préciser la distribution cellulaire du transcrite au sein d'un organe donné, il serait utile de réaliser des expériences d'hybridation *in situ*; celles-ci sont actuellement en cours dans le laboratoire.

Existe-t-il une régulation de l'expression du transcrite de EFHC1 au cours du développement ? Nous avons étudié son niveau d'expression, dans le cortex de souris d'embryons de 14 et 18 jours *in utero*, ainsi que chez les nouveau-nés et les souriceaux de 10 jours. Plus élevée chez l'embryon de 14 jours, la quantité d'ARNm de EFHC1 diminue progressivement jusqu'au 10<sup>ème</sup> jour après la naissance, pour atteindre une valeur comparable à celle trouvée dans le cortex de souris adulte. Il semble donc que l'expression de EFHC1 diminue au cours de l'embryogenèse, ainsi qu'au cours des premiers jours de croissance et de développement du souriceau. Cette protéine pourrait tenir un rôle, durant le vie fœtale et les jours qui suivent la naissance, qui serait plus important que celui qu'elle remplirait chez la souris adulte. Cette hypothèse pourrait éventuellement constituer un des facteurs expliquant la survenue précoce des manifestations de la JME. Une seconde possibilité est que le transcrite de EFHC1 est fortement exprimé, mais aussi dégradé, pendant l'embryogenèse et qu'une régulation plus précise n'apparaisse que plus tardivement. Il serait souhaitable de tester systématiquement chaque étape de l'embryogenèse pour déterminer à partir de quel jour *in utero* le transcrite de EFHC1 est exprimé. La même étude doit être entreprise après la naissance pour déterminer l'âge à partir duquel l'expression ne diminue plus et atteint un plateau. Il serait également intéressant de tester des souris âgées pour obtenir un profil complet de l'expression de EFHC1 en fonction de l'âge.

D'autre part, il serait intéressant de réaliser des Western blots sur les extraits protéiques issus des différents organes testés, ainsi que sur les cortex murins au cours de l'embryogenèse. Nous disposerions ainsi d'une indication sur la distribution de la protéine et nous pourrions alors comparer la transcription et la traduction de EFHC1. Une meilleure idée de l'implication réelle de cette protéine à ces différents âges pourrait alors, également, être dégagée.

La seconde étape de ce travail a consisté à développer des modèles cellulaires de déficience en EFHC1. Nous avons comparé deux approches possibles pour la réalisation de l'ARNi: le plasmide ou les duplex. Nous avons pour cela ciblé l'ARNm de la protéine fusion fluorescente EGFP-EFHC1, ce qui nous a permis de juger facilement de l'efficacité de l'inhibition. Au cours des différentes conditions testées, il est apparu, qu'aussi bien le plasmide pRed codant les siRNA que les duplex d'ARN dirigés contre l'EGFP, diminuaient son expression. D'autre part, aucune des deux approches n'apparaissait significativement plus efficace que l'autre. Au vu de ces

résultats, il nous a semblé qu'il était plus intéressant d'utiliser une méthode qui permette de produire des siRNA de façon continue, dans le but de développer des lignées cellulaires appauvries ou dépourvues de EFHC1. Malheureusement, les constructions nécessaires pour disposer d'un plasmide codant des siRNA dirigés contre EFHC1 n'ont pas abouti. Deux duplex dirigés contre l'ARNm de EFHC1 ont été sélectionnés. Tous deux induisent une inhibition significative de la fluorescence de la protéine fusion EGFP-EFHC1 dans les cellules HEK-293. Cependant, le second duplex semble plus efficace que le premier. Nous avons alors voulu transfecter ces duplex dans les Neuro2A. Cette lignée cellulaire est issue de neuroblastomes chez la souris et semble donc constituer un modèle plus approprié à l'étude d'une protéine suspectée d'être impliquée dans une forme d'épilepsie. La protéine EFHC1 endogène a été détectée par RT-PCR quantitative, Western blot et immunocytochimie. Des immunomarquages ont été réalisés sur les cellules Neuro2A transfectées par les deux duplex, mais nous n'avons pas observé de diminution de la fluorescence. Trois hypothèses sont envisageables pour expliquer ces résultats:

- la transfection peut ne pas avoir fonctionné. En effet, nous ne disposons d'aucun moyen de détection des duplex d'ARN et ne pouvons donc pas certifier qu'ils ont été incorporés dans les cellules.
- l'anticorps utilisé n'est pas spécifique de la protéine EFHC1. Si l'anticorps reconnaît une autre protéine, celle-ci n'étant pas influencée par les duplex d'ARN dirigés contre l'EFHC1, la fluorescence dans les cellules Neuro2A traitées ne diminuera pas.
- le mécanisme qui sous-tend l'inhibition de l'ARNm médiée par les duplex est moins performant dans les cellules Neuro2A que dans les HEK-293. En effet, il a été reporté dans la littérature que l'efficacité des siRNA variait selon le type cellulaire.

Pour clarifier la situation, il serait souhaitable de recommencer cette expérience en quantifiant l'ARNm de EFHC1 par RT-PCR en temps réel, puisque nous avons déterminé le niveau d'expression de ce transcrit dans les Neuro2A.

La dernière démarche entreprise dans le but d'acquérir des connaissances sur la fonction de EFHC1 a été de développer des lignées cellulaires exprimant de façon stable la protéine EFHC1, excisée de deux exons. L'étude comparative de la protéine sauvage ou tronquée pourrait fournir des informations sur le rôle de EFHC1. D'autre part, un des objectifs du laboratoire est de développer une souris knock-in, codant deux des mutations rencontrées chez certains patients atteints de JME. Les deux exons, dans lesquels seront introduites ces mutations, seront encadrés par des sites lox. L'action de la recombinaise Cre éliminerait alors ces deux exons. On ignore comment se déroulera l'épissage alternatif après cette excision, c'est pourquoi l'établissement de cette lignée s'avère primordial pour étudier les fonctions de la protéine qui pourrait alors être produite. Aucun clone qui exprime la protéine excisée des deux exons n'a pu être isolé. Il semble indispensable de changer d'approche expérimentale pour obtenir des clones stables ayant intégré toute la construction. Un système utilisant une recombinaise pour intégrer le plasmide, tel que le système «Flp-In» d'Invitrogen, combiné au système inductible à la doxycycline dénommé T-Rex de cette même firme, est une approche envisageable.

Un modèle d'animal transgénique constituerait une source d'informations inestimables dans l'étude fonctionnelle de la protéine EFHC1.



## ***E.Bibliographie:***

1. T. R. Harison, Principe de médecine interne, **13**, 1968-1971, 1992.
2. J. Roger, C. Dravet, M. Bureau, F.E.Dreifuss, P. Wolf, Les syndromes épileptiques de l'enfant et l'adolescent, 223-231, 1984.
3. J. Roger, M. Bureau, C. Dravet, F.E. Dreifuss, A. Perret, P. Wolf, Epileptic syndromes in infancy, **29**, 313-327, 1992.
4. R. Guerrini, J. Aicardi, F. Andermann, M. Hallett, Epilepsy and movement disorders, 190-437, 2002.
5. R. Appleton, J. Gibbs, Epilepsy in childhood and adolescence, 1-35. 1995.
6. M. Durner, M.A. Keddache, L.Tomasini, S. Shinnar, S.R. Resor, J. Cohen, C. Harden, S.L. Moshe, D. Rosenbaum, H. Kang, K. Ballaban-Gil, S. Hertz, D.R. Labar, D. Luciano, S. Wallace, D. Yohai, I. Klotz, E. Dicker, D.A. Greenberg, Genom scan of idiopathic generalized epilepsy: evidence for major susceptibility gene and modifying genes influencing the seizure type, *Annals of neurology*, **49**, 328-335, 2001.
7. K. Haug, M. Warnstedt, A.K. Alekov, T. Sander, A. Ramirez, B. Poser, S.Maljevic, S. Hebeisen, C. Kubisch, J. Rebstock, S. Horvath, K. Hallmann, J.S. Dullinger, B. Rau, F. Haverkamp, S. Beyenburg, H. Schulz, D. Janz, B. Giese, G. Müller-Newen, P. Propping, C.E. Elger, C. Fahlke, H. Lerche, A. Heils, Mutations in CLCN2 encoding a voltage-gated chloride channel are associated with idiopathic generalized epilepsies, *Nature genetics*, **33**, 527-532, 2003.
8. P. Cossette, L. Lui, K. Brisebois, H. Dong, A. Lortie, M. Vanasse, J-M. Saint-Hilaire, L. Carmant, A. Verner, W-Y. Lu, Y.T. Wang, G.A. Rouleau, Mutation of GABRA1 in an autosomal dominant form of juvenile epilepsy, *nature genetics*, **31**, 184-189, 2002.
9. T. Suzuki, R. Morita, Y.Sugimoto, T.Sugawara, D-S. Bai, M.E. Alonso, M.T.Medina, J.N. Bailey, A. Rasmussen, J. Ramos-Peek, S. Cordova, F. Rubio-Donnadieu, A. Ochoa, A. Jara-Prado, J. Inazawa, A.V. Delgado-Escueta, K.Yamakawa, Identification and mutational analysis of candidate genes for juvenile myoclonic epilepsy on 6p11-p12: LRRC1, GCLC, KIAA0057 and CLIC5, *Epilepsy Research* **50**, 265-275, 2002.
10. F.V. Elmslie, M. Rees, M. P. Williamson, M. Kerr, M.J. Kjeldsen, K.A. Pang, A. Sundqvist, M.L. Friis D. Chadwick, A. Richens, A. Covanis, M. Santos, A. Arzimanoglou, C.P. Panayiotopoulos, D. Curtis, W.P. Whitehouse, R.M Gardiner, Genetic mapping of major susceptibility locus for juvenile myoclonic epilepsy on chromosome 15q, *Human Molecular Genetics*, **6**(8), 1329-1334, 1997.
11. M. Durner, T. Sanger, D.A. Greenberg, K. Johnson, G. Beck-Mannagetta, D. Janz, Localisation of idiopathic generalized epilepsy on chromosome 6p in famille of juvenile myoclonic epilepsy patients, *Neurology*, **41**, 1651-1655, 1991.
12. D.K. Pal, O.V. Evgrafov, P. Tabares, F. Zhang, M. Durner, D. A. Greenberg, BRD2 (RING3) is a probable major susceptibility gene for commom juvenile myoclonic epilepsy, *The American Society of Human Genetics* **73**, 261-270, 2003.

13. T. Suzuki, S. Ganesh, K.L. Agarwala, R. Mmorita, Y. Sugimoto, J. Inazawa, A.V. Delgado-Escueta K. Yamakawa, A novel gene in the chromosomal region for juvenile myoclonic epilepsy on 6p12 encodes a brain specific lysosomal membrane protein, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **288**, 626-636. 2001.
14. T. Suzuki, A.V. Delgado-Escueta, M.E. Alonso, R. Morita, M.T. Medina, S. Ganesh, D. Bai, Y. Sugimoto, J.N. Bailey, A. Ochoa, A. Jara-Prado, A. Rasmussen, J. Ramos-Peek, S. Cordova, F. Rubio-Donnadieu, Y. Inoue, M. Osawa, S. Kaneko, H. Oguni, K. Yamakawa, Juvenile myoclonic epilepsy: mutations and variants in a gene that encode a protein with EF-hand.
15. R.D. Burgoyne, J.L. Weiss, The neuronal calcium sensor family of Ca<sup>++</sup> binding proteins, *Biochemistry Journal* **353**, 1-12, 2001.
16. M. Ikura, Calcium binding and conformational reponse in EF-hand proteins, *Elsevier Science* **21**, 14-17, 1996.
17. D.W. O'Callaghan, L. Ivings, J.L. Weiss, M.C. Ashby, A.V. Tepikin, R.D. Burgoyne, Differential use of Myristoyl groups on neuronal calcium senseur proteins as a determinant spatio-temporal aspect of Ca<sup>++</sup> Signal transduction, *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 14227-14237, 2002.
18. R.H. Kretsinger, C.E. Nockolds, Carp muscle calcium binding protein, *Journal of Biological Chemistry* **248**, 3313-3326.
19. Roland Greimers, Méthodes morphométriques, sciences médicales, 2003.
20. André Scheen, Pharmacologie spéciale, sciences médicales, 2003.
21. Vincent Bours, Ingénierie, génétique sciences médicales, 2003.
22. A.M. Celotto, B.R. Graveley, Exon-specific RNAi: A tool for dissecting the fonctional relevance of alternative splicing, *RNA*, **8**, 718-724, 2002.
23. S.M. Elbashir, W. Lendeckel, T. Tuschl, RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs, *Genes & Developpement*, **15**, 188-200, 2001.
24. N.J. Caplen, S. Parrish, F. Imani, A. Fire, R.A. Morgan, Specific inhibition of gene by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate system, *PNAS*, **98**, 9742-9747, 2001.
25. S.M. Elbashir, J. Harborth, K. Weber, T. Tuschl, Analysis of gene fonction in somatic mammalian cells using small interfering RNAs *Methods, Methods*, **26**, 199-213, 2002.
26. Y. Zeng, B.R. Cullen, RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm, *RNA*, **8**, 855-860. 2002.
27. C.P. Paul, P.D. Good, I. Winer, D.R. Engelke, Effective expression of small interfering RNA in human cells, *Nature Biotechnology*, **20**, 505-508. 2002.
28. H. Hasuwa, K. Kaseda T. Einarsdottir, M. Okabe, Small interfering and gene silencing in transgenic mice and rats, *FEBS Letters*, **532**, 227-230, 2002.
29. X-F. Qin, D.S. An, I.S.Y. Chen, D. Baltimore, Inhibition HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5, *PNAS*, **100**(1), 183-188, 2003.

30. N.S. Lee, T. Dohjima, G. Bauer, H. Li, M-J. Li, A.E.P.Salvaterra, J. Rossi, Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 *rev* transcripts in human cells, *Nature Biotechnology*, **19**, 500-505, 2002.
31. W-S. Park, N. Miyano-Kurosaki, M. Hayafune, E. Nakajima, T. Matsuzaki, F. Shimada, H. Takaku, Prevention of HIV-1 infection in human peripheral blood mononuclear cells by specific RNA interference, *Nucleic Acids Research*, **30** (22), 4830-4835, 2002.
32. G. Randall, A. Grakoui, C.M. Rice, Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs, *PNAS*, **100**(1), 235-240, 2003.
33. J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biology*; **3** (7), 2002.
34. O. Thellin, W. Zorzi, B. Lakay, B. De Borman, B. Coumans, G. hennen, T. Grisar, A. Igout, E. Heinen, Housekeeping genes as internal standards: use and limits, *Journal of Biotechnology*, **75**, 291-295, 1999.
35. J. Wang, M.F. Wilkinson, Deletion mutagenesis of large (12 Kb) plasmids by a one-step PCR protocol. *Biotechniques*, **31**, 722-724, 2001.