

Identifiant du gènes potentiellement exprimés par les cellules progénitrices de la muqueuse olfactive par Hybridation In Situ

Renaud Bussiere, Christine Baly

▶ **To cite this version:**

Renaud Bussiere, Christine Baly. Identifiant du gènes potentiellement exprimés par les cellules progénitrices de la muqueuse olfactive par Hybridation In Situ. [0] 2013, pp.36. hal-02805294

HAL Id: hal-02805294
https://hal.inrae.fr/hal-02805294

Submitted on 6 Jun 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Master I Génétique et Physiologie

Identification de gènes potentiellement exprimés par les cellules progénitrices de la muqueuse olfactive par Hybridation In Situ

Présentation du rapport par Renaud Bussiere
le 2 Septembre 2013

Jury D :
Françoise Caira
Laurent Morel
Amalia Trousson

UFR Sciences et Technologies

INRA – Centre de Recherche de Jouy-en-Josas

Unité : Neurobiologie de l'Olfaction et Modélisation en Imagerie

Directrice : Edith Pajot

Equipe : Biologie de l'Olfaction et Biosenseurs

Responsable de Stage : Christine Baly



Remerciements

Tout d’abord je tiens à remercier Edith Pajot, directrice de l’unité NOeMI, pour m’avoir accueilli au sein de son unité.

Je remercie ensuite l’ensemble des membres de de l’équipe BOB pour leur accueil chaleureux et leur gentillesse tout au long de ces deux mois de stage.

Mes remerciements vont plus particulièrement à Christine Baly et Aurélie Dewaele pour leur disponibilité, leur encadrement et leurs conseils, ainsi qu’à Marie-Annick Persuy pour ses conseils et autres précisions théoriques ou techniques.

Je tiens également à remercier Denise Grebert et Régine Monnerie pour leur aide précieuse pour certaines manipulations.

Liste des abréviations utilisées dans le texte :

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AP : Phosphatase Alcaline

ARN : Acide Ribonucléique

BET : Bromure d'Ethidium

BO : Bulbe Olfactif

BSA : Bovine Serum Albumine

DPX : Milieu de montage DePeX

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétraacétique

EO : Epithélium Olfactif

GBCs : Globose Basal Cells

HBCs : Horizontal Basal Cells

HIS : Hybridation In Situ

IPTG : IsoPropyl β-D-1-ThioGalactopyranoside

LB : Lysogeny broth

MO : Muqueuse Olfactive

PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)

SSC : Saline Sodium Citrate buffer

TAE : Tris, Acétate, EDTA

TEA : TriEthAnolamine

TEN : Tris EDTA NaCl buffer

Sommaire

Structure d'accueil

1) Institut National de Recherche Agronomique - Centre de Jouy-en-Josas ……..……..1
2) Unité Neurobiologie de l'Olfaction et Modélisation en Imagerie (NOeMI) ……...1
3) Equipe Biologie de l'Olfaction et Biosenseurs (BOB) ..……..1
4) Définition de ma mission pendant le stage……....1

Introduction

1) Structure des épithéliums olfactif et respiratoire……..…….2
2) Les cellules basales…….3
    a) Les cellules basales horizontales……3
    b) Les cellules basales globulaires……..3
3) La neurogenèse dans la muqueuse olfactive……...4
4) Problématique……..4

Matériel et Méthodes

Fixation et coupe des blocs muqueuse olfactive/bulbes olfactifs ……..5
Coloration au Violet de Crésyl
Préparation des oligonucléotides
Réaction de Polymérisation en Chaîne
Electrophorèse en gel d'agarose ……...6
Ligation avec pGEM-T (clonage)
Transformation et culture des bactéries
Préparation ADN plasmidique ……..7
Linéarisation des Plasmides
Marquage digoxigenin-UTP……..8
Hybridation In Situ

Résultats et Discussion

Résultats……10

I. Expression dans la muqueuse olfactive …….……....10
II. Production des clones et des sondes…….……11
III. Hybridation In Situ……..…...12

Discussion……..…13

Bilan ……15

Résumé / Abstract

Résumé :

La muqueuse olfactive est le tissu dans lequel se trouvent les neurones olfactifs impliqués dans la détection d'un très grand nombre de molécules odorantes. Ce tissu est également capable de renouveler en permanence ses neurones grâce à la présence de cellules progénitrices de deux types situées dans la partie la plus basale de la muqueuse olfactive, intéressant les biologistes pour leur totipotence. Ces cellules sont les cellules basales horizontales (HCBs) dont la prolifération est relativement lente et les cellules basales globulaires (GBCs) qui sont les précurseurs des neurones olfactifs, et dont la prolifération est plus rapide. Peu de marqueurs spécifiques sont connus pour ces deux types cellulaires. Nous avons donc tenté de rechercher par Hybridation In Situ sur muqueuse olfactive de rat, de nouveaux marqueurs de ces cellules basales, sur la base de leur conservation au cours de l'évolution. Nous pourrions donc disposer de ces gènes pour comprendre la programmation de ces cellules souches olfactives.

Mots clés : Muqueuse olfactive, GBCs, HBCs, Hybridation In Situ, cellules souches

Abstract :

The olfactory mucosa is the tissue in which you can find the olfactory receptor neurons that allow perception of a large number of odorant molecules. This tissue is capable of permanently renewing its neurons thanks to the presence of two types of progenitors located in the most basal part of the olfactory mucosa. These cells are Horizontal Basal Cells (HBCs) whose proliferation rate is relatively slow and Globose Basal Cells (GBCs) which are olfactory receptor neurons' precursors and whose proliferation rate is faster. Hence, from a list of candidate genes we tried to define new markers of the basal cells by In Situ Hybridization protocol on rat's olfactory mucosa. Those have to be specific of the basal cells and also have to be highly conserved throughout evolution. In this way we would show that those genes may have a crucial role in the biology of olfactory stem cells.

Key words : Olfactory mucosa, GBCs, HBCs, In Situ Hybridization, stem cells

Présentation de la structure d’accueil

1) Institut National de Recherche Agronomique – Centre de Jouy-en-Josas :

Fondé en 1946 et placé sous statut d'Etablissement Public à caractère Scientifique et Technologique (EPST), l'INRA est un organisme Français de recherche en agronomie, sous la tutelle du Ministère chargé de la Recherche et de celui chargé de l'Agriculture. C'est le premier institut européen de recherche agronomique et le deuxième au niveau mondial si on considère le nombre de publications en sciences agricoles, végétales et animales. A 20 km au Sud-Ouest de Paris, le centre INRA de Jouy-en-Josas se situe sur le Campus Paris-Saclay. La trentaine d'unités qui compose le centre travaille sur l'animal, la consommation et les sciences de l'alimentation, les mathématiques appliquées et la bio-informatique.

2) Unité Neurobiologie de l'Olfaction et Modélisation en Imagerie (NOeMI) :

L'unité de Neurobiologie de l'Olfaction et Modélisation en Imagerie (NOeMI), créée au 1er janvier 2010 est rattachée au département PHASE (Physiologie Animale et Systèmes d'Elevage). Elle associe les équipes BOB (Biologie de l'Olfaction et Biosenseurs) et AMIB (Analyse et Modélisation en Imagerie Biologique), et est dirigée par Edith Pajot. NOeMI s'intéresse à la genèse du signal olfactif, la plasticité du système olfactif, et la modélisation tridimensionnelle des structures olfactives centrales. Elle vise à explorer les facteurs impliqués dans la genèse du signal déclenché par un stimulus olfactif, étudier la réponse aux perturbations de la MO, et également identifier, caractériser, et modéliser les réseaux neuronaux centraux qui relient perception olfactive et comportement. NOeMI fait partie d'un réseau d'unités travaillant en neurosciences, l'Institut Fédératif NeuroSud Paris 144.

3) Equipe Biologie de l'Olfaction et Biosenseurs (BOB) :

BOB rassemble une dizaine de scientifiques dont les compétences vont de la physiologie à la biophysique en passant par l'électrophysiologie ou la biologie moléculaire, avec le support de plusieurs techniciens. Les recherches de l'équipe sont centrées sur la génération du signal olfactif au niveau périphérique et à la plasticité de la muqueuse olfactive, depuis les dendrites des neurones sensoriels olfactifs jusqu'à l'extrémité de leurs axones les connectant au BO.

4) Définition de ma mission pendant le stage :

C'est au sein de cette équipe que j'ai réalisé mon stage, intervenant dans le projet ayant pour titre « Etude comparée de familles de gènes clés pour les progéniteurs neuronaux ». Ma mission était de réaliser des Hybridations In Situ (HIS) sur des coupes de MO de rats adultes à l'aide de sondes que j'ai préparées au préalable pour différents gènes cibles, afin de savoir s'ils pourraient constituer de nouveaux marqueurs des cellules progénitrices basales de la muqueuse olfactive.

Introduction Bibliographique

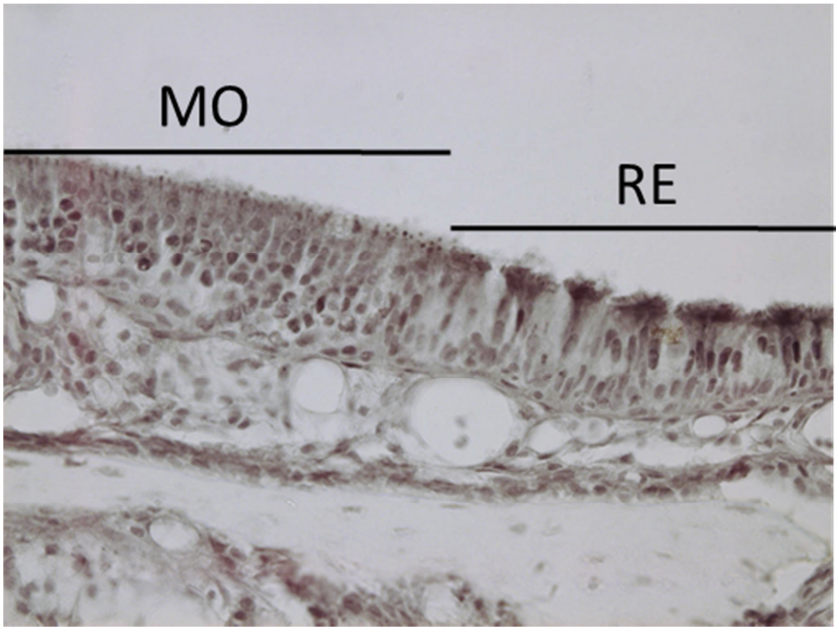


Figure 1 : Structures de la muqueuse olfactive (MO) et de l'épithélium olfactif (RE) chez le rat. Observation microscopique d'une coupe de muqueuse de rat.

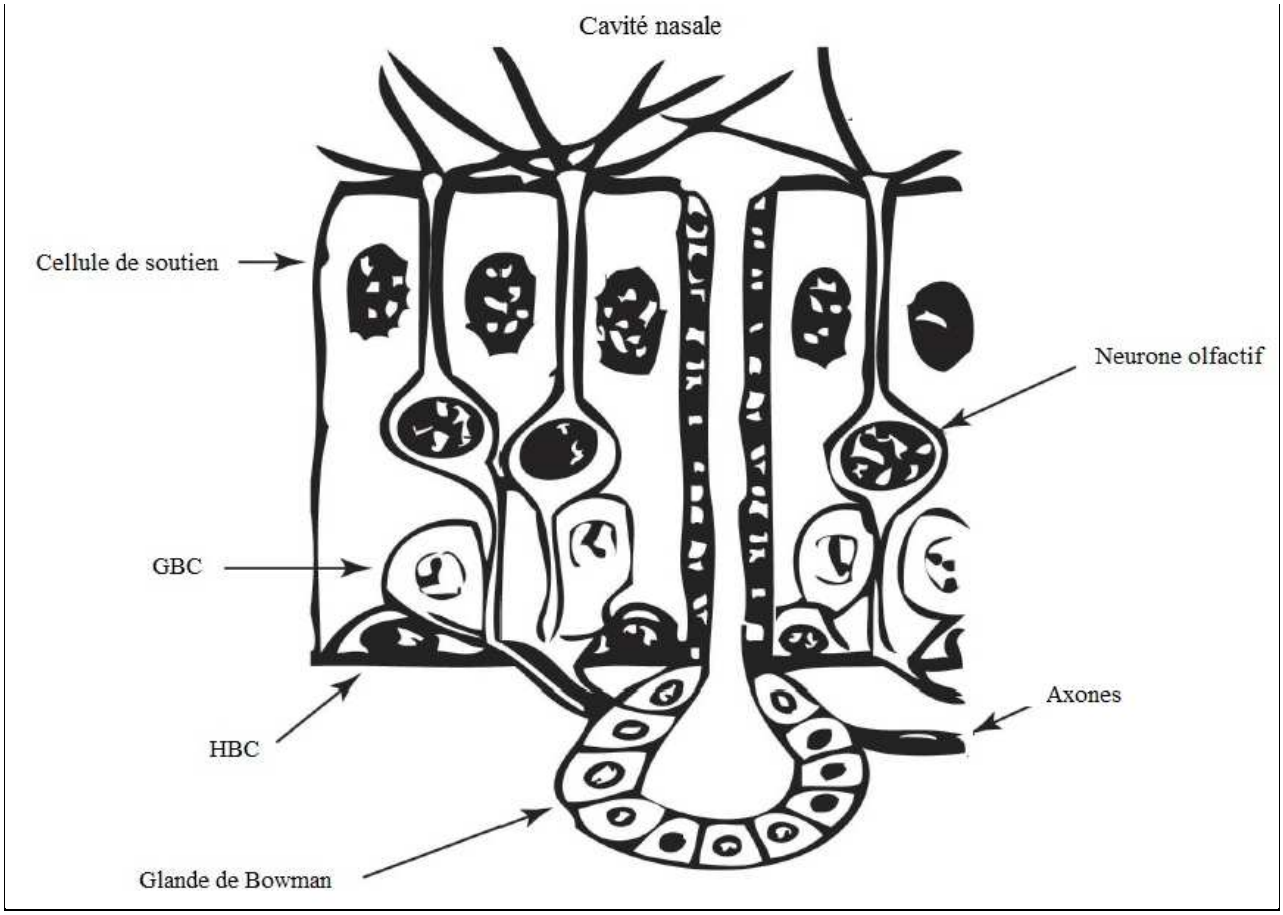


Figure 2 : Schéma de la structure de la muqueuse olfactive avec ses quatre types cellulaires : Les cellules de soutien, les neurones olfactifs, les cellules glandulaires formant les glandes de Bowman, et les cellules basales comprenant les Globose Basal Cells (GBCs) et les Horizontal Basal Cells (HBCs)

1) Structure des épithéliums respiratoire et olfactif

L'olfaction est un sens primordial chez l'animal qui l'informe de l'environnement et participe à bon nombre de comportements liés à sa survie (alimentation, vie sociale et sexuelle). Cette fonction est assurée par le système olfactif situé dans les cavités nasales de l'animal.
Les cavités nasales sont recouvertes de deux types d'épithéliums. (Figure 1). Celles-ci sont, chez les vertébrés, divisées en trois compartiments : la chambre antérieure couverte d'un épithélium pseudo-stratifié squameux, la chambre moyenne tapissée d'épithélium respiratoire cilié et la chambre postérieure où se situe l'épithélium olfactif.

L'épithélium respiratoire situé à l'avant est un épithélium pseudo-stratifié cilié riche en cellules caliciformes associé à un chorion contenant des glandes séromuqueuses, des formations lymphoïdes, et de nombreux vaisseaux et nerfs.

Au niveau de la face supérieure des fosses nasales, dans la partie profonde de la cavité nasale, on trouve l'épithélium olfactif (EO) stratifié qui est le tissu récepteur posé sur une sous-muqueuse riche en vaisseaux sanguins et fibroblastes, le tout constituant la muqueuse olfactive (MO). Il se trouve ainsi au contact d'un air chaud et humide provenant des chambres précédentes. De plus, chez la plupart des mammifères, les nombreuses circonvolutions des cornets nasaux augmentent la surface de l'épithélium olfactif, qui est maintenu dans des conditions d'hydratation appropriées grâce à la sécrétion par les glandes de Bowman, d'un mucus qui forme une couche épaisse à la surface de l'épithélium.

L'EO est capable de détecter les différentes molécules odorantes, grâce à des récepteurs olfactifs de la famille des RCPGs portés à la surface des neurones sur des membranes ciliées au contact du mucus nasal. Après liaison de l'odorant à son récepteur, un influx nerveux est généré et transmis par le nerf olfactif jusqu'au bulbe olfactif au niveau duquel commence le traitement de l'information olfactive. L'EO est constitué de 3 types cellulaires. Les cellules de soutien, les cellules neurosensorielles (ou neurones olfactifs), et les cellules basales parmi lesquelles, on peut distinguer les cellules basales globulaires et les cellules basales horizontales (Figure 2). Les cellules glandulaires formant les glandes de Bowman sécrétant le mucus, sont quant à elles situées dans la sous muqueuse, séparée de l'épithélium par une lame basale.

2) Les cellules basales

Dans le tiers basal de l'épithélium on peut noter la présence de deux types de cellules : les cellules basales horizontales (ou HBCs) et les cellules basales globulaires (ou GBCs) notamment distinguées les unes des autres par des critères histologiques (Guo Z et al, 2010). On dispose de quelques marqueurs qui leur sont spécifiques et différentes hypothèses sont faites sur leurs rôles respectifs. Les deux types cellulaires sont néanmoins capables de proliférer, même si les HBCs auraient un taux de prolifération plus faible que les GBCs (Mackay-Sim A., 2010), et sont considérées comme « quiescentes ». Elles seraient cependant particulièrement activées lors de lésions très importantes de l'EO.

a) Les cellules basales horizontales

Les cellules basales horizontales (HBCs) localisées dans la partie la plus basale de l'épithélium, reposent sur la lame basale. Ces cellules sont des cellules de forme allongée possédant un noyau dense. Du fait de leur localisation, les HBCs sont au contact des neurones et elles forment avec la lame basale un tunnel dans lequel s'engagent les axones des neurones matures en direction du bulbe. Le positionnement de ces cellules par rapport aux neurones olfactifs permet de penser qu'il y a des interactions entre ces deux types cellulaires. Ainsi des signaux paracrines pourraient être échangés entre les axones des neurones olfactifs et les HBCs, et inversement. (Iwai N et al, 2008). Les HBCs sont considérées comme les cellules souches de la MO étant donné leur capacité à se différencier en neurone et à s'auto-renouveler.

b) Les cellules basales globulaires (GBCs).

Les cellules basales globulaires (GBCs) se distinguent des cellules basales horizontales par leur localisation et leur morphologie mais également par l'expression ou non de marqueurs spécifiques. Morphologiquement, ces cellules sont plus sphériques que les HBCs, d'où leur nom et leur localisation au sein de l'épithélium est plus apicale. Ce sont les précurseurs neuronaux, intermédiaires entre les HBCs et les neurones olfactifs. Un des marqueurs de ce type cellulaire est reconnu spécifiquement par l'anticorps monoclonal GBC-1 dirigé spécifiquement contre les cellules globulaires chez les mammifères. (Goldstein et al, 1996) De plus, SOX2 est exprimé dans ces cellules. (Guo Z et al, 2010)

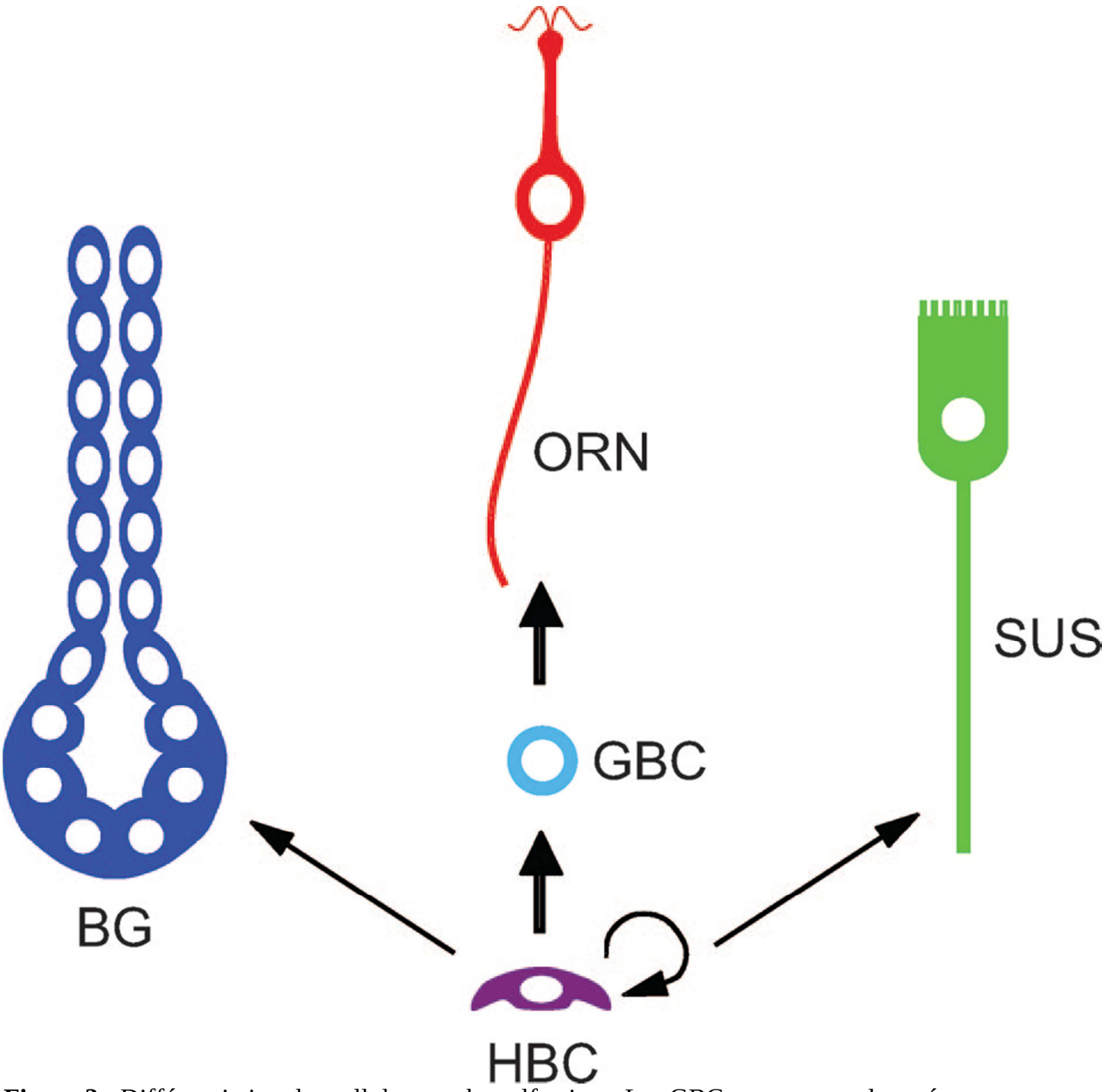


Figure 3 : Différenciation des cellules souches olfactives. Les GBCs ne sont que les précurseurs des ORNs et les HBCs sont les véritables cellules souches donnant des BGs, des SUSs, ou des ORNs, après différenciation en GBCs dans ce dernier cas.

GBCs : Globose Basal Cells. HBCs : Horizontal Basal Cells. ORNs : Olfactory Receptor Neurons. BG : Bowman's Gland cells. SUSs : Sustentacular cells. (Iwai N., 2008)

3) La neurogenèse dans la muqueuse olfactive

Une des originalités de la MO tient à sa capacité à renouveler les neurones qu'elle contient lorsque ceux-ci disparaissent suite à un vieillissement normal, pathologique ou par toxicité, à partir de cellules souches situées au niveau basal de l'épithélium olfactif. Cette nécessité provient du fait que ce tissu est au contact de l'environnement et subit des agressions répétées. Le taux de renouvellement de ces cellules est variable et dépend de la nature de ce qui a conduit à leur disparition. Parmi les cellules progénitrices, les véritables cellules souches seraient les HBCs, capables de se différencier en GBC, en cellule de la glande de Bowman ou en cellule de soutien, alors que les GBCs ne seraient que les précurseurs des neurones olfactifs, mais ceci reste encore controversé (Figure 3).

4) Problématique

Le stage s'inscrit dans un projet développé conjointement par une unité situées au CNRS de Gif/Yvette travaillant sur le développement et l'évolution du cerveau antérieur et NOeMI (INRA) et financé par le réseau IFR 144 NeuroSud Paris. Le but est d'effectuer une étude comparée de familles de gènes clés pour les progéniteurs neuronaux pour trouver des candidats nouveaux comme marqueurs des cellules basales de l'EO qui soient donc à la fois spécifiques de ces cellules et très conservés phylogénétiquement. D'où une étude parallèle sur la muqueuse de rat (INRA, Jouy-en-Josas) et celle d'Astyanax mexicanus (CNRS, Gif-sur-Yvette. Données non présentées ici).

En se basant sur la publication de Richard Krolewski (Krolewski et al, 2013) et la liste de gènes spécifiques des GBCs qu'il propose, les deux équipes ont recherché par analyse bioinformatique et croisement avec des banques de données publiées dans les différentes espèces une liste d'une dizaine de candidats possiblement exprimés plus fortement dans les GBCs que dans les neurones ou dans les cellules sustentaculaires. Les candidats retenus par les chercheurs de l'unité sont détaillés en annexe. C'est donc à partir de cette liste de gènes candidats ressortant de cette étude que j'ai été chargé de construire des sondes spécifiques de ces gènes et réaliser un protocole d'hybridation in situ pour tenter de montrer leur expression spécifique ou non dans les cellules basales de l'épithélium olfactif. J'ai choisi de préparer également une sonde à partir du gène Sox2, afin d'avoir un contrôle positif d'hybridation sur les cellules ciblées par le projet (Guo et al, 2008). J'ai également utilisé comme contrôle positif un clone recombinant exprimant un fragment de l'ADNc de l'Olfactory Marker Protein (OMP) connu pour être exprimé dans la muqueuse olfactive.

Matériel et Méthodes

Séquence clonée	Amorces	Taille du fragment	Nom du clone obtenu	% d'identité par rapport au gène connu
SOX2	Primer a (Forward) : TTGGGAGGGGTGCAAAAGAG Primer b (Reverse) : CATCGCCCGGAGTCTAGTTC	282 pb	pSOX2	100% (166/166) et 98% (119/122)
Timp3	Primer a (Forward) : GGCTGTGCAACTTTGTGGAG Primer b (Reverse) : CTGTGGCATTGCTGATGCTC	282 pb	pTimp3	
EIF2ak2	Primer a (Forward) : GACCTCCACACGACAGAAGG Primer b (Reverse) : GTCGGGGTCACACAGTTCAA	260 pb	pEIF2ak2	
RNF170	Primer c (Forward) : GTGTTTTCAGTCGGGGGTCT Primer d (Reverse) : ACGGCCATGGATCCTTTTGT	280 pb	pRNF170	100% (280/280)
S100a6	Primer a (Forward) : GTCGACGTGTGCTTCTAGCC Primer b (Reverse) : CCCCCAGGAAGGCAACATAC	267 pb		
NOL3	Primer c (Forward) : GGTTGATCCCCACTCCACTG Primer d (Reverse) : CAGCTTGGGCTACTTTGGGA	309 pb	pNOL3	100% (309/309)
DDX5	Primer e (Forward) : TCGTTCCAGGGGTAGAGGAG Primer f (Reverse) : CCCTGTTGGGTTACCAGTCC	253 pb	pDDX5	
MEN1	Primer e (Forward) : CATTCCTCCCACTTGGGGAC Primer f (Reverse) : CTCTGTTCTCCGGCCAGTTT	288 pb	pMEN1	100% (288/288)
PHC1	Primer e (Forward) : AGCAGCCACCACCACATATC Primer f (Reverse) : ACAGGAGAGGAGGCTGTAGG	289 pb	pPHC1	100% (289/289)
TERF2	Primer e (Forward) : GGACTCAGGACAGTGAAGGC Primer f (Reverse) : GGAGGAATTGAGGTCTGGGC	291 pb	pTERF2	99% (290/291)
ZBTB7a	Primer e (Forward) : AACCCCATGAATAGCCTGCC Primer f (Reverse) : AGTGGCCGTTCTGTGTAGTG	299 pb	pZBTB7a	99% (298/299)

Tableau 1 : Récapitulatif des gènes candidats ciblés, des amorces choisies et des fragments amplifiés par PCR ainsi que des clones créés dans pGEM-T et les pourcentages d'identité des séquences clonées par rapports aux gènes séquencés dans les bases de données NCBI. Les cases barrées correspondent aux situations pour lesquels le clonage n'a pas été réalisé (S100a6) ou aux clones pour lesquels le séquençage a montré un problème.

Fixation et coupe des blocs muqueuse olfactive/bulbes olfactifs : Les blocs de muqueuses et bulbes olfactifs prélevés sur 3 rats adultes perfusés avec une solution de paraformaldéhyde 4% en PBS sont post-fixés 24h dans le même mélange à 4°C. Les tissus sont imprégnés à 4°C dans un mélange sucrose 30% en PBS 2 à 3 jours. Transférés 1h dans 50% Tissue-Tek 50% sucrose, puis 1h dans 70% Tissue-Tek 30% sucrose, ils passent la nuit à 4°C dans 100% Tissue-Tek. Ils sont ensuite congelés dans la vapeur d'azote puis recouverts de Tissue-Tek, coupés au cryotome Leica CM3050S réglé à 14µm d'épaisseur à -25°C. Trois coupes sont disposées sur chaque lame de microscope « Superfrost » et conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

Coloration au Violet de Crésyl : Les lames conservées à -80°C sont séchées à température ambiante pendant 15 minutes. Puis elles sont colorées avec quelques gouttes de Violet de Crésyl 15 minutes, rincées et déshydratées dans des bains d'éthanol successifs à 90° et 100° (2 minutes dans chacun), puis montées sur une lamelle avec une goutte de DPX.

Préparation des oligonucléotides : Les oligonucléotides ont été choisis en utilisant Pick Primers sur le NCBI, à partir de la séquence de l'ADNc du gène correspondant chez le rat en tenant compte de certains critères (voir résultats), et commandés chez Eurofins MWG Operon. Ils sont dilués repris afin d'obtenir les solutions mères de concentration de 100pmol/µl en rajoutant H_2O. Les oligonucléotides sont dilués à 4 pmoles/µl (1:25, 4µl qsp 100µl d'H_2O) et conservés au congélateur.

Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) : Chaque tube de PCR contient 4µl de Tampon 5X Colorless GoTaq Flexi Buffer, 1.2µl de MgCl2 (25mM), 1µl de dNTP 5mM, 0.5µl de Taq Polymérase (5u/µl), 1 µl de chaque système d'amorces diluées (qsp 19µl H_2O). Enfin, la matrice (1µl d'ADNc de MO/ou d'ADN génomique rat (environ 1 µg) est ajouté dans un tube sur deux pour chaque système, le second tube étant le contrôle sans ADN.
La réaction est lancée dans le Mastercycler Eppendorf avec le programme suivant: dénaturation initiale, 2 min à 94°C puis 35 cycles comportant chacun trois étapes : dénaturation, 30s à 92°C, hybridation des amorces 45s à 57°C, puis élongation, 45s à 72°C. La PCR se termine avec une phase à 72°C pendant 10 minutes pour terminer l'élongation. La température de l'étape d'hybridation varie selon le Tm des oligonucléotides utilisés (Tableau 1).

Electrophorèse en gel d'agarose : 20 ml de solution d'agarose 1.5%, préparée avec du TAE (Tris/Acétate/EDTA) et conservé à 65°C sont prélevés, auxquels 1 µl de bromure d'éthidium est ajouté pour repérer les fragments d'ADN migrés sous UV. Le gel est ensuite coulé et refroidi à température ambiante avec le peigne. Ensuite le peigne est retiré et le gel est placé dans la cuve contenant du tampon de migration (TAE). Après dépôt de 3 µl produits de PCR dans chaque puits et de l'échelle de taille 2log (Biolabs), la migration est lancée avec un champ électrique de 25, 50 ou 100V pour 15 min environ. Une fois la migration terminée, le gel est récupéré et placé sous UV pour visualiser les fragments d'ADN qui ont migré dans le gel selon leur taille, une photographie est prise grâce à un système d'acquisition comprenant une caméra et une imprimante.

Ligation avec pGEM-T (clonage) : Les produits de PCR sont directement insérés dans pGEM-T lors d'une réaction de ligation contenant 1µl de vecteur pGEM-T à 50ng/µl, 5µl de tampon de ligation 2X (2X Rapid Ligation Buffer), 1µl de produit de PCR et 1µl de T4 DNA Ligase, 2µl d' H_2O et les tubes sont incubés à 4°C pour la nuit.

Transformation et culture des bactéries : Les bactéries XL2-Blue Ultracompétentes sont utilisées suivant le protocole de Stratagene. Un tube refroidi à 4°C est préparé pour chaque plasmide recombiné avec un fragment de gène recherché, 30µl de bactéries sont placées dans ce tube, auxquels est ajouté 1µl de β-Mercaptoéthanol. Puis 1µl de pGEM-T recombiné est ajouté. Ensuite, après 30 minutes sur la glace, les bactéries subissent un choc thermique 30 secondes à 42°C. Après refroidissement 2 minutes sur la glace, 470µl de LB préalablement chauffé à 42°C sont ajoutés, avant de les laisser incuber 1h à 37°C avec agitation.
20µl et 100µl de chaque mélange de transformation sont ensuite étalés sur deux boites de Pétri LB agar contenant 0,1% d'ampicilline (100 µg/ml) ainsi que 20µl d'IPTG 200mM et 40µl X-Gal à 40mg/ml. Enfin, les boites sont incubées pendant la nuit à 37°C.

Le lendemain pour chaque couple de boites (20 et 100µl), les colonies blanches repérées sont grattées avec un cure-dents et placées dans les tubes pour être testées en PCR utilisant les amorces correspondantes au fragment cloné pour vérifier la présence de l'insert dans le plasmide recombinant et le mélange réactionnel mentionné avant.

Puis la PCR colonie est programmée dans les conditions standards, mais précédée d'une dénaturation de 10 min à 94°C pour lyser thermiquement les bactéries. Enfin, les produits amplifiés sont analysés sur gel d'agarose comme décrit précédemment. Les colonies ayant donné un résultat positif sont mises en culture à 37°C avec agitation, dans des erlens contenant un plus grand volume de LB (20 à 50 ml) et 0.1% d'ampicilline.

Préparation ADN plasmidique (kit NucleoSpin Plasmid, Macherey-Nagel) : Les cultures bactériennes recombinantes sont centrifugées à 4°C pendant 20mn à 3000rpm. Avec le kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel), les culots bactériens sont repris dans 500µl de tampon A1 et l'ADN est extrait par une lyse alcaline (500µl tampon A2). Le tampon A3 (600µl) sert à neutraliser le lysat obtenu et permet de précipiter les protéines, l'ADN génomique ainsi que les débris cellulaires. Il permet aussi à l'ADN plasmidique de se lier à la membrane de silice de la colonne NucleoSpin. Le précipité formé est enlevé par une étape de centrifugation (11000g, 1mn). Le surnageant clarifié est chargé sur une colonne. Après une centrifugation d'1 min à 11000g, la membrane est lavée par 600µl de tampon A4 (11000g, 1min), séchée par centrifugation (11000g, 1 min) et l'ADN est élué par centrifugation (11000g, 1 min) avec 50µl d'H2O.

Linéarisation des Plasmides par ApaI / SacII ou Spe I : Afin de linéariser le plasmide avant marquage, 3 µg de chaque plasmide recombinant sont hydrolysés enzymatiquement en présence de 3µl de tampon 4 (10x), 3µl de BSA (10x) et 2µl d'enzyme de restriction ApaI / SacII ou SpeI selon le cas, auquel le volume d'H_2O nécessaire pour avoir un volume final de 30µl est ajouté. Ensuite les tubes sont placés au bain-marie à 25°C pour ApaI ou à 37°C pour SpeI ou SacII, pendant 2h.

Après linéarisation, l'ADN est précipité dans une solution contenant 1/10^{e} d'acétate de sodium 3M à pH 5, et 2,5 volumes d'éthanol absolu. Puis les tubes restent à -20°C une nuit.

Après centrifugation de l'ADN 20 minutes à 12500 g et récupération du culot, les sels sont éliminés par lavage avec 200µl d'éthanol 70%, puis l'ADN est centrifugé 5 minutes.
Les culots sont séchés sous une lampe, puis repris dans 10µl d'eau. La concentration en ADN est ensuite mesurée par spectrophotométrie (Nanodrop).

Marquage digoxigenin-UTP (DIG RNA labelling kit, Roche) : 1µg de plasmide linéarisé est incubé 2h au bain-marie à 37°C en présence de 2µl de dNTP 10X contenant du digoxigenine-11-dUTP, 2µl de Tampon Transcription, et 1µl de RNAse inhibitor avant de rajouter 2µl d'enzyme SP6 ou T7 (selon la digestion faite précédemment) complété à 20 µl final, ce qui permet d'obtenir une sonde sens (contrôle ne s'hybridant pas avec l'ARNm) et une sonde antisens (s'hybridant avec l'ARNm). 2µl de DNAse I sont ajoutés pour 15 minutes d'incubation à 37°C afin d'éliminer l'ADN plasmidique matrice et la réaction est stoppée par ajout de 2µl d'EDTA 0,2M à pH8. Les sondes marquées à la digoxigenine sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

Hybridation In Situ (HIS) : Les lames sont hybridées avec les sondes sens ou antisens marquées à la digoxigénine (DIG) puis les fragments hybridés spécifiquement sont immunorévélés en utilisant un anticorps anti-digoxigenine couplé à la phosphatase alcaline (AP), dont l'activité est ensuite révélée par un substrat coloré en utilisant le kit DIG Nucleic Acid Detection Kit (Roche). Quelques précautions sont nécessaires pour éviter une dégradation des ARN : toutes les solutions d' HIS sont préparées avec de l'eau traitée au diethylpyrocarbonate (DEPC 1/1000) pendant la nuit, puis autoclavée. De la vaisselle stérile (plastique) ou traitée 20 minutes avec une solution de NaOH 0,1M, puis rincée (verre) est utilisée. L'expérience s'effectue sur 3 jours.

- Jour 1 : Pré-Hybridation et Hybridation : Les coupes sont entourées au crayon hydrophobe (Dakopen), hydratées dans des bains d'éthanol décroissants (100, 90, 70, 50%, 1 min chaque), puis 2XSSC. Les lames sont ensuite incubées dans 10µg/ml de protéinase K dans un tampon adéquat (Annexe 2) pendant 4 minutes 30 avant d'être rincées à l'eau DEPC. Puis elles sont plongées 3 min dans une solution de triéthanolamine (TEA, Annexe 2) à laquelle sont lentement ajoutés 250µl d'acide acétique anhydre sous agitation.

Les lames sont alors déshydratées par des bains d'alcool de concentration croissante, puis laissées à sécher 1 heure. Le mix d'hybridation (400µl de TEN Buffer en annexe, 1ml de formamide 100%, 400µl de dextran 50% et 200µl de Blocking solution en annexe) est préchauffé à 55°C et les sondes SP6 et T7 (1µg/lame) sont dénaturées à 68°C pendant 10 minutes avant d'être placées sur la glace. Le mix est ajouté sur chaque sonde dénaturée puis le tout est vortexé avant d'être déposé à raison de 250µl par lame et incubé pendant la nuit à 55°C en présence d'un bécher contenant formamide 50% pour éviter l'évaporation.

- Jour 2 : Rinçages et Immunodétection : Après rinçages successifs en SSC 2X, puis Formamide 50% avec SSC 2X, un traitement à la RNase A dans du RNase Buffer à 37°C, (80µl dans 80ml de RNase Buffer 37°C, soit une concentration de 20mg/ml, pendant 30 min) est fait pour éliminer l'excès de sonde non hybridée. Après rinçage dans du RNase Buffer à 55°C 30 min, et un dernier rinçage dans du SSC 2X 10 min, les lames sont saturées pendant 2h dans 8ml SSC 2X, 16ml de Blocking Reagent et 40µl de Triton qsp 80ml avec H_2O, puis rincées 5 minutes dans Tampon Maléate 1X. 900µl de Tampon Maléate 1X, 100µl de Blocking Reagent, 3µl de Triton et 1µl d'anticorps anti-Dig-AP sont préparés, 150µl de ce mélange sont déposés sur chaque lame. Enfin, incubation pendant la nuit à 4°C en chambre humide pour permettre à l'anticorps anti-DIG de se fixer sur les sondes hybridées sur le tissu.

- Jour 3 : Lavages et Révélation : Après 2 lavages de 10 minutes dans du Tampon Maléate 1X pour éliminer les anticorps non fixés, et une pré-incubation de 5 minutes avec du tampon de détection, les lames sont mises à l'obscurité avec le substrat de la AP, le NBT/BCIP fourni dans le kit Roche (40µl NitroBleu de Tetrazolium / BromoChlorylIndoloPhosphate dans 2ml de tampon de détection). Après quelques heures, la réaction est arrêtée avec deux lavages de 10 minutes à l'eau. Puis les lames sont montées sur lamelle dans du Depex pour observation au microscope.

Résultats et Discussion

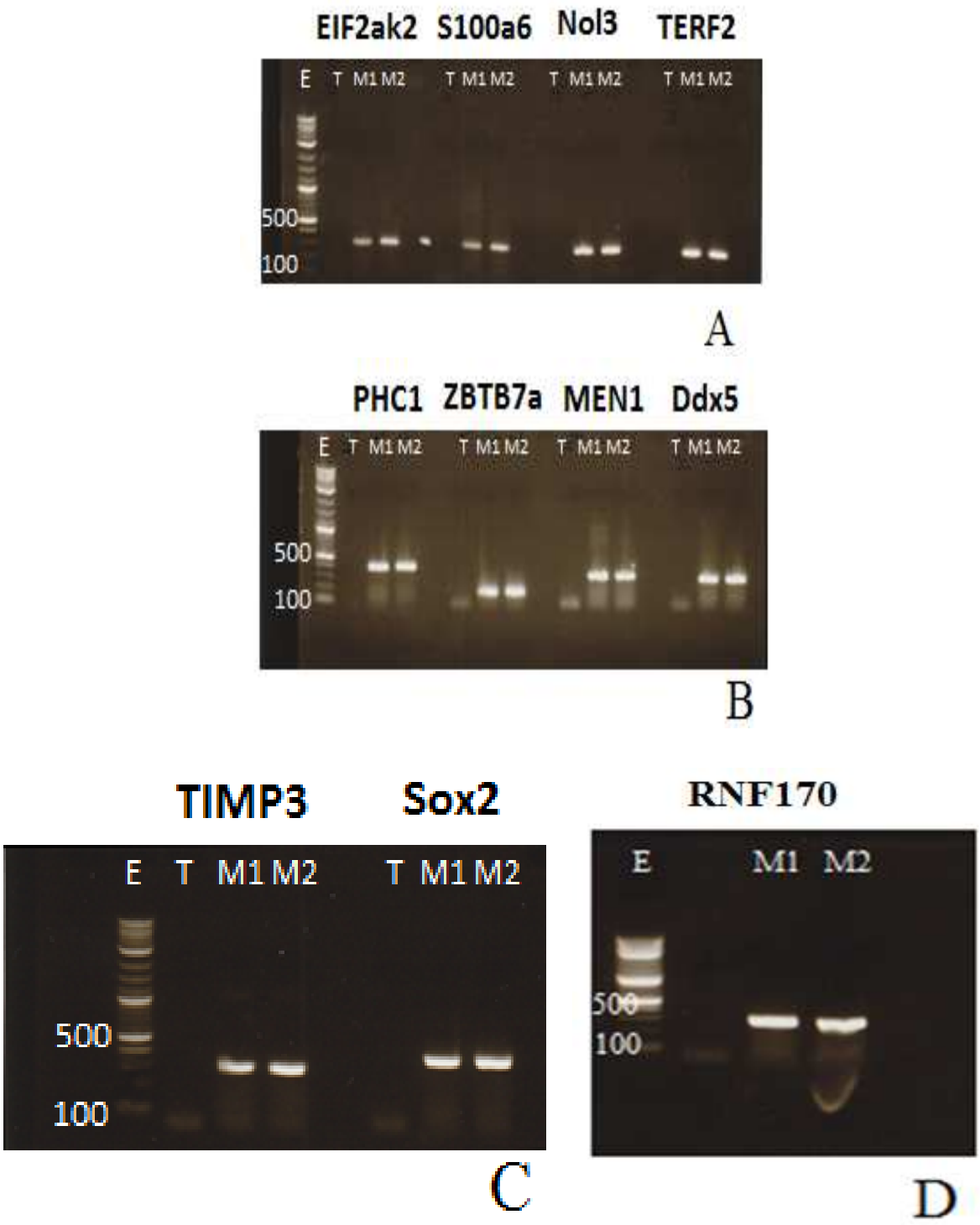


Figure 4 : Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR sur les muqueuses olfactives de deux rats adultes, pour tester l'expression des 11 gènes candidats. Les produits de PCR ayant migré en A, en B, en C et en D, ont été obtenus dans les mêmes conditions, avec le même programme de PCR

Dénaturation initiale, 2 minutes à 94°C, puis 35 cycles de PCR comprenant trois phases, 30 secondes de dénaturation à 92°C, 45 secondes d'hybridation des sondes à 57°C, et 45 secondes d'élongation à 72°C. Enfin, l'élongation se termine pendant 10 minutes à 72°C.

E : Echelle de taille. T : Témoin négatif, sans ADN. M1 : Muqueuse rat 1. M2 : Muqueuse rat 2

I. Expression dans la muqueuse olfactive

A partir de la liste de gènes candidats, j'ai utilisé Pick Primers sur le NCBI afin de dessiner des couples d'amorces spécifiques sur le génome du rat. Ces amorces font toutes une vingtaine de paires de bases et les couples sont positionnés sur un unique exon et non à cheval entre deux. La liste de ces amorces est donnée dans le tableau 1.
Afin de vérifier l'expression des gènes candidats dans la MO du rat, nous avons réalisé des PCR en prenant deux extraits d'ADN complémentaires (ADNc) de muqueuse olfactive M1 et M2 disponibles au laboratoire comme matrice pour l'amplification de fragments avec des couples d'amorces spécifiques pour chacun de ces gènes (Figure 1). Un témoin T (sans matrice) a été inclus. Ces expériences ont été faites en plusieurs temps.

Nous avons donc programmé 35 cycles de PCR dans les conditions standards (30 sec 94°C, 45 sec 57°C, 45 sec 72°C). Suite à l'amplification, nous avons fait migrer ces produits de PCR dans un gel d'agarose, puis nous avons révélé les bandes sous UV (Figure 4).
Si une unique bande est observée à la taille correspondant au fragment du gène que nous voulions amplifier alors il est possible qu'il y ait expression de ce gène dans la muqueuse olfactive du rat, même s'il y a toujours le risque d'avoir amplifié un fragment dont la taille correspond, mais qui n'est pas celui recherché.

1. EIFak2, S100a6, NOL3, TERF2

Dans chaque cas, nous pouvons observer une unique bande présente dans la muqueuse de chacun des deux rats et absente du témoin négatif. La taille des fragments attendus est de 260pb pour EIF2ak2, 267pb pour S100a6, 309pb pour NOL3 et 291pb pour TERF2 (Tableau 1) et nous pouvons voir sur le gel que les fragments amplifiés font approximativement ces tailles (Figure 4 A) Nous pouvons donc dire que ces quatre gènes semblent être exprimés au sein de la muqueuse olfactive, ce qui conforte l'hypothèse de départ.

2. PHC1, MEN1, Ddx5, SOX2, TIMP3, RNF170

De même, les tailles attendues pour les fragments PHC1, MEN1 et Ddx5 sont respectivement de 289pb, celle du fragment ZBTB7a est de 299pb, 288pb et 253pb et les tailles des fragments obtenus correspondent. (Figure 4 B) Ces trois gènes semblent donc être exprimés dans la muqueuse olfactive. Pour SOX2 et TIMP3, un fragment de 282pb est attendu et pour RNF170

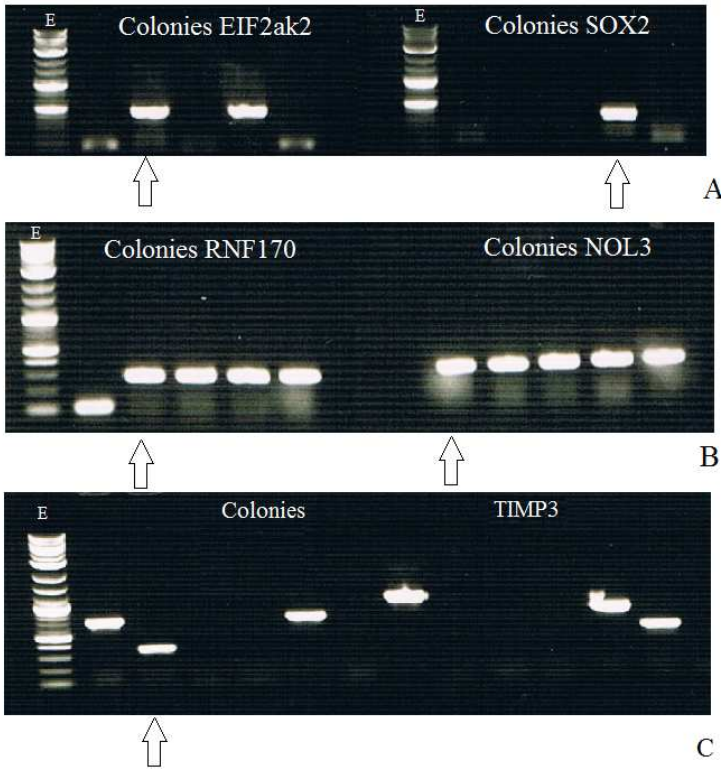


Figure 5 : Electrophorèse sur gel d'agarose montrant un test de PCR sur colonies de bactéries recombinantes. Test des colonies bactériennes ayant intégré le plasmide pour voir lesquelles possèdent le fragment d'intérêt, le fragment du gène candidat correspondant. A : Colonies bactériennes ayant intégré le pGEM-T-EIF2ak2 à gauche sur le gel, et colonies ayant intégré le pGEM-T-SOX2 à droite.

B : Colonies bactériennes ayant intégré le pGEM-T-RNF170 à gauche sur le gel, et colonies ayant intégré le pGEM-T-NOL3 à droite.

C : Colonies bactériennes ayant intégré le pGEM-T-TIMP3.

Les flèches montrent la colonie à partir de laquelle nous avons ensuite extrait l'ADN plasmidique.

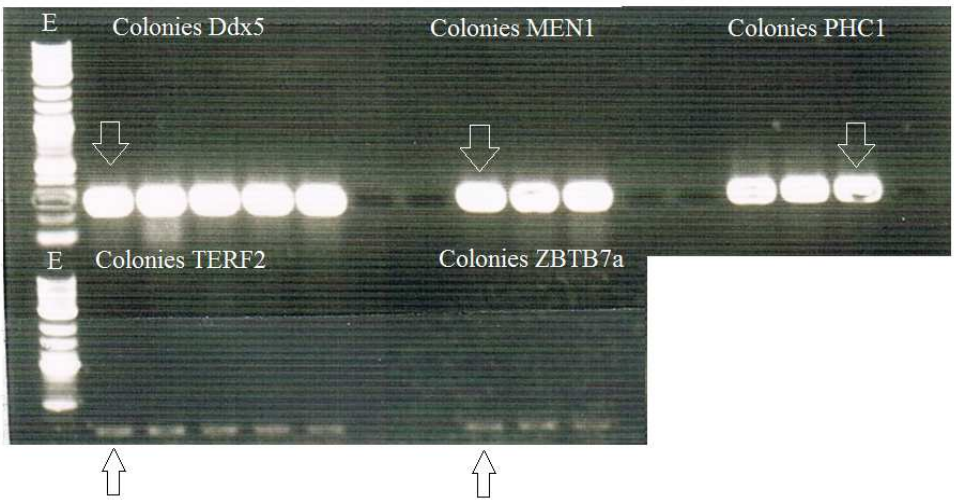


Figure 6 : PCR colonies pour pGEM-T-Ddx5, pGEM-T-MEN1, pGEM-T-PHC1 (haut du gel) et pGEM-T-TERF2 et pGEM-T-ZBTB7a (bas du gel).

Les flèches montrent la colonie à partir de laquelle nous avons ensuite extrait l'ADN plasmidique.

c'est un fragment de 280pb qui est attendu. C'est ce que nous retrouvons sur le gel (Figure 4 C et D). Ces deux gènes seraient donc également exprimés dans la muqueuse.

3. ZBTB7a

Dans le cas de ZBTB7a, nous devions amplifier un fragment de 299pb. Sur le gel, nous pouvons bien voir qu'il y a effectivement un unique fragment que l'on retrouve dans la muqueuse de chacun des deux rats et qui n'apparait pas pour le témoin négatif, ce qui permettrait de dire que ZBTB7a est lui aussi exprimé dans la muqueuse olfactive du rat, néanmoins la taille de cette bande apparait plus faible que celle attendue.

Ainsi, nous avons observé la présence d'une bande pouvant correspondre à l'expression dans les extraits d'ADNc de muqueuse olfactive de EIF2ak2, S100a6, NOL3 et TERF2 (Figure 4 A), de PHC1, ZBTB7a, MEN1 et Ddx5 (Figure 4 B), de TIMP3 et SOX2 (Figure 4 C) et enfin de RNF170 (Figure 4 D). Ces gènes candidats étaient ressortis de l'étude bio-informatique effectuée en amont de ce travail.

II. Production des clones et des sondes

1. Production des clones dans pGEM-T

Ensuite, nous avons inséré les fragments amplifiés dans un vecteur de clonage pGEM-T (Annexe 3) afin de transformer des bactéries avec ce plasmide recombinant. Puis, la réalisation de PCRs colonies à partir de 5 colonies ayant poussé sur les boites de Petri a permis de tester si elles avaient bien intégré un plasmide dans lequel s'est inséré le fragment d'intérêt. Sur les figures 5 et 6, nous pouvons voir que selon les clonages, les chances d'obtenir un clone recombinant sont plus ou moins bonnes : dans certains cas, 100% des colonies sont positives (Nol3, Ddx5), alors que certains autres clonages sont moins faciles (Timp3, Figure 5 C).
Dans certaines colonies, il n'y a pas d'amplification, dans d'autres un fragment s'amplifie, mais sa taille n'est pas conforme. Pour chacun des cas, nous avons finalement choisi une colonie positive (voir flèches, Figures 5 et 6) mise en culture, puis nous avons extrait l'ADN plasmidique des bactéries obtenues. Chacun des ADNc des gènes candidats que nous avions au départ ont pu être clonés, hormis S100a6 pour lequel nous n'avons pas pu obtenir de colonies.
Nous avons envoyé un échantillon de chaque plasmide recombinant extrait pour vérifier la séquence obtenue auprès d'un fournisseur (Beckmann Coulter Genomic).

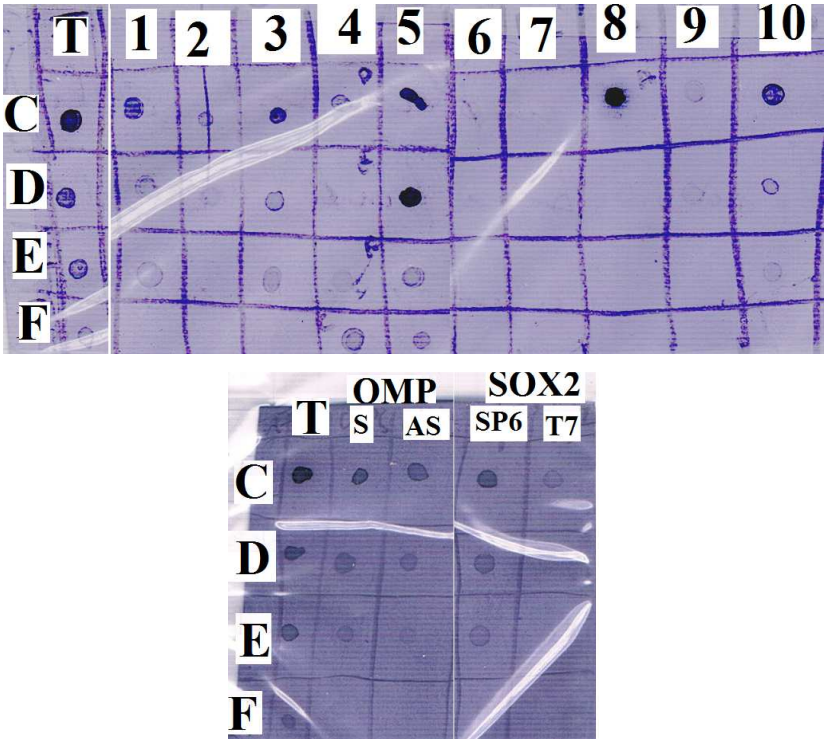


Figure 7 : Test des sondes SP6 et T7 sur membrane de Nylon Hybond N après dilutions successives. **C** : 0,01 ng/µl. **D** : 3 pg/µl. **E** : 1 pg/µl. **F** : 0,3 pg/µl. **T** : Sonde témoin du kit. En haut : MEN1 : SP6 => 1. T7 => 6 | DDX5 : SP6 =>2. T7 => 7 | PHC1 : SP6 => 3 T7 => 8. | TERF2 : SP6 =>4. T7 =>9. | ZBTB7a : SP6 =>5. T7 =>10. En bas : Sondes OMP, S : Sonde sens. AS : Sonde anti-sens, et sondes SOX2 SP6 et T7

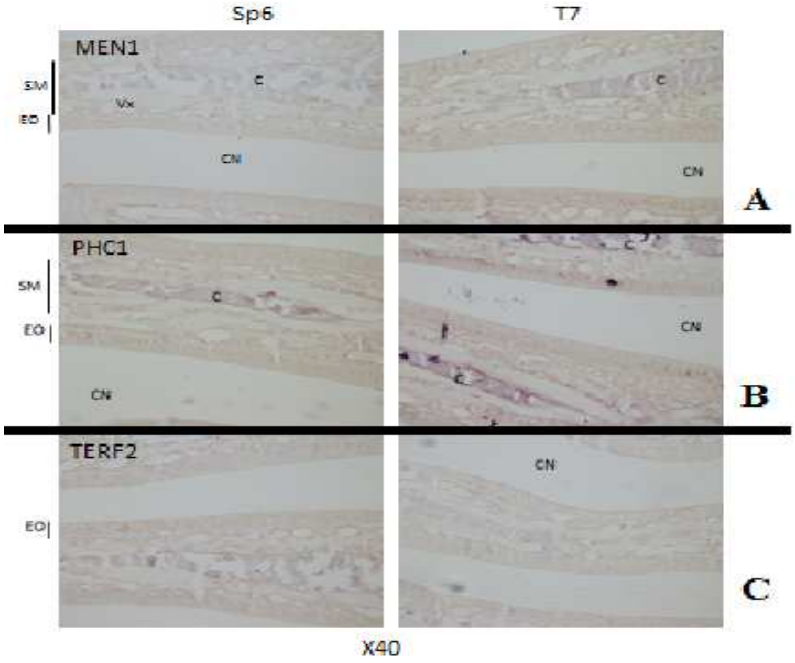


Figure 8 : Résultats d'Hybridation In Situ. Marquage avec les sondes SP6 (Sens) et T7 (Anti-sens) des ARNm MEN1 en A, PHC1 en B et TERF2 en C, dans l'épithélium olfactif (EO).
SM : Sous Muqueuse. CN : Cavité Nasale. Vx : Vaisseau sanguin. C : Cartilage

2. Production des sondes

L'ADN plasmidique a été linéarisé grâce aux enzymes de restriction dont le site de coupure est présent de part et d'autre du site d'insertion du fragment dans le vecteur pGEM-T. Après avoir vérifié la carte de restriction des inserts, nous avons notamment utilisé ApaI ou SacII pour couper le plasmide du côté du primer pour l'enzyme T7, et SpeI pour couper du côté SP6 de l'insert. Cette hydrolyse permet d'éviter que le plasmide soit aussi marqué lors de la production des sondes, ce qui peut créer du bruit de fond. Les digestions ont été vérifiées sur gel.

Nous avons ensuite procédé à la préparation des sondes ribonucléiques marquées au Dig-UTP avec le kit de marquage, Dig-RNA Labelling, de Roche. J'ai donc réalisé une transcription in vitro de l'ADN linéarisé en présence de digoxigénine-11-dUTP. J'ai ainsi obtenu les sondes sens et anti-sens produites respectivement par transcription in vitro avec l'enzyme SP6 et l'enzyme T7, pour chacun des gènes candidats, que j'ai ensuite utilisés pour l'HIS.

Avant d'utiliser les sondes j'ai testé le marquage de celles-ci en effectuant plusieurs dilutions successives des sondes puis en les spottant sur membrane de Nylon Hybond N avant de ~~les~~ révéler le marquage, de la même façon que lors d'une HIS. Ce test sert à contrôler que les sondes sens et anti-sens ont un niveau de marquage équivalent. Il est visible que le marquage les sondes pour 5 des gènes à tester est plus faible que celui de la sonde témoin T (Figure 7). Cependant nous avons tout de même lancé le protocole d'HIS avec ces sondes.

III. Hybridation In Situ

Afin d'identifier dans quelles cellules de la MO sont exprimés les différents gènes candidats, nous avons réalisé une HIS avec les sondes sens et anti-sens que j'ai préparées. Au cours de celle-ci les ARNm des gènes candidats sont révélés grâce au NBT/BCIP, substrat de l'AP après ajout d'un anticorps anti-Dig, qui se fixe aux sondes marquées à la digoxigénine et auquel l'AP est associée. Ces ARNm apparaissent donc dans le tissu observé au microscope sous la forme d'un marquage de couleur marron.

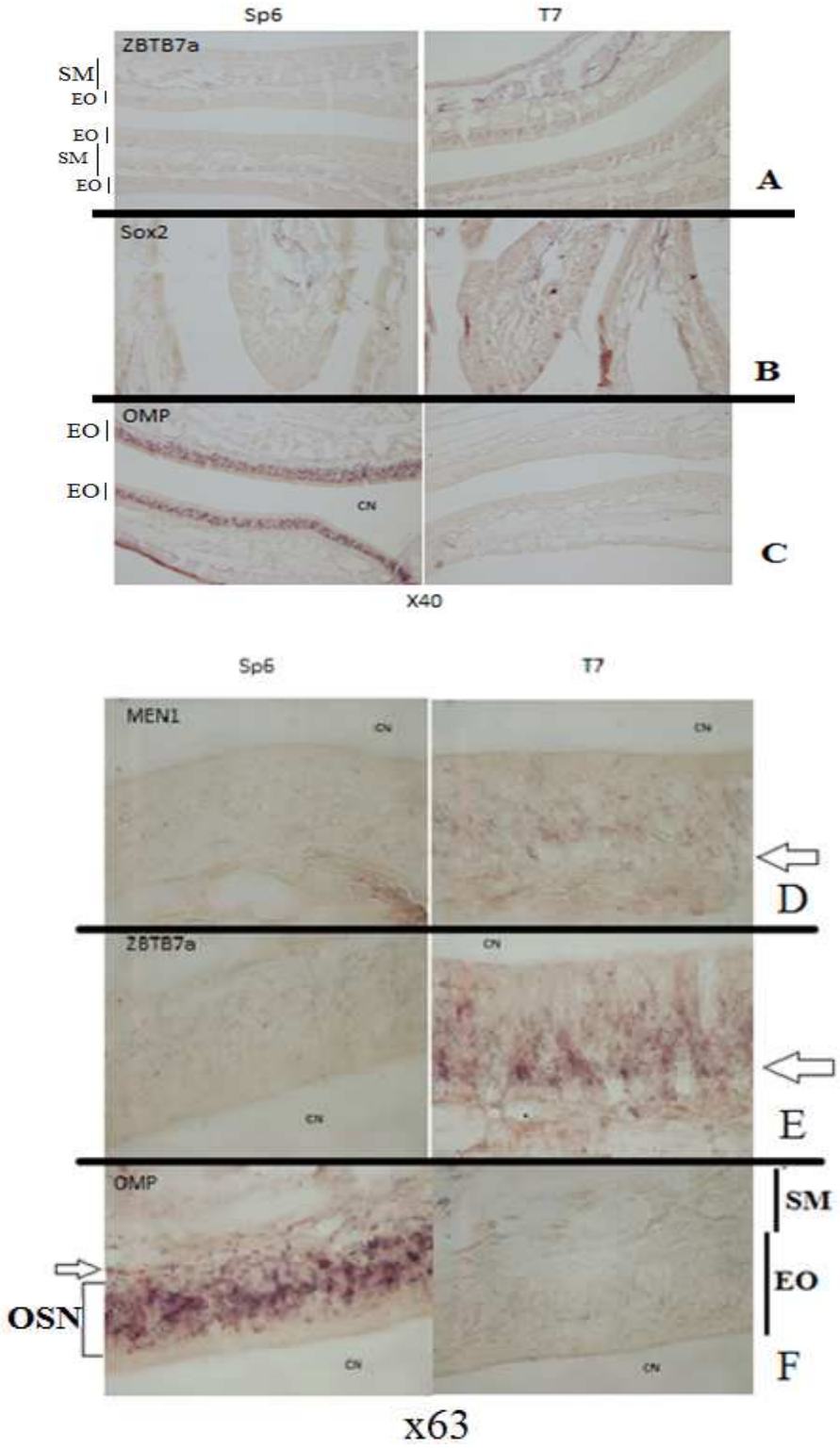


Figure 9 : Résultats d'Hybridation In Situ. Marquages avec sondes SP6 (sens) et T7 (anti-sens) des ARNm ZBTB7a en A, SOX2 en B (le marquage SOX2 est fait sur une muqueuse de souris) et OMP (pour lequel la sonde SP6 est anti-sens) dans l'épithélium olfactif (EO).
Même chose ensuite pour MEN1, en D, ZBTB7a et OMP à un plus fort grossissement (x63), respectivement en E et en F. SM : Sous Muqueuse. CN : Cavité Nasale MEN1 en A, ZBTB7a en B et OMP en C dans l'épithélium olfactif (EO). OSN : Olfactory Sensory Neurons (Neurones olfactifs matures). SM : Sous Muqueuse. CN : Cavité Nasale. Les flèches blanches montrent la zone où se trouvent les cellules basales.

Nous avons réalisé l'HIS pour chaque gène sur des coupes de MO de rat, sauf pour SOX : le BLAST de la séquence obtenue par séquençage du fragment cloné donnait un résultat plus proche de la souris que du rat. Nous avons donc choisi d'effectuer le marquage SOX2 sur MO de souris.

Les Figures 8 et 9 présentent les résultats que nous avons obtenus. Le marquage OMP sert en quelque sorte de contrôle de marquage. En effet, c'est un marqueur connu des neurones olfactifs matures. Comme attendu on observe un marquage très prononcé au niveau des neurones avec la sonde anti-sens SP6 alors qu'il n'y a pas de marquage avec la sonde sens T7.

Aucun marquage n'est détecté avec les sondes MENI, PHCI et TERF2. Ceci pourrait être du au trop faible marquage des sondes (Figure 8). La comparaison entre le niveau de marquage obtenu pour l'OMP et celui obtenu pour les autres gènes montre en effet un marquage faible de ces sondes. Il en est de même pour les sondes ZBTB7a et SOX2 (figure 9A et 9B). Par contre, une différence de marquage est observable dans la MO, pour les gènes MEN1 et ZBTB7a (Figure 9 D et 9 E). Il n'y a en effet aucun marquage avec la sonde sens SP6 alors des cellules semblent être marquées avec la sonde anti-sens T7. Il est néanmoins difficile de dire si ce marquage est réellement présent dans les cellules basales.

Discussion

Si l'analyse par PCR~~s~~ de l'expression dans la MO des 11 gènes candidats choisis semble indiquer l'expression de chacun de ces gènes au sein de ce tissu, il n'a cependant pas été possible de conduire l'étude pour tous jusqu'au marquage par HIS. En effet, suite à des problèmes, à différents niveaux, l'HIS de certains de ces gènes n'a pas pu être réalisée.
Par exemple, je n'ai pas pu obtenir de clones bactériens avec le plasmide contenant l'ADNc S100a6.
Pour EIF2ak2 et DDX5 ce sont des problèmes de séquences qui nous ont empêchés d'aller jusqu'à l'HIS. Pour EIF2ak2, le fragment envoyé~~e~~ au séquençage s'est révélé correspondre au BAC CH230-123A15 Rattus norvegicus au lieu du ADNc EIF2ak2 que nous cherchions à cloner.

Dans le cas de DDX5, il y a certainement eu une contamination du matériel avec un autre ADN lors de l'envoie au séquençage et il a été impossible d'obtenir une séquence lisible. Pour ces deux gènes, EIF2ak2 et DDX5 il serait donc intéressant de refaire un clonage depuis le début, peut être avec d'autres amorces plus spécifiques (pour EIF2ak2).

Pour TIMP3 les concentrations d'ADN après les digestions du plasmide se sont révélées très faibles et je n'ai pas eu assez de matériel pour tenter la production de sondes pour l'HIS. Il faudrait donc préparer une nouvelle culture d'un clone bactérien contenant le plasmide recombinant TIMP3 et en extraire l'ADN plasmidique avant de préparer des sondes d'HIS. Le problème que j'ai rencontré est certainement dû au fait que j'ai perdu beaucoup d'ADN à la dernière étape qui consistait en la récupération des culots, après centrifugation suite à la précipitation des plasmides linéarisés.

Pour ce qui est de l'HIS que j'ai pu réaliser pour les autres gènes, nous n'avons pas obtenu de marquage visible pour RNF170, NOL3, PHC1 et TERF2 (Figure 8). Cela pourrait vouloir dire que l'expression de ces gènes est très faible dans la MO ou bien qu'elle est tout simplement inexistante, ce qui ne semble pas être le cas, au vu des résultats obtenus par PCR sur la muqueuse. Il n'est pas étonnant d'obtenir des résultats d'expression positifs après PCR et négatifs après une HIS car la PCR est une technique beaucoup plus sensible que l'HIS. Ces quatre gènes sont donc sûrement peu exprimés au sein du tissu étudié. Le fait que les sondes produites possédaient un niveau de marquage faible pourrait expliquer l'absence de marquage observé sur les coupes pour ces gènes.

Par contre, pour MEN1 et ZBTB7a on observe un marquage avec la sonde anti-sens T7 dans l'EO. Il est possible que ce marquage soit présent au sein des cellules basales de la MO mais il est difficile de l'affirmer avec les résultats que j'ai obtenus ici. Il faudrait donc renouveler les expériences de marquage par HIS pour avoir confirmation de l'expression de ces deux gènes dans les cellules progénitrices de la MO.

Le gène SOX2 quant à lui n'a pas pu être étudié correctement car l'étude des séquences clonées par blast a montré la présence d'une séquence retrouvée normalement au niveau de l'ADNc souris (et pas chez le rat) au milieu de l'insert cloné à partir d'ADN génomique de rat. Pour vérifier les séquences de l'insert par BLAST, j'ai pris comme référence l'ADNc SOX2. Mon résultat surprenant peut peut-être être expliqué par un épissage différent des pré -messagers entre les espèces murine et rat. Afin de s'affranchir de la gêne que la présence de cette séquence pourrait apporter à l'HIS, nous avons testé les sondes produites pour SOX2, sur des coupes de muqueuses de rat et de souris, mais nous n'avons pas pu obtenir de marquage spécifique dans la MO de ces deux espèces. Là encore le faible niveau de marquage des sondes peut expliquer ce résultat.

Conclusion :

Après validation de SOX2, il est prévu que les plasmides que j'ai produits soient utilisés dans l'équipe afin de réitérer les expériences de marquage par HIS et conclure sur l'expression de ces gènes par les cellules d'intérêt, ce qui fournira de nouveaux marqueurs de ces cellules et permettra de faire des hypothèses sur leur rôle dans la différentiation de ces cellules. Un travail analogue accompli sur un modèle de poisson, par l'équipe de Gif-sur-Yvette permettra de savoir si l'expression de ces gènes est conservée dans l'évolution, ce qui renforcerait l'hypothèse d'un rôle possiblement important.

Bilan :

La conduite de ce projet de recherche pendant deux mois m'a permis de découvrir réellement ce qu'est le monde de la recherche biologique et comment se passe la vie d'un laboratoire comme NOeMI. Cela m'a également permis de me rendre compte de l'investissement que la mise en œuvre d'une étude comme celle-ci demande. J'ai aussi pu développer mes compétences d'une part au niveau de l'écoute et du travail d'équipe en laboratoire, et d'autre part au niveau de l'organisation personnelle et de l'autonomie qui est nécessaire à la réalisation d'un stage comme celui que j'ai effectué.

Enfin l'étude bibliographique et la rédaction du rapport sont aussi une partie importante du travail pour le stage tout comme l'est la rédaction des publications pour le laboratoire.

Cette expérience professionnelle a donc été très enrichissante et me semble être un bon complément aux enseignements théoriques dispensés durant l'année de Master 1.

Références bibliographiques :

- DeMaria S, Ngai J (2010)

The cell biology of smell.

***The Journal of Cell Biology* 191 : 443-452**

- Goldstein BJ, Schwob JE (1996)

Analysis of the globose basal cell compartment in rat olfactory epithelium using GBC-1, a new monoclonal antibody against globose basal cells.

***The* Journal of Neuroscience 15;16(12):4005-16.**

- Guo Z, Packard A, C. Krolewski R, T. Harris M, L. Manglapus G, E. Schwob J (2010)

Expression of PAX6 and SOX2 in adult olfactory epithelium.

***Journal of Comparative Neurology* 1 : 518(21) : 4395-4418**

- Ikeda K, Kageyama R, Suzuki Y, Kawakami K (2010)

Six1 is indispensable for production of functional progenitor cells during olfactory epithelial development

***The International Journal of Developmental Biology* 54(10):1453-64**

- Iwai N, Zhou Z, Roop D.R, Behringer R. R (2008)

Horizontal Basal Cells Are Multipotent Progenitors in Normal and Injured Adult Olfactory Epithelium

***StemCells*, 26 : 1298–1306**

- Knobloch M, Jessberger S (2011)

Perspectives on adult neurogenesis.

***European Journal of Neuroscience*, Vol. 33, pp. 1013–1017**,

- Knobloch M, Braun S. M. G, Zurkirchen L, von Schoultz C, Zamboni N, Arauzo-Bravo M.J, Kovacs W. J, Karalay Ö, Suter Ueli, Machado R.A.C, Roccio M, Lutolf M. P, Semenkovich C.F, Jessberger S (2013)

Metabolic control of adult neural stemcell activity by Fasn-dependent lipogenesis

***Nature* Vol 493, 226-230**

- Krolewski R. C, Packard A, Schwob J. E (2013)

Global expression profiling of globose basal cells and neurogenic progression within the olfactory epithelium

***The Journal of Comparative Neurology* 1;521(4):833-59**

- Mackay-Sim A (2010)

Stem cells and their niche in the adult olfactory mucosa

***Archives Italiennes de Biologie*, 148: 47-58**

- Matkar M, Thiel A, Hua X (2013)

Menin : a scaffold protein that controls gene expression and cell signalling

***Trends in Biochemical Sciences* S0968-0004(13)00091-1**

Annexe 1 : Liste des gènes candidats sur lesquels cette étude a porté

uence clonée	Nom complet du gène	Fonction de la protéine codée
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2	Facteur de transcription
TIMP3	TIMP Metallopeptidase 3	Metallopéptidase
EIF2ak2	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 alpha kinase 2	Protéine Sérine/Thréonine kinase
RNF170	Ring Finger Protein 170	Protéine en doigt de Zinc
S100a6	S100 Calcium Binding Protein A6 (Calcicyclin)	Fixation des ions Calcium
NOL3	Nucleolar Protein 3	Régulation de l'apoptose
DDX5	Dead (Asp-Glu-Ala-Asp) box Helicase 5	Helicase ATP-dépendante / Coactivateur transcription
MEN1	Multiple Endocrine Neoplasia 1	Suppresseur de tumeur
PHC1	Polyhomeotic Homolog 1	Remodelage de la chromatine (Polycomb family)
TERF2	Telomeric Repeat Binding Factor 2	Liaison aux télomères
ZBTB7a	Zinc finger and BTB domain containing 7a	Répresseur transcriptionnel

Annexe 2 : Solutions utilisées

SSC, Sodium Citrate buffer: 150 mM NaCl, 15 mM Na3Citrate, 2H2O

Proteinase K Buffer - 0.1M Tris pH 8.0, 50mM EDTA -> total 75ml
7.5ml 1M Tris
7.5ml 0.5 EDTA (pH 8.0)
60ml eau DEPC

TEA: 0.1M triethanolamine, pH 8.0 (TEA)

3.7 g TEA dans 200ml H_2O DEPC, pH 8.0

TEN buffer
5ml Tris-HCl 1.0M pH 7.5
30ml NaCl 5M
1ml EDTA0.5M

RNase Buffer = NaCl 0.5M, Tris 10mM, pH 7.5, EDTA 1mM
29.23g NaCl
10ml Tris 1M
2ml EDTA 0.5M
Faire 1L avec H_2O DEPC

0.05% Triton X-100/2% Blocking reagent/SSC 2X
0.325 ml 10% Triton X
13 ml 10% Blocking reagent
6.5 ml SSC 20X
45.2 ml eau MQ

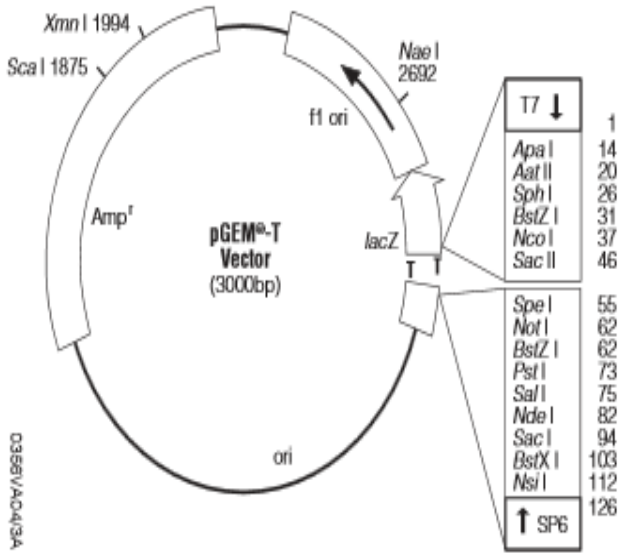
0.3% Triton X-100/1% Blocking reagent/Maleate buffer 1X
0.6 ml 10% Triton X
2 ml 10% Blocking reagent
4 ml Maleate Buffer 5X
13.4 ml DepC water

Maleate buffer 5X- (diluer 200ml dans 800ml d'eau pour obtenir du 1X)
Dans 850 ml eau MilliQ, dissoudre 58.0g Maleic Acid
Ajuster le pH à 7.5 en utilisant des "billes" de NaOH et ajouter 43.8g NaCl
Rajouter de l'eau pour faire 1L

Blocking solution
Dissoudre Blocking reagent dans Maleic acid buffer à une concentration finale de 10% (w/v) avec agitation et chauffage. Autoclaver la solution stock.

Tampon de détection: Tris 100mM pH 9.5, NaCl 100mM, $MgCl_2$ 50mM avec levamisole 1mM
5 ml $MgCl_2$ 1M
10 ml Tris/NaCl 10X
85 ml MQ H_20
0.024 g levamisole

Annexe 3 : Carte du pGEM-T



pGEM®-T Vector Sequence reference points:

T7 RNA Polymerase transcription initiation site	1
multiple cloning region	10–113
SP6 RNA Polymerase promoter (–17 to +3)	124–143
SP6 RNA Polymerase transcription initiation site	126
pUC/M13 Reverse Sequencing Primer binding site	161–177
lacZ start codon	165
lac operator	185–201
β-lactamase coding region	1322–2182
phage f1 region	2365–2820
lac operon sequences	2821–2981, 151–380
pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site	2941–2957
T7 RNA Polymerase promoter (–17 to +3)	2984–3

Carte du vecteur pGEM-T utilisé pour le clonage. Le vecteur contient entre autres le gène de résistance à l'ampicilline et des sites de coupure pour un certain nombre d'enzymes de restriction, du côté correspondant au site de liaison de la transcriptase T7 et SP6 de part et d'autre de l'insert. Ces enzymes servent au clonage et sont utilisées pour la linéarisation du plasmide avant marquage.