

Université de Montréal

Mise au point d'une nouvelle approche
permettant la génération de délétions chevauchantes
sur le chromosome X des cellules ES

Par
Nadine Fradet

Programme biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences
en Biologie Moléculaire

Août 2004

Copyright, Nadine Fradet, 2004



QH

506

U54

2005

V.003

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:
Mise au point d'une nouvelle approche
permettant la génération de délétions chevauchantes
sur le chromosome X des cellules ES

Présenté par : Nadine Fradet

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Président-rapporteur : Éric Milot

Directeur de recherche : Guy Sauvageau

Membre du jury : Trang Hoang

Résumé Français

Les cellules ES murines peuvent être maintenues indifférenciées *in vitro* en présence d'un inhibiteur de la différenciation Leukemia Inhibitory Factor (LIF). En absence de LIF, les cellules ES se différencient en structures appelées corps embryoïdes (EB). Les EBs contiennent une variété de types cellulaires incluant des progéniteurs endothéliaux et hématopoïétiques. Mon projet consiste à déléter une région précise du génome afin d'identifier de nouveaux déterminants géniques impliqués dans la différenciation hématopoïétique et dans le développement.

La technique utilisée pour y arriver consiste à utiliser le système de recombinaison médiée par le recombinaise Cre. Un premier site loxP est introduit par recombinaison homologue dans les cellules ES à un endroit précis dans le génome sur le chromosome X. Une série de deuxièmes sites loxP sont introduits en trans de façon aléatoire par infection rétrovirale. La recombinaison entre ces sites induite par la Cre produit une série de délétions chevauchantes. La taille des délétions est estimée par la perte de marqueurs géniques. Les clones identifiés sont différenciés en corps embryoïdes et introduits dans des blastocystes, afin de détecter un phénotype anormal *in vitro* et *in vivo*. Le gène responsable sera éventuellement caractérisé par complémentation.

Mots clés :

Cellules souches embryonnaires, corps embryoïdes, LIF, hématopoïèse, développement embryonnaire, la technologie Cre/loxP, délétions chevauchantes, chromosome X, locus BTK, rétrovirus

English abstract

Mouse ES cells can be maintained in an undifferentiated state, in vitro, in the presence of LIF (leukemia inhibitory factor), an inhibitor of differentiation. Without LIF, ES cells will differentiate into structures known as embryoid bodies (EB). EBs contains a variety of different cell types. In my project, I wanted to delete a specific genomic region in order to identify genes involved in the haematopoietic commitment and differentiation.

We propose to use the Cre/loxP system to generate large deletions in ES cells. The first loxP site is introduced by homologous recombination on the X chromosome. The second loxP site is introduced randomly by retroviral integration. Thereafter, addition of the Cre recombinase generates a series of deletions between the 2 loxP sites activating the transcription of a selectable gene and resulting in a set of nested deletions. The interesting clones will be differentiated into EBs and introduced into blastocysts. The targeted region of a clone with an abnormal phenotype will be characterized.

This approach will permit the deletion of specific regions of the X chromosome allowing for the possibility of a large scale functional screen in ES cells.

Key words:

Embryonic stem cells, embryoid bodies, LIF, hematopoiesis, embryonic development, cre/loxP technology, nested deletions, X chromosome, BTK, retroviruses

Table des matières

Résumé (Français)	iii
Abstract (English)	iv
Table des matières	v
Liste des Tables	vii
Liste des Figures	viii
Liste des Abréviations	x
Remerciement	xii
Chapitre 1: Introduction	1
1. Hématopoïèse et cellules souches embryonnaires	2
1.1 Propriétés des cellules souches embryonnaires.....	2
1.2 L'autorenouvellement des cellules ES	3
1.3 Développement hématopoïétique chez la souris	5
1.4 Différenciation hématopoïétique dans les cellules ES	7
1.5 Possibilités offertes par les cellules ES.....	11
2. Réarrangements chromosomiques définis dans les cellules ES	16
2.1 Le système de recombinaison Cre/loxP	16
2.2 Délétions chevauchantes	21
3. Le chromosome X	26
3.1 Hématopoïèse et chromosome X	26
3.2 Chromosome X et épigénétique	30
Chapitre 2: Présentation du projet, Matériels et méthodes et Analyse des résultats	32
1. Présentation du projet	33
1.1 But général	33
1.2 Stratégie utilisée.....	34
1.3 Choix du locus.....	35
2. Matériels et méthodes	37

2.1 Construction du vecteur de ciblage	37
2.2 Ciblage des cellules ES et analyse des clones par Southern blot	39
2.3 Caryotypage des cellules ES ciblées	41
2.4 Vérification de la compatibilité des cassettes de la nouvelle génération de virus	41
2.5 Infection rétrovirale.....	42
3. Analyse des résultats	43
3.1 Construction du vecteur de ciblage	43
3.2 Ciblage par recombinaison homologue.....	44
3.3 Caryotype des clones	46
3.4 Autres digestions pour les clones 92 et 134	48
3.5 Test de la nouvelle cassette qui sera utilisée pour produire les délétions sur le clone ciblé	48
 Chapitre 3: Discussion et conclusion	52
1. Choix du locus Btk sur le chromosome X	53
2. Conception du vecteur de ciblage	53
3. Ciblage par recombinaison homologue dans les cellules ES	54
4. Infection rétrovirale et complexité	55
5. Test de la nouvelle cassette pour l'infection rétrovirale	57
6. Autres locus sur le chromosome x éventuellement ciblés	58
7. Méthodes alternatives.....	60
 Références	62
 Annexe I	i
Annexe II.....	vii
Annexe III	x
Annexe IV	xv

Listes des tables

Table 1 : Nombre de colonies puro^r après action de la Cre dans les cellules avec la construction à tester

Table 2 : Méthodes alternatives pour produire des délétions

Table 3 : Locus du chromosome X disponibles dont la construction pour le ciblage est presque terminée

Listes des figures

- Figure 1 : Les cellules ES peuvent s'auto renouveler ou se différencier
- Figure 2 : Développement hématopoïétique à partir de cellules ES
- Figure 3 : Marqueurs impliqués dans la différenciation
Hématopoïétique des corps embryoides
- Figure 4 : Stratégie pour produire des souris chimères à partir
de cellules ES modifiées
- Figure 5 : Mécanisme de recombinaison par la Cre et la Flp
- Figure 6 : L'action des recombinases Cre et Flp dépend de
l'orientation et de la location des sites spécifiques
(loxP et FRT)
- Figure 7 : Efficacité décroissante de la recombinaison par la Cre avec
la distance génétique
- Figure 8 : Délétions chevauchantes
- Figure 9 : Activation d'un gène de sélection après recombinaison
- Figure 10 : Stratégie utilisée par LePage DF et al. pour produire
des délétions chevauchantes sur le chr 2
- Figure 11 : Stratégie utilisée par Su H et al. pour produire
des délétions chevauchantes sur les chromosomes X et 11
- Figure 12 : Gènes impliqués dans le système hématopoïétique
présents sur le chr X
- Figure 13 : Stratégie utilisée pour produire les délétions
- Figure 14 : Gènes et marqueurs dans la région distale au locus BTK
- Figure 15 : Étapes menant à la construction du vecteur de ciblage
- Figure 16: Construction pour tester les cassettes
- Figure 17 : Locus BTK et conception du vecteur de ciblage
- Figure 18 : Southern blot démontrant la recombinaison homologue
des clones #48 et 53

- Figure 19 : Southern blot démontrant la recombinaison homologue des clones #201, 205 et 206
- Figure 20 : Southern blot démontrant l'intégration unique des clones #48 et 53
- Figure 21 : Southern blot démontrant l'intégration unique des clones # 201, 205 et 206
- Figure 22 : Caryotype du clone #92
- Figure 23 : Autre digestion des clones 92 et 134
- Figure 24 : Construction pour tester les cassettes
- Figure 25 : Construction de la troisième génération de rétrovirus

Listes des abréviations

ES :	Embryonic Stem cells
ICM:	Inner Cell Mass
mES :	Cellules ES murines
Lif :	Leukemia Inhibitory Factor
MEF:	Mouse Embryonic Fibroblast
EB :	Embryoid Body
hES :	Cellules ES humaines
ADN :	Acide DéoxyriboNucléique
ARN :	Acide RiboNucléique
Bmp :	Bone Morphogenetic Protein
Id :	Inhibitor of Differentiation
Gdf:	Growth and Differentiation Factor-6
BIO :	6-bromoindirubin-3'-oxime
Gsk-3 :	kinase-3 glycogène synthase
Jour eX :	embryonnaire murin
BL-CFC:	Blast Colonies Forming Cells
Vegf :	Vascular Endothelial Growth Factor
P-Sp :	Para-aortique-splanchnopleure
AGM :	Aorte-Gonade-Mésonephros
HSC :	Hematopoietic Stem Cell
β H1 :	Hémoglobine embryonnaire
LTRSC:	Long Term Repopulating Stem Cells
CFTR :	Cystic Fibrosis Transmembrane Receptor
SSR :	Site-Specific Recombinase
Cre :	Cyclization REcombination
loxP:	locus of crossover (X) in P1
FRT :	Flp Recombinase Recognition Target
HPRT:	Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyl Transferase
HAT:	Hypoxanthine Amniopterin Thymidine

TK:	Herpes simplex Thymidine kinase
FIAU :	fialuridine
cM :	Centimorgans
Mb :	Megabases
BTK:	Bruton's Tyrosine Kinase
XLA :	X-linked agammaglobulinemia (humain)
<i>xid</i> :	X-linked immunodeficiency (souris)
Xic :	X-inactivation center
RT-PCR :	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
MoMLV :	Moloney Murine Leukemia Virus
STS :	Single-Tag Sequence
MSCV:	Murine Stem Cell proviral Vector
Neo:	Néomycine
Puro:	Puromycine
Hygro :	Hygromycine

Remerciements

J'aimerais en tout premier lieu remercier mon directeur Guy Sauvageau. J'aimerais également remercier particulièrement Mélanie Bilodeau, qui m'a énormément aidé et appris dans ce projet, Mélanie Fréchette pour l'irradiation des MEFs ainsi que Delphine Desprez pour la lecture et la correction du mémoire. Je remercie aussi tous les membres du laboratoire qui m'ont beaucoup supportée tout au long de ma maîtrise.

Chapitre 1:

Introduction

À l'heure actuelle, il y a plus de 35 000 gènes humains dont la séquence et la cartographie sont connues. Par contre, la fonction n'est disponible que pour environ 15% de ceux-ci. (Stanford WL et al. 2001). Plusieurs criblages à grande échelle sont présentement en cours dans le but d'assigner une fonction à chacun des gènes connus. La découverte de l'interrelation entre certains gènes et différentes maladies génétiques aidera à mieux les comprendre et ainsi faciliter le développement de nouveaux traitements. Plusieurs techniques de mutagenèse existent, chacune avec des avantages et des inconvénients différents. Une technique rapide et efficace est nécessaire dans le but d'assigner le plus grand nombre de phénotypes possibles.

1. Hématopoïèse et cellules souches embryonnaires

1.1 Propriétés des cellules souches embryonnaires

Les cellules souches embryonnaires (ES pour Embryonic Stem cells) proviennent de la masse cellulaire interne (ICM pour Inner Cell Mass) d'un blastocœle. Lorsqu'injectées dans un blastocœle, ces cellules sont pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de générer tous les types cellulaires.

Les cellules ES murines (mES) prolifèrent rapidement en culture et une population clonale peut facilement être générée (Smith A, 2001). Elles peuvent être modifiées génétiquement *in vitro* permettant la production de souris chimères.

Lorsqu'elles sont injectées dans un blastocœle ou mises en contact avec un embryon en développement au stade de 4 ou 8 cellules, les cellules ES participent à l'embryogenèse et contribuent aux différentes lignées cellulaires incluant la lignée germinale. Cependant, puisqu'elles proviennent de l'épiblaste, les cellules ES contribuent faiblement à l'endoderme extra embryonnaire et rarement au trophoblaste (Smith A, 2001).

La transplantation de cellules ES dans des souris adultes produit des tératocarcinomes (Smith A, 2001).

Les cellules ES maintiennent un caryotype diploïde. La majorité des lignées sont hémizygotes 40XY. Dans les lignées XX, tout comme dans l'épiblaste, les 2 chromosomes X sont actifs, une situation qui est apparemment instable pour la propagation des ES. Ainsi le génotype mâle confère un certain avantage pour la transmission de la lignée germinale (Smith A, 2001).

Les cellules ES ne présentent aucune évidence de sénescence contrairement aux autres cultures primaires. Elles sont généralement maintenues indifférenciées *in vitro* sur une couche de cellules nourricières (MEF pour Mouse Embryonic Fibroblast) et en présence de Lif (Weissman IL et al. 2000). En absence de Lif, elles se différencient en corps embryoïdes (Figure 1).

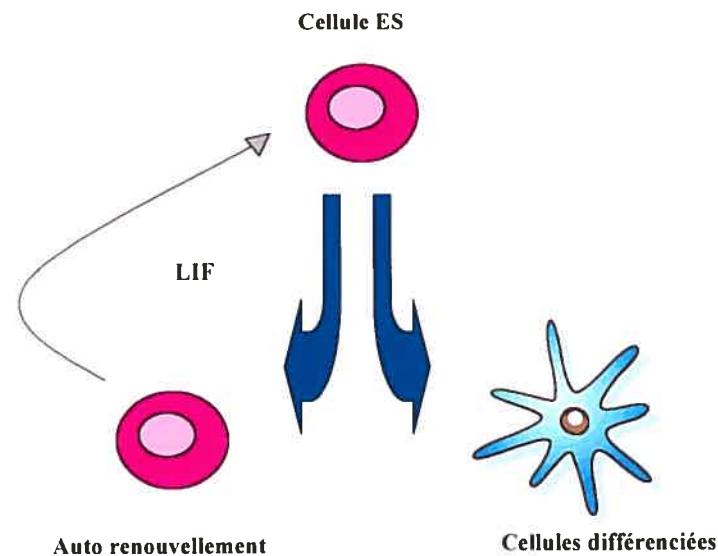


Figure 1: Les cellules ES peuvent s'auto renouveler ou se différencier

1.2 L'autorenouvellement des cellules ES

Le mécanisme d'autorenouvellement des cellules ES humaines (hES) et murines (mES) est encore peu connu.

La pluripotence des cellules mES en culture est maintenue à la fois par le Lif et par la présence de facteurs inconnus présents dans le sérum. Dans les cultures sans sérum, le Lif n'est pas suffisant pour bloquer la différenciation neuronale et maintenir la pluripotence (Temple S, 2003). Jusqu'à tout récemment, l'activation de Stat3 par le Lif était la seule voie de signalisation connue, impliquée dans l'autorenouvellement des cellules mES. Cette voie n'est cependant pas impliquée dans l'autorenouvellement des cellules ES humaines. De plus, l'inactivation du récepteur du Lif, le *gp130*, a démontré que l'expansion *in vivo* de l'épiblaste ne dépend pas du signalement *de ce récepteur* (Dani C et al. 1998), suggérant l'existence d'autres voies de signalisation essentielles.

Le groupe de Austin Smith (Ying QL et al., 2003) a démontré que la protéine Bmp (**B**one **m**orphogenetic **p**rotein) joue un rôle important dans le maintien de la pluripotence des cellules ES, en parallèle avec le Lif. Bmp induit l'expression des gènes Id (**I**nhibitor of **d**ifferentiation) par la voie de signalisation Smad. Les gènes Id des cellules ES sont induits par le sérum via plusieurs voies de signalisation. Dans des cultures sans sérum, Bmp ou Gdf-6 (**G**rowth and **d**ifferentiation **f**actor-6) bloquent l'activation de *Sox1* et la différenciation neuronale (Ying QL et al. 2003).

Oct-3/4 et Rex-1 sont des facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de la pluripotence des cellules mES. Des études récentes ont démontré que l'activation de la voie Wnt régulerait positivement l'expression de ces 2 facteurs. L'expression de Nanog (une protéine à homéodomaine nécessaire au maintien de la pluripotence des cellules ES) (Chambers I et al. 2003) serait aussi contrôlée par la voie Wnt. L'activation de cette voie serait suffisante pour maintenir l'auto renouvellement des cellules ES murines et humaines. Gsk-3 (**k**inase-3 **g**lycogène **s**ynthase) est un répresseur de la voie Wnt et son inactivation par le Bio (6-bromoindirubin-3'-oxime), un inhibiteur pharmacologique spécifique, maintient les cellules à un stade indifférencié permettant aux

cellules de conserver leurs caractéristiques pluripotentes (Sato N et al. 2004).

1.3 Développement hématopoïétique chez la souris

Le système hématopoïétique chez la souris est établi lors de l'embryogenèse primitive et fonctionne tout au long de la vie fœtale et adulte en produisant continuellement des cellules sanguines. Le placenta confère un environnement immunologique privilégié et l'embryon nécessite un apport accru en oxygène par le sang maternel. Le jeune embryon possède donc une production de lymphocytes plutôt déficiente. La première vague d'hématopoïèse se spécialise plutôt dans la production d'érythrocytes primitifs (embryonnaires), qui expriment un isoforme d'hémoglobine avec une affinité supérieure pour l'oxygène comparé à l'hémoglobine des érythrocytes définitifs (adultes) (Kyba M et al. 2003). Le développement hématopoïétique et endothélial débute au jour e7.5 (embryonnaire murin) dans le sac vitellin sous forme d'îlots sanguins. L'îlot sanguin est constitué de 2 types cellulaires : une population de cellules érythroïdes entourée d'une couche d'angioblastes, qui formeront éventuellement le système vasculaire. L'hypothèse que les lignées hématopoïétiques et endothéliales proviennent d'un précurseur commun provient d'études histologiques du sac vitellin. Plusieurs indications suggèrent que ce précurseur existe, mais son isolation n'a toutefois pas été possible *in vivo*. Des colonies multipotentes (BL-CFC : Blast Colonies Forming Cells) ont été dérivées à partir de corps embryoides. Après stimulation au Vegf (Vascular endothelial growth factor), des précurseurs aux potentiels à la fois hématopoïétiques et endothéliaux ont été générés à partir de cellules ES (Choi K, 1998, Keller G et al. 1999), suggérant que l'existence de ce précurseur commun *in vitro*.

La cellule souche hématopoïétique (HSC pour Hematopoietic Stem Cell) est capable de s'autorenouveler ou de se différencier et ainsi produire toutes les cellules du sang. Il y a 2 lignées hématopoïétiques

majeures, soit la lignée myéloïde (érythrocytes, plaquettes, macrophages et granulocytes) et la lignée lymphoïde (cellules B, T et NK). Les cellules souches hématopoïétiques fœtales et adultes sont capables de reconstituer le système hématopoïétique à long terme après injection dans le système sanguin d'un animal adulte. (Weissman IL, 2000).

L'activité hématopoïétique du sac vitellin (extra embryonnaire) chute rapidement entre les jours e10 et e12. Ce déclin coïncide avec les premiers signes d'hématopoïèse intra embryonnaire, initialement dans la région para-aortique-splanchnopleure (P-Sp) / aorte-gonadomésonephros (AGM), et ensuite dans le foie fœtal. La transition du sac vitellin au foie fœtal vers le jour e11 définit la transition entre l'érythropoïèse primitive et l'hématopoïèse définitive incluant l'érythropoïèse, la myélopoïèse et la lymphopoïèse (Keller G et al. 1999, Robertson S et al. 2000, Keller G et al. 1993). Durant la période néonatale, les précurseurs hématopoïétiques vont coloniser la moelle osseuse pour y demeurer tout au long de la vie (Keller G et al. 1993).

Les précurseurs du sac vitellin isolés avant le début de la circulation du sang dans l'embryon murin n'ont pas la capacité de reconstituer les cellules sanguines d'une souris adulte irradiée (Daley GQ, 2003). Cette incapacité à reconstituer le système hématopoïétique peut être due à l'immaturité du développement embryonnaire des cellules souches et à la différence de microenvironnement entre l'embryon et l'adulte. Les cellules souches multipotentes (lympho-myéloïdes) présentes dans le sac vitellin peuvent contribuer à l'hématopoïèse adulte seulement si elles ont été introduites dans la circulation fœtale par injection trans-placentale ou directement dans le foie immature d'un nouveau-né. Ceci suggère que les cellules souches du sac vitellin doivent subir une maturation dans un microenvironnement embryonnaire/fœtal afin d'avoir la capacité de reconstituer les cellules sanguines d'un animal irradié (Daley GQ, 2003, Kyba M et al. 2003).

1.4 Différenciation hématopoïétique dans les cellules ES

Les EBs semblent récapituler le développement embryonnaire de la souris, du moins pour plusieurs types cellulaires, et contiennent une variété de précurseurs, dont des progéniteurs hématopoïétiques et endothéliaux. Plusieurs lignées hématopoïétiques et endothéliales ont été générées *in vitro*, comme l'endoderme et le mésoderme du sac vitellin (Doetschman TC et al. 1985), les cellules de l'hématopoïèse primitive (Doetschman TC et al. 1985, Nakano T et al. 1996), celles de l'hématopoïèse définitive (Nakano T et al. 1996, Nishikawa SI et al. 1998, Wiles MV et al. 1991), des précurseurs lymphoïdes (Potocnik AJ et al. 1994) ainsi que des cellules endothéliales (Risau W et al. 1988, Yamashita J et al. 2000).

La première vague d'hématopoïèse dans les EBs récapitule le développement dans le sac vitellin, avec une majorité de cellules érythroïdes primitives nucléées exprimant la forme embryonnaire de l'hémoglobine ($\beta H1$). Apparaissent ensuite des cellules érythroïdes définitives et des macrophages, et enfin des progéniteurs myéloïdes (Keller G et al. 1999, Daley GQ, 2003). D'après l'étude d'expression des différents marqueurs, la réponse aux facteurs de croissance et la cinétique de développement, l'hématopoïèse dans les EBs semble être similaire au développement embryonnaire du sac vitellin (Keller G et al. 1993, Keller G et al. 1999) (Figure 2).

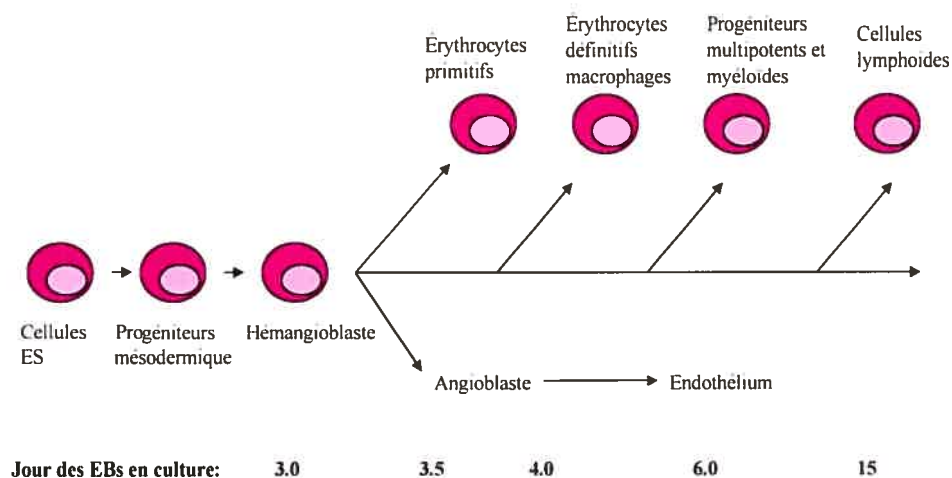


Figure 2: Développement hématopoïétique à partir de cellules ES

Comme pour la lymphopoïèse, les cellules souches capables de reconstituer à long terme un animal (appelées LTRSCs pour **L**ong **T**erm **R**epopulating **S**tem **C**ells) ne sont pas facilement détectables dans les EBs (Daley GQ, 2003). Jusqu'à maintenant, seulement quelques études ont démontré une repopulation à partir de précurseurs provenant de cellules ES. Dans la plupart des études, les gens ont de la difficulté à démontrer une reconstitution complète des différentes lignées (Daley GQ, 2003).

Par exemple, Ronald Palacios a publié une étude en 1995 où il a démontré une reconstitution partielle des lignées lymphoïdes, myéloïdes et érythroïdes après avoir transplanté des précurseurs triés Pgp-1+ Lin- provenant de cellules ES différenciées pendant 21 jours. Leur facteur F (une nouvelle cytokine sécrétée par la lignée stromale FLS4.1) jouerait un rôle important dans la génération de précurseurs hématopoïétiques multipotents *in vitro*. La transplantation dans des receveurs secondaires n'a pas été démontrée (Palacios R et al. 1995).

George Q Daley a introduit l'oncoprotéine Bcr/Abl dans les cellules ES en différenciation pour stimuler et multiplier les cellules souches hématopoïétiques. La leucémie associée à Bcr/Abl résulte en une

dominance clonale de HSC, conservant sa capacité de différenciation lymphoïde et myéloïde. Leur étude a démontré l'existence d'un précurseur commun dans les EBs capable d'érythropoïèse primitive et de lympho-myélopoïèse définitive (Peters DG et al. 2001, Perlingeiro RC, 2001).

La capacité du gène à homéodomaine Hoxb4 à induire l'expansion des cellules souches hématopoïétiques sans causer de leucémies a été démontrée (Sauvageau G et al. 1995, Antonchuk J et al. 2002, Kros J et al. 2003). G. Daley a montré récemment (Kyba M et al. 2002) une reconstitution des lignées lymphoïdes/myéloïdes dans les souris récipiendaires primaires et secondaires de cellules souches provenant des cellules ES. Pour y arriver, il a surexprimé Hoxb4 dans les EBs de jours 4 à 6, avant de les dissocier et de les placer sur la lignée stromale OP9 (lignée dérivée de la moelle osseuse de souris déficiente pour le gène *M-CSF*) (Kyba M et al. 2003).

Une étude réalisée par le groupe de Rudolf Jaenisch a démontré que la reconstitution et la réparation d'un défaut génétique à partir de précurseurs hématopoïétiques modifiés (le clonage thérapeutique) est possible. Le groupe de Jaenisch a voulu corriger le défaut génétique d'une souris Rag2^{-/-}. Il a donc créé une lignée de cellules ES Rag2^{-/-} à partir de cette souris déficiente par transfert nucléaire. Il a ensuite corrigé un allèle par recombinaison homologue. La lignée Rag2^{-/+} ntES (**n**uclear transfer ES) a ensuite été exposée à Hoxb4, avant d'être réintroduite dans le système sanguin d'une souris déficiente pour Rag2. Les souris ont démontré une reconstitution partielle (Rideout WM 3rd et al. 2002).

Au niveau moléculaire, le patron d'expression de plusieurs gènes a été associé à différents stades du développement *in vivo* et *in vitro* (Keller G et al. 1993). L'étude d'expression de marqueurs permet donc d'étudier et de corréliser les profils d'expression au cours du développement embryonnaire *in vivo* et *in vitro*. Par exemple, les membres de la famille Gata (un facteur de transcription à doigt de zinc)

sont actifs très tôt dans les cellules hématopoïétiques en développement. L'inactivation de Gata-1 (situé sur le chromosome X) par recombinaison homologue dans les cellules ES bloque la différenciation érythroïde *in vitro* et *in vivo*, démontrant que ce gène joue un rôle essentiel dans l'érythropoïèse. Ce gène est exprimé à partir du jour 4 de différenciation dans les EBs et à partir du jour e6.5 *in vivo* (Keller G et al. 1993, Robertson SM et al. 2000).

Jusqu'au jour 3 en culture, les EBs correspondent au stage prégastrulation d'un embryon murin, soit entre les jours e4.5 et e6.5. Entre les jours 3 et 5, les EBs contiennent des cellules correspondant au stade gastrulation soit entre e6.5 et e7.0. À partir du jour 6 *in vitro*, les EBs correspondent à l'organogenèse primitive (e7.5) et les EBs de jour 8 expriment des gènes impliqués dans la neurogenèse primitive (environ e8.8) (Leahy A et al. 1999) (Voir Figure 3). Il est à noter que certains marqueurs primitifs, comme Oct-3 et Fgf-5, qui sont normalement régulés négativement dans l'embryogenèse, sont apparemment présents jusqu'au jour 10 dans les EBs en culture, suggérant que quelques cellules indifférenciées persistent dans les EBs matures (Leahy A et al. 1999).

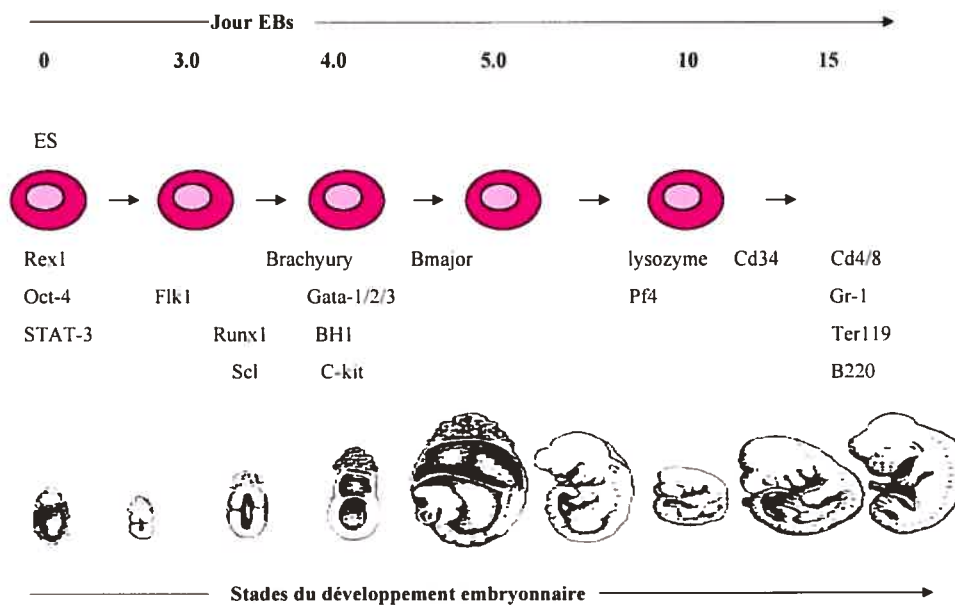


Figure 3: Marqueurs impliqués dans la différenciation hématoïétique des corps embryoides.

1.5 Possibilités offertes par les cellules ES

La production de souris chimères par injection de cellules ES dans un blastocœle décrite par Richard Gargner et Ralph Brinster a ouvert la porte à un nombre inestimable de nouvelles possibilités. Oliver Smithies et Mario Capecchi ont ensuite mis au point la méthodologie permettant la mutation de gènes par recombinaison homologe dans les cellules ES, permettant ainsi une nouvelle génération de mutagenèse ciblée chez la souris (Tam PP et al. 2003). Les souris chimères sont aujourd'hui un outil couramment utilisé dans les laboratoires afin d'étudier les effets biologiques de différentes modifications génétiques (Babinet C et al. 2001).

Il existe présentement deux méthodes pour produire des souris chimères. La première est la micro-injection et la seconde est l'agrégation (Wood SA et al. 1993). La micro-injection est la méthode la plus utilisée jusqu'à maintenant : elle consiste à injecter 10-15 cellules ES (modifiées génétiquement ou non) dans un blastocœle, qui est ensuite transféré dans une souris receveuse. Cette technique comporte quelques limitations,

dont la majeure est le coût de production et le temps nécessaire afin d'acquérir la dextérité requise à l'injection (Wood SA et al. 1993). Depuis quelques années, il existe une méthode alternative basée sur la capacité des cellules ES à s'agréger avec un morulae (embryon en développement à un stade très primitif constitué de quelques cellules seulement). Il suffit de mettre en contact 2 populations de cellules et de les laisser se développer au stade blastocœle, et les quelques blastocœles ayant réussi à se développer seront réimplanté dans une mère receveuse. À ce stade embryonnaire très primitif, les cellules n'ont pas encore de restriction pour se différencier, donc les cellules vont contribuer également aux différentes lignées. L'avantage majeur de cette technique est le nombre considérable d'embryons qui peut être produit. L'efficacité des deux techniques est relativement semblable (Wood SA et al. 1993, Tam PP et al. 2003).

La possibilité d'introduire des modifications génétiques dans la lignée germinale de la souris a longtemps été un outil grandement rêvé des chercheurs étudiant le développement murin. La méthode de micro-injection généralement utilisée pour produire des souris chimères avec certaines modifications génétiques est décrite dans la Figure 4 (Yu Y et al. 2001).

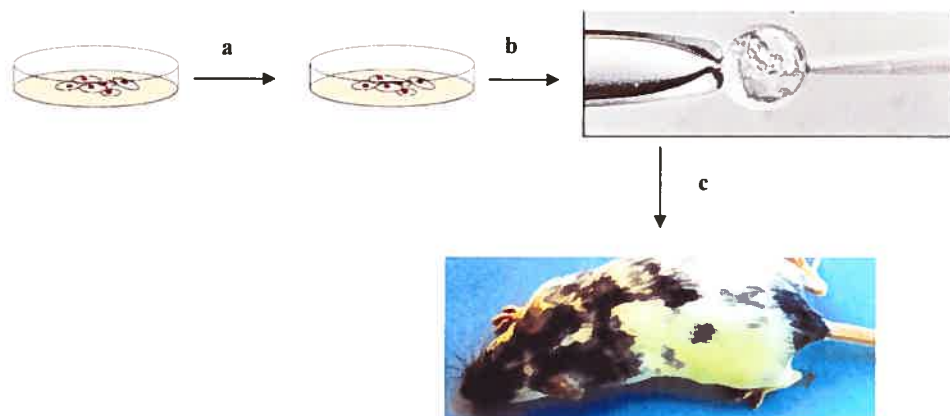


Figure 4: Stratégie pour produire des souris chimères à partir de cellules ES modifiées

- a- Les cellules ES sont modifiées génétiquement *in vitro*.
- b- Les cellules contenant le réarrangement désiré sont identifiées et caractérisées et les cellules ES sélectionnées sont injectées dans un blastocœle de 3.5 jours. L'embryon va être transféré dans une mère receveuse.
- c- Les souris chimères générées sont croisées avec les souris sauvages afin de permettre la transmission de la lignée germinale du génome modifié. La progéniture provenant des chimères est caractérisée.

Il est maintenant possible de créer des souris ayant des mutations nulles pour la plupart des gènes clonés (sauf les gènes létaux, voir mutagenèse conditionnelle plus loin). Au cours des dernières années, d'autres types de modifications ont été rendus possibles, ce qui a révolutionné l'approche génétique pour l'étude du développement de la souris. Les modifications génétiques possibles dans les cellules ES par recombinaison homologue sont décrites ci-dessous (Babinet C et al. 2001).

- I. Inactivation d'un gène par recombinaison homologue (Knock-out)
 - II. Introduction d'un gène spécifique (un autre gène ou le même gène modifié) à la place du gène ciblé (Knock-in). Dans ce cas, des mutations ponctuelles, des microdélétions ou des microadditions peuvent être générées.
 - III. Mutagenèse conditionnelle
 - IV. Réarrangements chromosomiques (délétions, inversions, translocations)
- I. Les cellules de mammifères possèdent le matériel enzymatique nécessaire à la recombinaison entre une séquence d'ADN exogène et une séquence homologue à celle-ci sur un chromosome. L'inactivation d'un gène cible par recombinaison homologue est donc possible dans les cellules ES. Cette recombinaison spécifique est relativement rare comparée à l'incorporation aléatoire d'une séquence dans le génome (Babinet C et al. 2001). Cela permet toutefois d'inactiver un gène cible sur un allèle pour en étudier le phénotype. En croisant les souris

hétérozygotes produites à partir des cellules ES modifiées, il est possible d'obtenir des souris nulles pour le gène ciblé.

II. L'introduction d'un gène spécifique (un autre gène ou le même gène modifié) à la place du gène ciblé est une variante très intéressante du ciblage par recombinaison homologe. Elle permet entre autre de remplacer un gène par un autre ou de créer des mutations spécifiques (des mutations ponctuelles, des microdélétions ou des microadditions) afin d'étudier les effets fonctionnels de différente(s) variante(s) du gène. Ceci permet également de générer des modèles animaux de certaines maladies humaines où les gènes mutés sont connus. Par exemple, le Knock-in de CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Receptor) (Riordan JR et al. 1989) a permis de reproduire la fibrose kystique avec haute précision (60% des mutations chez l'humain sont de type ΔF 508, ce qui correspond à une délétion d'un seul acide aminé).

Les modifications génétiques décrites précédemment ont toutefois leur limitation pour les raisons suivantes :

- 1) Si la mutation produite est essentielle pour le développement embryonnaire au stade homozygote (dans le cas extrême, peut être nécessaire pour la survie des cellules), il sera impossible d'étudier la fonction du gène après le stade auquel la mutation est létale et par conséquent au stade adulte.
- 2) Un gène peut avoir une expression ubiquitaire et donc son inactivation peut provoquer un phénotype complexe affectant plusieurs tissus rendant ainsi l'interprétation du phénotype difficile.

III. Pour surmonter ces difficultés, différentes équipes ont mis sur pied une stratégie permettant de rendre l'expression de la mutation ciblée conditionnelle (Babinet C et al. 2001). Cette stratégie est basée sur le système de recombinaison à des sites spécifiques, comme le système Cre/loxP ou Flp/FRT. La mutation ciblée est placée entre 2 sites spécifiques (loxP ou FRT) et donc le gène inactivé est recombiné seulement lorsque la recombinase appropriée est exprimée. L'enzyme

engendre une recombinaison entre les 2 sites spécifiques inactivant le gène cible dans le tissu désiré. Il existe des souris transgéniques exprimant la Cre dans différents tissus, donc il est possible de croiser les souris chimères avec ces souris afin de repérer le phénotype de la mutation dans le(s) tissu(s) désiré(s). Il est aussi possible d'utiliser un système d'expression inductible de la recombinaison. Un système fréquemment utilisé exploite les propriétés de l'opérateur/répresseur de l'opéron bactérien *tetracycline (tet)*. Cette stratégie peut être utilisée afin de contrôler l'expression de la recombinaison au niveau temporel et spatial (Babinet C et al. 2001).

IV. De multiples réarrangements chromosomiques peuvent être générés dans le génome des cellules ES, comme entre autre des délétions de quelques nucléotides à plusieurs kilobases, des inversions et des translocations. Les enzymes recombinaison Cre et Flp sont très utiles pour produire des recombinaisons à des sites spécifiques.

2. Réarrangements chromosomiques définis dans les cellules ES

2.1 Le système de recombinaison Cre/loxP

Chez l'humain, les anomalies chromosomiques sont la principale cause de létalité embryonnaire et d'anomalies du développement (Shaffer LG et al. 2000). De plus, les translocations chromosomiques sont impliquées dans plusieurs types de cancer (Rabbitts TH, 1994). La mutagenèse chez la souris permet d'identifier de nouveaux gènes importants et permet également de reproduire des réarrangements chromosomiques, servant ainsi de modèle pour étudier la génétique de certaines maladies humaines.

Plusieurs mutations spontanées ont été identifiées avec le temps, comme par exemple la mutation w (white spot). Par contre, les mutations spontanées sont très rares (5×10^{-6} par locus) et c'est pourquoi d'autres méthodes sont nécessaires afin d'en augmenter le taux. Les rayons X augmentent les mutations de 20 à 100 fois. Ils peuvent causer de nombreux réarrangements chromosomiques. Par contre, plusieurs gènes sont souvent affectés et l'identification du(des) réarrangement(s) ou de la(des) mutation(s) est souvent difficile. Le DelBank est un criblage à grande échelle d'une série de délétions causées par radiation. Il comporte une collection de cellules ES ayant subi une délétion (identifiées par la perte du marqueur TK) (Stanford WL et al. 2001). L'agent chimique Chlorambucil permet d'induire des mutations à un taux plus élevé que les rayons X, mais l'identification du(des) gène(s) muté(s) est aussi difficile. L'ethylnitrobutyl (ENU) est un agent chimique alkylant qui génère surtout des mutations ponctuelles dans les spermatogonies des mâles traités. Il a l'avantage d'affecter en général un seul gène à la fois, mais le gène muté est difficilement identifiable. Il existe aussi un criblage ENU à grande échelle (Voir l'adresse suivante: <http://www.gsf.de/ieg/groups/enu-mouse.html>). Récemment, la génération de chromosome balancier a augmenté grandement les possibilités de cette technique (Su H et al.

2001). L'insertion rétrovirale perturbe l'expression normale de gènes et possède une étiquette (tag) pour le clonage. Le ciblage de gènes permet de produire des mutations ciblées (délétions ou insertions). Le gène et sa structure doivent par contre être connus. Le phénotype est imprévu et cette technique est laborieuse. La capture de gènes exprimés (trapping) permet de perturber l'expression normale de gènes par l'insertion d'un vecteur de "trapping", et permet également de cloner facilement le gène perturbé. Plusieurs criblages par capture de gènes existent, par exemple un qui permet l'identification de nouveaux gènes exprimés dans les lignées hématopoïétiques et endothéliales (Stanford WL et al. 1998). Le RNAi (ARN d'interférence) permet d'inactiver l'expression d'un gène, mais le gène et sa structure doivent être connus. L'insertion de transposons perturbe l'expression normale de gène et donne une étiquette pour le clonage. Le système Cre/loxP permet de produire de nombreux réarrangements ciblés (délétions, insertions, translocations, inversions). La délétion de plusieurs gènes à la fois (grandes délétions) est possible et le réarrangement obtenu peut facilement être identifié. La génération de mutations conditionnelles est également possible (Stanford WL et al. 2001).

La technologie SSR (Site-Specific Recombinase) est un système de recombinaison à des sites spécifiques qui a révolutionné la génétique murine (Cre-loxP, Flp-FRT, et ϕ C31-att), car elle permet de produire des réarrangements chromosomiques définis dans les cellules ES (Branda CS et al. 2004).

Les SSR Cre et Flp sont capables de recombiner des séquences spécifiques d'ADN avec une haute précision sans l'ajout d'aucun co-facteur. La Cre et la Flp recombinent l'ADN à des sites spécifiques appelés loxP (locus of crossover X in P1) et FRT (Flp Recombinase Recognition Target) respectivement. Ces deux sites de recombinaison comprennent deux répétitions inversées de 13 pb et une région centrale de 8 pb qui confère la direction au site. Ces deux SSR possèdent le

même mécanisme de recombinaison de l'ADN impliquant la coupure, l'échange et la ligation. Le mécanisme de recombinaison par la Cre et la Flp est illustré dans la Figure 5 (Branda CS et al. 2004).

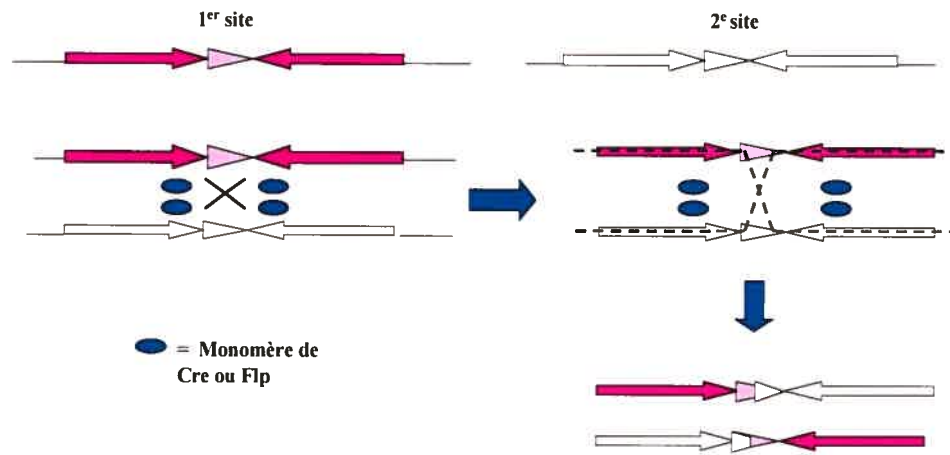


Figure 5: Mécanisme de recombinaison par la Cre et la Flp

Un complexe synaptique se forme d'abord entre la molécule recombinase (Cre ou Flp) et les deux sites spécifiques identiques. Un monomère de la recombinase se lie à chaque répétition de 13 pb (représentée par une flèche dans la figure 5), alors que la région centrale (représentée par un triangle) fournit le site de coupure, d'échange (par des intermédiaires de holliday) et de ligation. Ainsi dans le produit final, il y a un échange d'ADN entre les deux sites de départ (Branda CS et al. 2004).

La recombinaison dépend de l'orientation et de la location des sites loxP ou FRT (voir Figure 6) ainsi que du stade du cycle cellulaire où à lieu la recombinaison. Par exemple, si les sites sont dans la même orientation sur le même chromosome (en cis), il en résultera une délétion (produit circulaire) ou une intégration (moins fréquent) (1). Si les sites se font face (en cis), il y aura une inversion (2), et si les sites sont sur deux chromosomes différents (en trans), il y aura une translocation (3) (Metzger D et al. 1999, Nagy A, 2000, Wilson TJ et al. 2001, Branda CS et al. 2004). L'utilisation de marqueurs permet de sélectionner les

événements de recombinaison et les différents réarrangements peuvent être identifiés par analyse Southern blot.

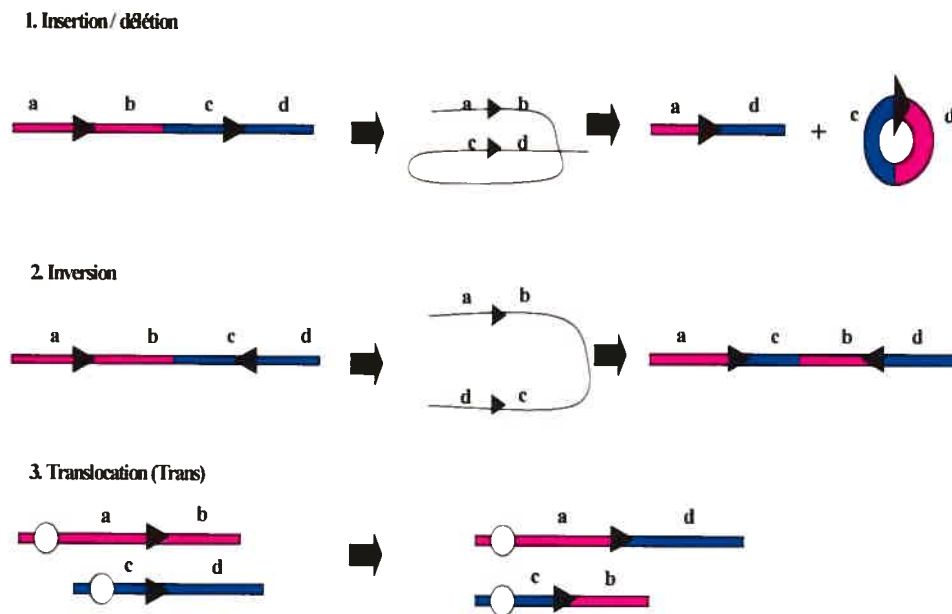
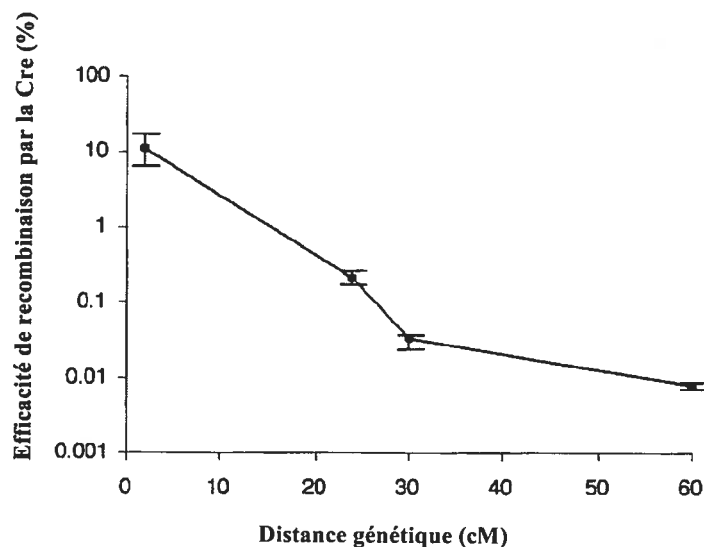


Figure 6: L'action des recombinases Cre et Flp dépend de l'orientation et de la location des sites spécifiques ► (loxP et FRT)

Le système Cre-loxP a permis de créer des modèles murins reproduisant les réarrangements chromosomiques de plusieurs maladies humaines telles que certaines leucémies (Rabbitts TH, 1994, Higuchi M et al. 2002). La recombinase Cre (**C**yclization **R**Ecombination) provenant du bactériophage P1 est une protéine de 38 kD qui catalyse une recombinaison entre deux sites loxP. La recombinaison par la Cre est plus efficace en cis (donc si les loxP sont sur le même chromosome) qu'en trans (si les loxP sont sur des chromosomes différents). Il est donc plus facile d'obtenir une délétion ou une inversion, qu'une intégration ou une translocation (Metzger D et al. 1999, Nagy A, 2000, Zheng B et al. 2000).

Pour des distances de quelques centimorgans, l'efficacité de la recombinaison par la Cre est d'environ 10%. Par contre, entre 5 et 60 cM,

le logarithme de l'efficacité de recombinaison est inversement proportionnel à la distance génétique entre les deux sites (Figure 7) (Zheng B et al. 2000, Zheng B et al. 2001).



Adapté de Zheng B et al. 2000

Figure 7: Efficacité décroissante de la recombinaison par la Cre avec la distance génétique

Ceci peut s'expliquer par deux hypothèses. Premièrement, la Cre doit apporter les deux sites loxP à proximité dans la cellule afin de catalyser une recombinaison, ce qui est facilité lorsque les sites sont rapprochés. Donc plus les deux sites loxP sont proches génétiquement, plus ils sont proches physiquement lorsque les chromosomes s'associent et donc plus la recombinaison par la Cre va être efficace (Zheng B et al. 2000, Zheng B et al. 2001). Deuxièmement, les grandes délétions peuvent être létales ou causer un sévère désavantage de croissance aux cellules ES, sélectionnant ainsi pour les plus petites délétions (Zheng B et al. 2000).

Au moins deux sites loxP sont nécessaires pour que la Cre fonctionne, mais trop de sites loxP peuvent causer des problèmes

d'instabilité chromosomique. Il a été démontré que plusieurs intégrations de sites loxP en présence de la Cre recombinase pouvaient causer une perte de longs segments chromosomiques ou même la perte de chromosome(s) entier(s) (Lewandoski M et al. 1997). Une expression continue de la Cre cause également de l'instabilité, c'est pour cette raison qu'une expression transitoire de la Cre dans les cellules est généralement utilisée (Nagy A, 2000).

Des pseudo sites loxP ont été identifiés dans le génome de la souris. Par contre, ces sites ne semblent pas être un obstacle à la technologie Cre/loxP. Les seuls cas où des pseudo-loxP endogènes ont recombinaison étaient des situations où la Cre était exprimée très fortement (Thyagarajan B et al. 2000).

Le nombre de cellules qui vont subir une recombinaison suit une courbe sigmoïde en fonction du temps. Les paramètres de cette courbe dépendent de plusieurs facteurs, tels que les caractéristiques d'expression de la Cre, les conditions utilisées et de la disponibilité des sites loxP (Nagy A, 2000). La recombinaison par la Cre demande du temps, car il doit tout d'abord y avoir la transcription, la traduction, l'accumulation de la protéine et son action, ce qui demande de plusieurs heures à quelques jours (Nagy A, 2000).

2.2 Délétions chevauchantes

Avec la technologie Cre/loxP, des délétions chevauchantes peuvent être produites. Celles-ci sont un outil très puissant pour étudier le phénotype des gènes et peuvent être utilisées dans un criblage. Pour produire ces délétions, le premier site loxP est introduit à un locus spécifique par recombinaison homologue dans les cellules ES : il est appelé le site d'ancrage. Après l'expansion clonale de cette insertion, un deuxième site loxP est introduit de dans les cellules, soit par électroporation ou par infection rétrovirale. Après recombinaison par la

Cre, une série de délétions chevauchantes sera produites (Figure 8) (LePage DF et al. 2000, Yu Y et al. 2001).

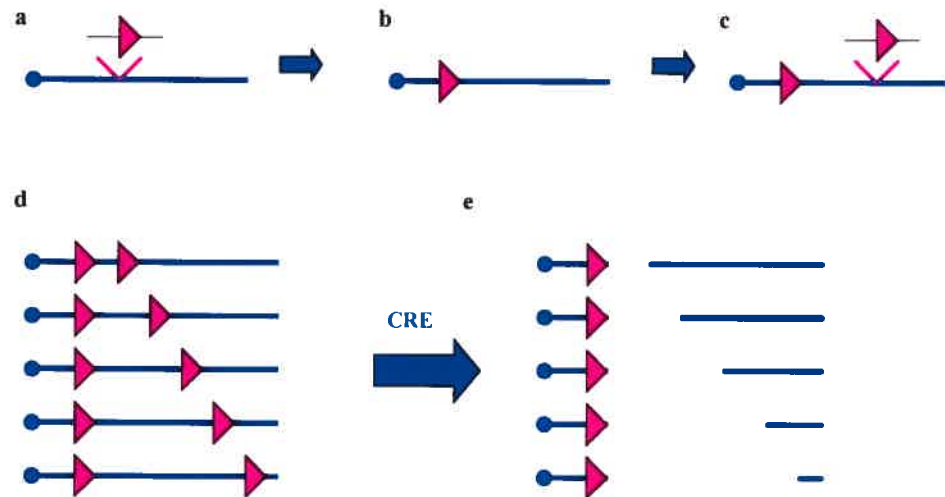


Figure 8: Délétions chevauchantes

- a- Insertion du site d'ancrage par recombinaison homologue
- b- Expansion clonale
- c- Insertion du deuxième loxP
- d- Incorporation aléatoire
- e- Série de délétions chevauchantes après recombinaison par la Cre

Ces délétions peuvent varier de quelques Kb jusqu'à plusieurs Mb (Yu Y et al. 2001). Un marqueur est nécessaire afin de sélectionner les clones qui ont recombinés. Il existe 3 stratégies principales utilisées pour sélectionner les clones (Nagy A, 2000)

1) La reconstitution du mini-gène HPRT est une stratégie qui consiste à placer deux parties du gène séparément dans une construction de façon à ce que ces deux parties se reconstituent après recombinaison par la Cre, restaurant la fonction du gène. Après addition de HAT (Hypoxanthine Amniopterin Thymidine), seulement les cellules ayant une protéine HPRT fonctionnelle (donc seulement les cellules ayant recombinées) survivront (Nagy A, 2000). Cette méthode requiert une lignée cellulaire de ES déficiente pour le gène HPRT.

2) Une autre stratégie possible est l'activation d'un gène de résistance après recombinaison par la Cre. Cette stratégie est démontrée dans la Figure 9. Le gène de sélection A n'a pas de promoteur, donc il est inactif. Par contre, un promoteur se trouve dans la seconde intégration. Ainsi, suite à la recombinaison par la Cre, le gène de sélection A est activé et les gènes de sélection B et C sont déléétés dans un processus menant à une délétion.

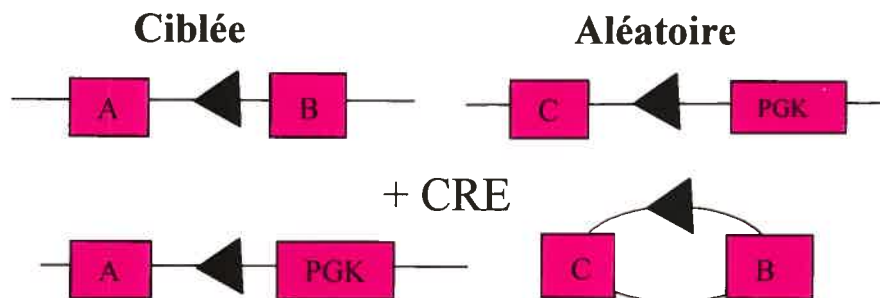


Figure 9: Activation d'un gène de sélection après recombinaison

3) La troisième stratégie est basée sur la perte d'un marqueur de sélection négative, HSV-tk (**H**erpes **S**implex **V**irus **t**hymidine **k**inase) (Goodwin NC et al. 2001). Après recombinaison par la Cre, seulement les cellules ayant perdues le gène tk survivront après addition de FIAU (**f**ialuridine).

L'efficacité de la recombinaison par la Cre va dépendre de plusieurs facteurs, dont entre autre du locus ciblé, de la distance génétique entre les deux sites loxP et des différentes conditions utilisées (Zheng B et al. 2000). Le deuxième site loxP va s'intégrer dans différentes orientations et n'importe où sur les différents chromosomes. Étant donné la sélection d'un événement rare, soit une intégration d'un loxP dans l'orientation désirée et à proximité du site d'ancrage, un très grand nombre de cellules doivent être générées. Une population de cellules avec plusieurs intégrants indépendants est alors produite et le nombre d'intégrants indépendants est appelé la complexité.

Il existe 2 études principales décrites dans la littérature qui ont réalisé des délétions chevauchantes dans le but d'identifier de nouveaux gènes importants.

Le groupe de la première étude (LePage DF et al. 2000) ont produit des délétions chevauchantes sur le chromosome 2 au locus Notch1 (Voir Figure 10). Le premier site loxP a été introduit spécifiquement par recombinaison homologue dans les cellules ES. Le deuxième loxP a été incorporé au hasard par co-électroporation avec la Cre. Les cellules ayant recombinées et délétées sont sélectionnées négativement avec le FIAU contre le gène tk. Les auteurs ont obtenu 10 délétions de 7 différents types. La plus grande délétion était d'environ 10.4 Mb. Les cellules ES qu'ils ont utilisées sont la lignée CAST no.1 qui est une lignée F1 hybride (129S1xCastE1) et le ciblage a été fait sur le chromosome d'origine 129, ce qui permet d'identifier facilement les délétions par la perte des marqueurs polymorphiques 129. 26 marqueurs polymorphiques au locus Notch1 ont été analysés (LePage DF et al. 2000).

Premier loxP : Ciblé (LocusNotch1)

●-Neo▶tk —————

Deuxième loxP : Électroporation

— tk▶Puro —

↓ CRE

●-Neo▶Puro —

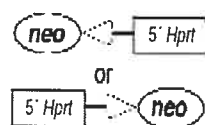
LePage DF et al. 2000

Figure 10: Stratégie utilisée par LePage DF et al. pour produire des délétions chevauchantes sur le chr 2

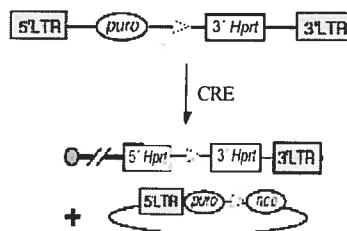
Le deuxième groupe (Su H et al. 2000) a créé des délétions chevauchantes sur les chromosomes X et 11 (Voir figure 11). Le premier site loxP a été incorporé spécifiquement par recombinaison homologue au locus HPRT sur le chromosome X et au locus Hsd17b1 sur le chromosome 11, chacun dans les deux orientations possibles. Le

deuxième loxP a été introduit au hasard par infection rétrovirale. Pour sélectionner les clones qui ont recombinés, ils ont utilisé la reconstitution du mini-gène HPRT. Après sélection au HAT, seulement les clones ayant une protéine HPRT fonctionnelle vont survivre et les clones ayant subi une délétion perdent les résistances à la puromycine et à la néomycine. Ils ont utilisé une lignée de cellules ES F1 hybride et déficiente pour le gène HPRT (Er3.4). Pour le locus HPRT, ils ont obtenu des centaines de colonies résistantes au HAT pour chaque électroporation et environ 20% furent des délétions. La plupart des délétions obtenues étaient d'environ 1 cM dans la région distale ou proximale au locus HPRT. 4 délétions indépendantes ont été obtenues dans la région distale au gène et 15 dans la région proximale, avec une efficacité de délétion de 4×10^{-5} pour la région proximale et de 2×10^{-5} pour la région distale. Pour le locus Hsd17b1 situé à 65 cM sur le chromosome 11, 25 délétions indépendantes ont été générées dans la région proximale au locus, dont 6 ont eu une transmission de la lignée germinale dans les souris. Pour la région distale, 5 délétions ont été produites, par contre aucune n'a permis la transmission de la lignée germinale, suggérant une région d'haploinsuffisance. L'efficacité des délétions est de 2.6×10^{-4} pour la région proximale et de 1.2×10^{-4} pour la région distale (Su H et al. 2000).

Premier LoxP : ciblé (HPRT + Hsd17b1 locus)



Deuxième LoxP : Infection rétrovirale



Su H et al. 2000

Figure 11: Stratégie utilisée par Su H et al. pour produire des délétions chevauchantes sur les chromosomes X et 11

3. Le chromosome X

3.1 Hématopoïèse et chromosome X

La séquence génomique de trois espèces de mammifères (souris, rat et humain) est présentement connue. Le génome murin est le plus petit avec 2.6 milliards de nucléotides. Le génome du rat en comprend 2.75 milliards et le génome humain est le plus gros avec 2.9 milliards (Rat Genome Sequencing Consortium, 2004, Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002).

Il y a actuellement 134 millions de bases (Mb) dans les banques de données pour le chromosome X murin et on estime qu'il en contiendrait 142 Mb (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002). Les gènes identifiés sur le chromosome X sont présentés en annexe I (Boyd Y et al. 1997).

Le chromosome X se démarque des autres chromosomes du fait de la grande conservation entre les mammifères des gènes présents. Les réarrangements entre le chromosome X et les autosomes sont très rares, ce qui a permis de retracer l'évolution de ce chromosome assez facilement. La cartographie de plus de 130 locus sur le chromosome X chez la souris et l'humain a démontré que les gènes qui sont liés au chromosome X chez la souris le sont aussi chez l'humain, et vice-versa (Boyd Y et al. 1998, 1999). Cependant, les positions relatives des différents loci chez la souris, le rat et l'humain ont démontré 16 blocs subchromosomales (d'au moins 300 kb chacun) (Rat Genome Sequencing Consortium, 2004, Boyd Y et al. 2000). Donc les gènes identifiés sur le chromosome X chez la souris et le rat sont facilement identifiables chez l'humain, ce qui fait de ces deux rongeurs d'excellents modèles pour étudier les maladies reliées au chromosome X. En l'an deux milles, il existait environ 80 phénotypes connus reliés au chromosome X, ce qui représente moins de 5% des gènes probables réellement liés à ce chromosome (Boyd Y et al. 2000). Environ la moitié

de ces phénotypes sont impliqués dans des maladies humaines connues et les souris créées par ciblage de gènes servent de modèle pour comprendre leur fonction dans la pathogénèse (Boyd Y et al. 2000).

Plusieurs gènes connus jouant un rôle dans le système hématopoïétique se retrouvent sur le chromosome X (voir Figure 12). Étant donné le nombre considérable de gènes inconnus sur ce chromosome, le nombre de gènes hématopoïétiques liés au chr X est probablement très élevé.

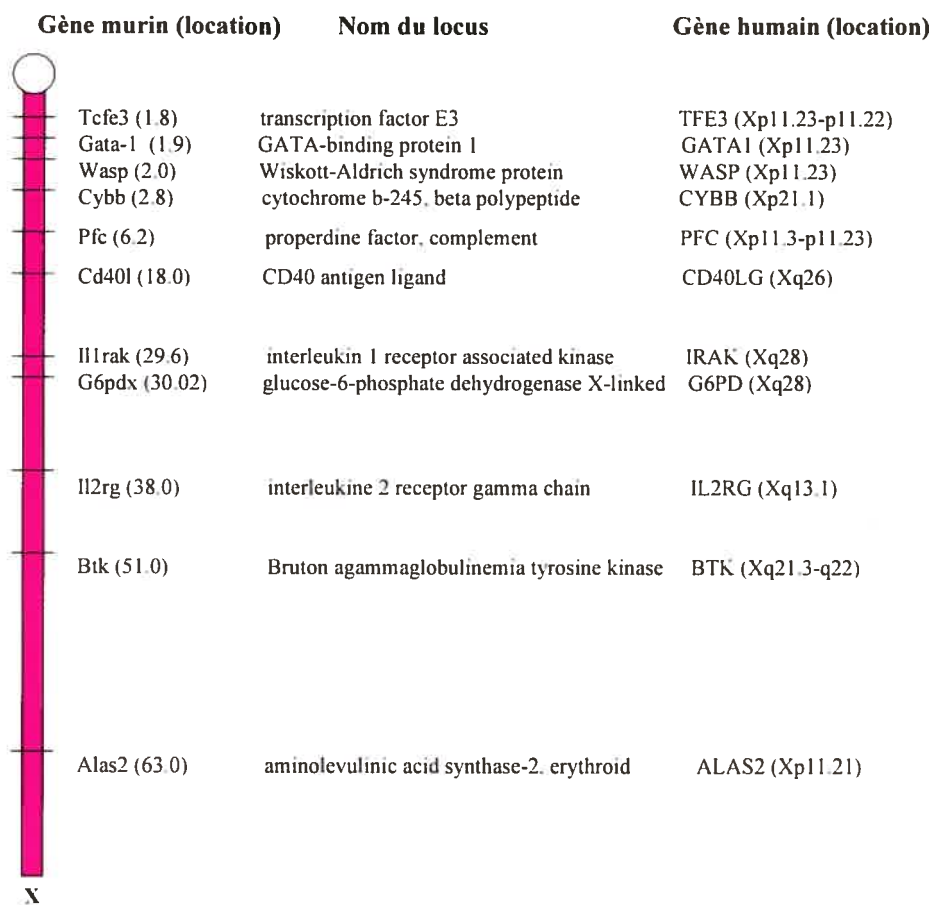


Figure 12: Gènes impliqués dans le système hématopoïétique présents sur le chr X

Plusieurs gènes sur le chromosome X sont impliqués dans la réponse immunitaire. Par exemple, une mutation dans le gène *gp91-phox* (**Cybb**) cause une maladie chronique granulomateuse (CGD). Ce déficit immunitaire se caractérise par une incapacité à phagocyter les bactéries (Lien LL et al. 1997, Segal AW, 1985 + OMIM). Le facteur properdin (**Pfc**) est une protéine active dans le système immunitaire inné, plus spécifiquement dans la voie alternative du complément. La protéine non fonctionnelle est associée avec une susceptibilité accrue aux infections bactériennes (Janeway et al. 2001 + OMIM). Le ligand Cd40 (**Cd40l**) est une glycoprotéine transmembranaire impliquée dans la réponse immunitaire en stimulant les cellules B. Plusieurs mutations dans le gène *CD40LG* ont été associées avec le syndrome d'immunodéficience hyper-IgM de type I (Gauchat JF et al. 1993, Solanilla A et al. 2000, + OMIM). Le récepteur de l'IL-1 (**Il1rak**) est impliqué dans le processus d'inflammation. L'activation de ce récepteur par son ligand active le facteur nucléaire kappa-B, qui va activer différents gènes nécessaires au processus inflammatoire (Thomas JA et al. 1999, Cao Z et al. 1996 + OMIM).

Plusieurs gènes sur le chromosome X sont aussi impliqués dans la croissance, l'activation ou la différenciation des cellules lymphoïdes. Par exemple, l'interaction de l'interleukine-2 avec son récepteur (**Il2rg**) affecte la croissance et la différenciation des cellules B et T, des cellules NK, des cellules gliales et des monocytes. Il existe différents isoformes de ce récepteur composés des sous-unités α , β et γ (common gamma chain). La chaîne gamma est essentielle au fonctionnement de *Il2rg* et est présente dans d'autres récepteurs de cytokines, comme *IL-4*, *IL-7*, *IL-9* et *IL-15* (Puck JM et al. 1997, He YW et al. 1995 + OMIM). **Tcfe3** est un membre de la famille des facteurs de transcription hélice-boucle-hélice. Il se lie au motif μ E3 de l'enhancer de la chaîne lourde des immunoglobulines et est exprimé dans la plupart des types cellulaires. TFE3 joue un rôle dans l'activation des cellules B *in vivo* (Merrell K et

al. 1997 + OMIM). La tyrosine kinase Bruton (**Btk**) est une protéine cytoplasmique de 659 acides aminés qui est impliquée dans le développement des cellules B. Elle fait parti de la famille Tec tyrosine kinase. Chez l'humain, l'absence d'une protéine BTK fonctionnelle cause une maladie immunodéficiente appelé XLA (**X-linked agammaglobulinemia**) qui se caractérise par une absence presque complète de la différenciation des cellules B au stade pré-B. Les patients XLA souffrent de fréquentes infections bactériennes car ils ont une sévère réduction d'immunoglobulines de toutes les classes. Chez la Souris, un gène BTK muté amène un phénotype appelé xid (**x-linked immunodeficiency**), qui se caractérise par une diminution d'environ 50% des cellules B dans la rate. La conséquence de BTK muté est donc moins sévère chez la souris que chez l'humain (Hendriks RW et al. 1996, Oeltjen JC et al. 1995, Maas A et al. 2001). Les gènes encodant les antigènes de surfaces des cellules B liés au chromosome X (**Xlr**) sont présents sous trois isoformes dispersés sur le chromosome X : Xlr1 (6.0 cM), Xlr2 (22.5 cM) et Xlr3 (29.1). Xlr jouerait un rôle dans la régulation de la différenciation des cellules B et T. Contrairement à la grande majorité des gènes liés au X, Xlr n'est pas conservé génétiquement avec l'humain (Allenet B et al. 1995, Garchon HJ et al. 1989).

Certains gènes du chromosome X sont impliqués dans l'érythroïèse. **Gata-1** est un facteur de transcription érythroïde. GATA1 et FOG (friend of GATA1) sont essentiels pour le développement des érythrocytes et des mégacaryocytes. L'interaction de FOG avec GATA1 est essentielle pour la fonction de GATA1 dans la différenciation érythroïde (Crispino JD et al. 1999, Fujiwara Y et al 1996, Shivdasani RA et al. 1997 + OMIM). L'enzyme spécifique aux cellules érythroïdes **Alas2** est la première à être impliquée dans la voie de biosynthèse du hème. Son inactivation cause une accumulation de fer dans les cellules érythroïdes primitives. Les souris déficiente pour Alas2 meurent au stade embryonnaire au jour e11.5. Afin d'étudier le

métabolisme du fer dans les érythroblastes, Sassa et al. ont utilisé le système de différenciation des cellules ES *in vitro* et ont ainsi pu observer le phénotype des érythroblastes définitifs en absence de *Alas2*. Les cellules ES déficientes pour *Alas2* se sont différenciées au stade érythroblaste définitif avec des caractéristiques similaires aux cellules ES sauvages. Par contre, le niveau de Fe^{3+} (non lié au groupement hème) dans ces érythroblastes était 15 fois supérieur aux cellules sauvages (Harigae H et al. 2003 + OMIM).

Les protéines **WASP** et **G6PDX** sont impliquées indirectement dans l'hématopoïèse. *Wasp* est une protéine associée au WAS (*Wiskott-Aldrich Syndrome*), qui se caractérise par une thrombocytopénie, de l'eczéma, une immunodéficiência et une susceptibilité accrue aux leucémies (Luthi JN, 2003 + OMIM). La déhydrogénase glucose-6-phosphate (**G6PDX**) est une enzyme impliqué dans la voie des pentoses phosphate (*NAPDH déhydrogénase*). Sa déficiência cause une anémie hémolytique, et dont la sévérité augmente avec l'exposition à des agents oxydants (Longo L et al. 2002 + OMIM).

3.2 Chromosome X et épigénétique

Les mâles possèdent une copie du chromosome X et un chromosome Y, alors que les femelles possèdent 2 copies du chromosome X. Un mécanisme est donc nécessaire afin de contrôler le niveau d'expression des gènes provenant des chromosomes sexués. Chez les mammifères, cette compensation se fait par l'inactivation d'un des deux chromosomes X chez les femelles. Ce mécanisme se fait par la région *Xic* (*X-inactivation center*), une région d'environ 1Mb sur le chromosome X, contenant plusieurs éléments (dont *Xist*, *Xic*, *Xce*, *Tsix* et *DXPas34*) nécessaires dans ce processus. L'inactivation commence par l'accumulation de *Xist* (**X inactive-specific transcript**) sur le chromosome à inactiver. *Xic* est responsable de l'initiation de l'inactivation en cis et est aussi impliqué dans le dosage. *Xce* (**X chromosome controlling**

element) affecte le choix du chromosome à inactiver. TsiX est transcrit dans le sens opposé de Xist et en contrôle son expression. Finalement, *DXPas34* est hyperméthylé sur le chromosome actif (Avner P et al. 2001, Clerc P et al. 2003).

L’empreinte génétique de gènes (imprinting) par la méthylation est un autre mécanisme de dosage d’expression de gènes. Il existe plusieurs gènes impliqués dans la régulation de l’expression génique sur le chromosome X. Par exemple, *Mecp2* (methyl CpG binding protein 2) situé à 29.6 cM est associé avec la méthylation des îlots CpG en 5’ de certains gènes, contrôlant ainsi leur expression (Tate et al. 1996). *Nap112* (**n**ucleosome **a**ssembly **p**rotein **1**-like **2**) est situé quelques kb en position distale à la région Xic et interagit avec la chromatine pour réguler la prolifération neuronale (Rogner UC et al. 2000). Plusieurs facteurs de transcription et enzymes kinases sont également présents (*Pkare*, *Idh3g*, *Gyk*, *Pgk1*, *Prps1*, *Phex*, *Sms*, *Rps6ka3*, *Pdha1*, *Prps2*, *Phka2*, etc.) Le chromosome X semble donc comporter plusieurs gènes importants impliqués dans différentes maladies ou dans la régulation de l’expression des gènes.

Chapitre 2 :

- 1. Présentation du projet**
- 2. Matériels et méthodes**
- 3. Analyse des résultats**

1. Présentation du projet

1.1 But général

Le but général de mon projet est de mettre au point une technique permettant de produire des délétions chevauchantes dans une région spécifique du chromosome X. Ces cellules modifiées seront utilisées afin d'identifier de nouveaux déterminants géniques importants dans la différenciation hématopoïétique et dans le développement. Je veux donc produire des délétions chevauchantes et chercher un phénotype intéressant soit *in vitro* (par RT-PCR sur l'ARN de EBs à différents stades et avec différents marqueurs), ou soit *in vivo* (en produisant des souris chimères).

Pour ce faire, différentes étapes sont nécessaires:

- 1- Déterminer le locus approprié où je vais introduire mon site d'ancrage
- 2- Concevoir le vecteur de ciblage
- 3- Introduire le site d'ancrage dans le génome des cellules ES par recombinaison homologue
- 4- Produire des délétions chevauchantes avec la technologie Cre-loxP et par l'utilisation de rétrovirus
- 5- Identifier les différentes délétions dans les cellules ES et analyser ces délétions comportant un phénotype en utilisant la différenciation des cellules ES *in vitro*
- 6- Isoler le(s) gène(s) potentiellement impliqué(s) dans la prolifération des cellules souches et dans le développement embryonnaire
- 7- Caractériser les gènes candidats

1.2 Stratégie utilisée

La stratégie utilisée pour produire les délétions chevauchantes est la suivante: le premier site loxP (le site d'ancrage) est introduit spécifiquement dans un locus déterminé par recombinaison homologue dans les cellules ES. La cassette contient un gène de résistance à la puromycine, sans promoteur et sans codon de départ ATG. La cassette contient également un gène de résistance à la néomycine qui va permettre la sélection des clones. L'intégration au hasard du second site va se faire par infection rétrovirale. Le rétrovirus contient un gène de résistance à l'hygromycine, permettant de sélectionner les cellules ayant incorporé le deuxième site loxP. Il contient également un promoteur et un ATG qui sera dans le même cadre de lecture que le gène puromycine du premier site d'intégration. Après recombinaison, le gène de résistance à la puromycine sera activé (Voir Figure 13).

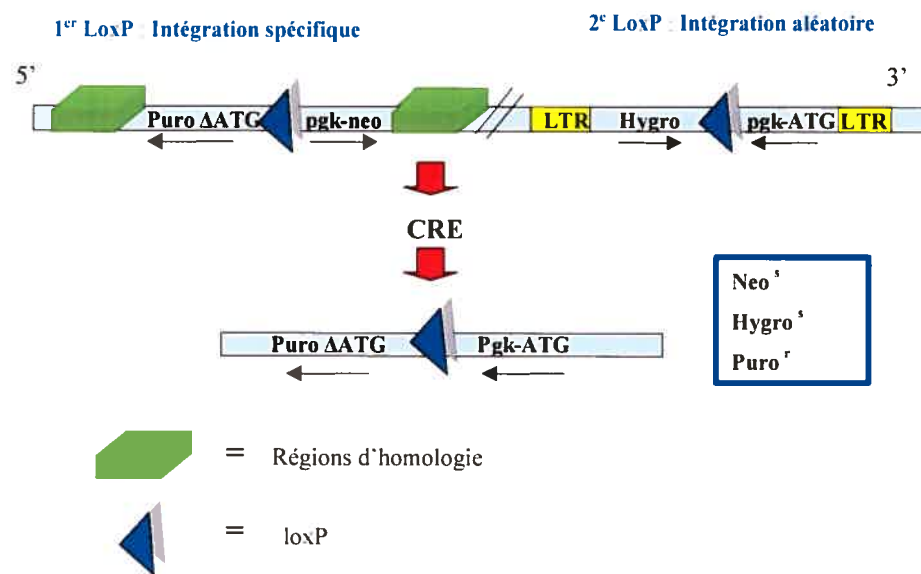


Figure 13: Stratégie utilisée pour produire les délétions

1.3 Choix du locus

Le choix du site d'ancrage s'est fait pour les raisons suivantes:

- Premièrement, la région possiblement délétée doit être exempte de gènes connus pour être létaux ou donner un phénotype embryonnaire sévère.
- Le choix d'un locus déjà ciblé est préférable puisque cela assure l'efficacité de recombinaison.
- Enfin, la région 48 à 62 cM chez la souris (Xq21.3 à Xq22 chez l'humain) est connue pour être très riche en gènes, et dont plusieurs sont reliés à des maladies (Oeltjen JC et al. 1995).

Donc par ces observations, le site d'ancrage déterminé est le locus BTK (**Bruton's Tyrosine Kinase**) situé à 51 cM sur le chromosome X murin (Hendriks RW et al. 1996). La figure 14 représente les gènes et les marqueurs dans la région distale au locus BTK qui pourront éventuellement être délétés. Les 3 gènes encadrés en rouge représentent des gènes dont le phénotype est connu.

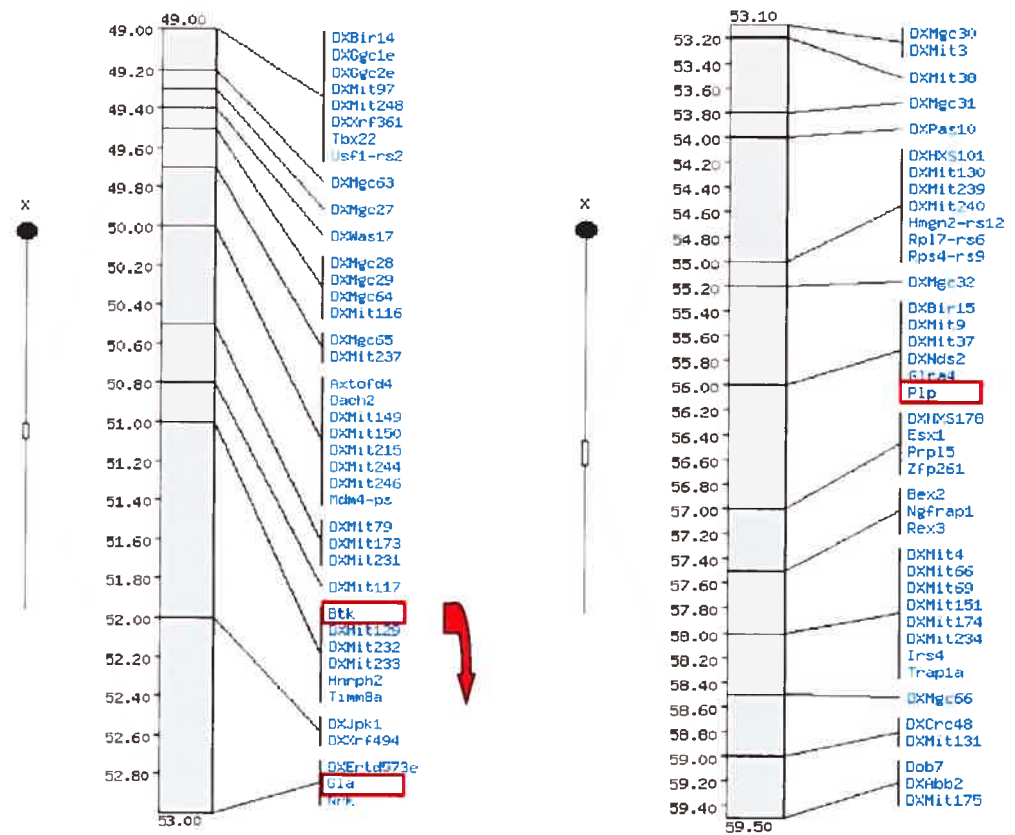
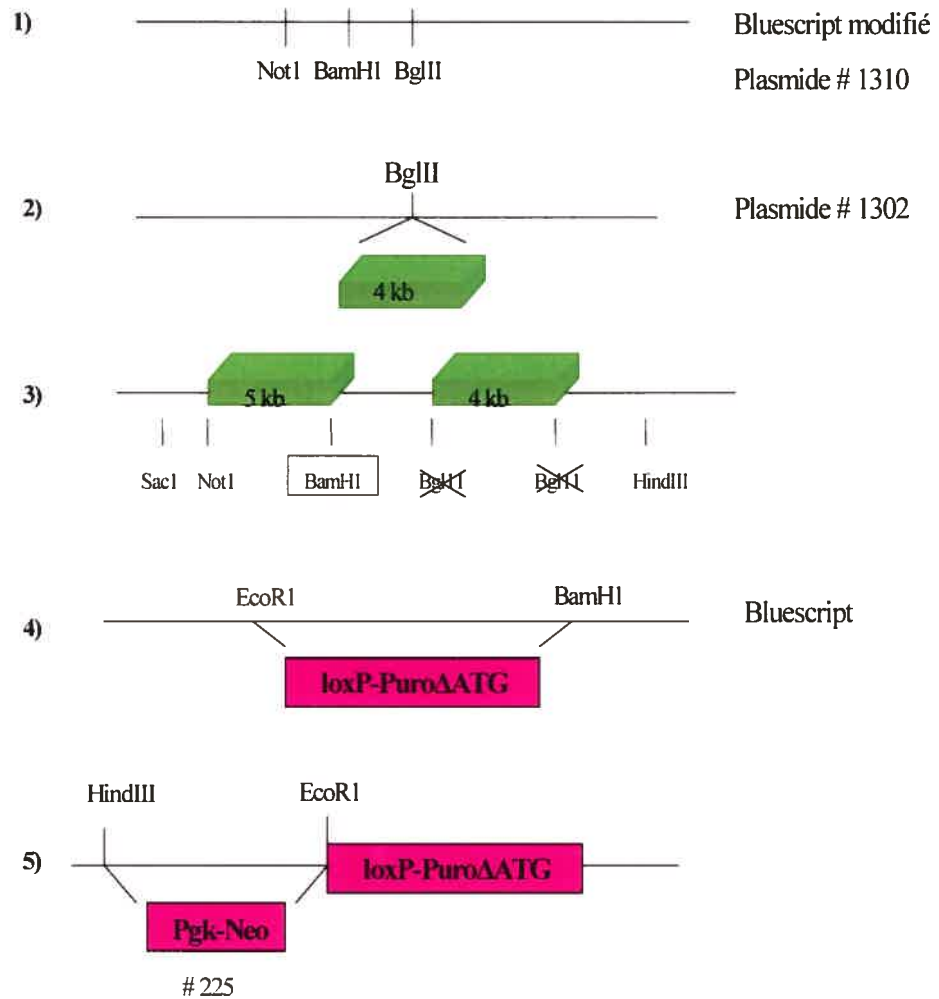


Figure 14: Gènes et marqueurs dans la région distale au locus BTK

2. Matériels et méthodes

2.1 Construction du vecteur de ciblage

Les segments d'ADN génomique de BTK nous ont été donnés par Wasif Khan (Khan WN et al. 1995).



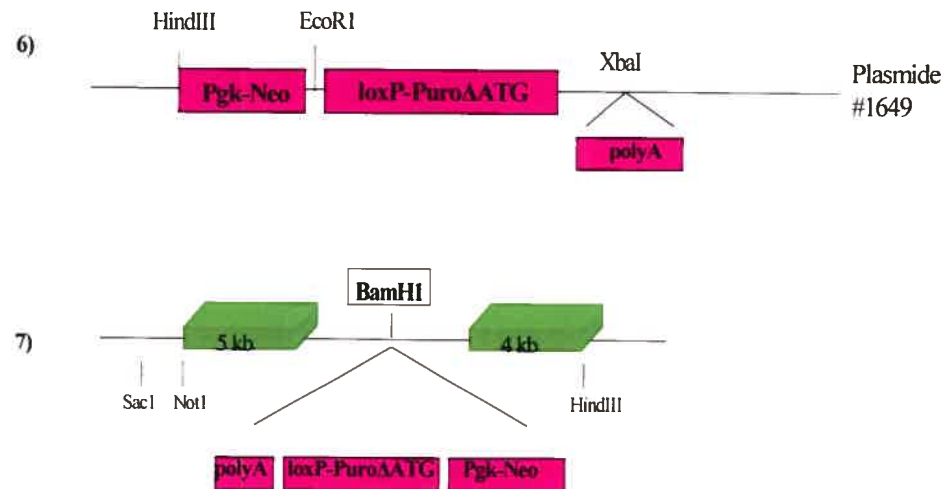


Figure 15: Étapes menant à la construction du vecteur de ciblage

- 1) Le vecteur bluescript a tout d'abord été modifié afin de déléter la région contenant les sites EcoR1 à BamH1. Les sites BamH1 et BglII ont été ajoutés au site Not1 (plasmide #1310).
- 2) Le fragment d'homologie de 4 kb (du plasmide #1302) a été isolé par digestion BamH1 et sous-cloné dans le site BglII du bluescript modifié en #1
- 3) Le fragment de 5 kb (du plasmide #1302) a été isolé par digestion Not1-BamH1 et sous-cloné par digestion Not1-BamH1 dans la construction précédente. Donc un site BamH1 unique se trouve entre les 2 bras d'homologie.
- 4) La cassette pgk-neo-loxP-Puro (sans ATG ni promoteur) a été clonée tout d'abord en sous-clonant le loxP-Puro Δ ATG (produit par PCR) par digestion EcoR1-BamH1 dans EcoR1-BamH1 de bluescript.
- 5) Le pgk-neo a été sous-cloné EcoR1-HindIII du vecteur MSCV-neo (plasmide #225) dans la construction précédente.
- 6) Un polyA pour le gène puro a été construit par PCR (sur le vecteur pDsRed1-C1) avec des amorces contenant des sites de restrictions XbaI de chaque côté. La séquence de 400 bp contenant 2 polyA a été sous-cloné dans le site XbaI dans la construction précédente (plasmide #1649).

7) Finalement, le site BamHI de la construction précédente a été détruit et la cassette P_{gk}-Neo-loxP-Puro Δ ATG-pA de 2.3 kb a été produite par PCR avec le système Expand Long Template PCR System, qui utilise une Taq DNA polymérase thermostable qui permet de produire des fragments jusqu'à 22kb pratiquement sans erreurs. Des sites BglII ont été placés de chaque côté des amorces, permettant ainsi de sous-cloner la cassette de 2.3 kb dans le site BamHI unique de la construction présentée en 3.

Le vecteur a été séquencé en entier afin de s'assurer qu'il n'y avait pas de mutation(s). Le vecteur final contient 2 sites PvuI uniques à bluescript. Ces sites ont servi à linéariser le vecteur (et enlever 1kb du corps de bluescript).

2.2 Ciblage des cellules ES et analyse des clones par Southern blot

L'incorporation du vecteur de ciblage dans les cellules ES se fait par électroporation dans les cellules R1 de bas passage (passage 15). Les cellules R1 sont maintenues sur des MEFs (Mouse Embryonic Fibroblast) irradiées et dans un milieu contenant du DMEM (glucose élevé avec glutamine et pyruvate, Gibco), 15% de FCS (inactivé par la chaleur) préalablement testé pour les ES, 0,1 mM acides aminés (Gibco), 0,15mM MTG et 1000U/ml LIF (ESGRO, Chemicon). Un passage sur la gélatine (0,1% solution de gélatine, Sigma) est fait avant l'électroporation pour permettre de se défaire du plus grand nombre de MEFs possible. Les cellules sont trypsinisées, dissociées, comptées et resuspendues à 10^7 cellules dans 800 μ l de milieu à ES. 25 μ g d'ADN linéarisé stérile est ajouté aux cellules dans une cuvette de 0,4 cm (Biorad). L'électroporation se fait à 225V, 950 μ F avec le mode "exponential decay". La cuvette est incubée 20 minutes à température ambiante, puis son contenu est réparti sur des MEFs irradiés. La sélection à 300 μ g G418 (Geneticin, Invitrogen) débute 24h après l'électroporation et le milieu est changé tous les jours jusqu'à ce que les colonies soient prêtes à être prélevées (7-10 jours). Ensuite, 600 colonies sont prélevées et déposées

dans des plaques à 96 puits sur glace, trypsinisées, dissociées et étalées sur des MEFs irradiées. Le milieu est changé quotidiennement. Lorsque la majorité des clones sont à environ 80% de confluence, la plaque est alors trypsinisée et dissociée. 25% des cellules sont transférées dans une autre plaque (96 puits, sur gélatine) pour éventuellement extraire l'ADN et les 75% restantes sont mélangées à du milieu à congélation 2X (20% DMSO, Sigma), la plaque étant directement congelée à -80°C . Le milieu des clones sur gélatine est changé tous les jours et les puits confluents sont mélangés à 100 μl de DNAzol (Invitrogen) et transférés un à un dans une autre plaque (96 puits en V) et gardés à 4°C . Lorsque tous les clones ont été transférés, 50 μl d'EtOH 100% est ajouté aux puits et la plaque est centrifugée. Le culot d'ADN est lavé 2-3 fois à l'EtOH 75%, et resuspendu ensuite dans le mélange de digestion (H_2O , tampon NEB #3, enzyme NEB EcoR1). La plaque est mise à 37°C pour digestion toute la nuit. L'ADN des premiers 212 clones est soumis à une électrophorèse sur 6 gels 0.85% agarose, transférés sur membrane de nylon Zeta-Probe (Bio Rad) et analysés par Southern Blot avec une sonde BTK (QIAEX de digestion Sac1 + Pst1 sur le plamide #1302 pBS-Btk 5' genomic N/B 5kb). Cette sonde est marquée au dCTP- ^{32}P et purifiée sur une colonne de Sephadex-G50 (Pharmacia). Les membranes sont pré-hybridées et hybridées à 65°C dans une solution 6X SSC, 10% formamide, 1% sodium dodecyl sulphate (SDS), 2 mM EDTA, 1% lait, 0.5 mg/mL ADN de sperme de saumon, et 7.5 % dextran sulphate. Les membranes sont lavées 3 fois 15 minutes à 65°C dans 1) 2X SSC, 0.1% SDS, 2) 0.2X SSC, 0.1% SDS, et 3) 0.2X SSC. Les membranes sont ensuite exposées sur films Kodak BioMax MS (Interscience Inc, Markham).

Les 6 membranes ont été déshybridées dans une solution 1% SDS bouillant à 65°C (3x5min.) et sondées avec une sonde puro (QIAEX de digestion EcoR1 + HindIII sur le plamide #226 pBKS- PAC) dCTP- ^{32}P . Les clones positifs sont décongelés en plaçant la plaque directement à 37°C et en transférant le contenu du puit sur des MEFs irradiées dans une

plaque à 24 puits. Le milieu est changé quelques heures (5-6h) plus tard pour enlever les traces de DMSO restantes. Les clones sont ensuite multipliés jusqu'au nombre de cellules désirées et congelées individuellement.

2.3 Caryotypage des cellules ES ciblées

5 différents clones (#152, 92, 90, 48 et 134) ont été caryotypés par le groupe de la banque de cellules leucémiques de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont.

2.4 Vérification de la compatibilité des cassettes de la nouvelle génération de virus

La construction ci-dessous (plasmide #1678) (Figure 16) a été électroporée (linéarisée Not1 et circulaire) dans les cellules ES R1 dans les conditions décrites précédemment (en 2.2) et étalée sur des MEFs neo^f .

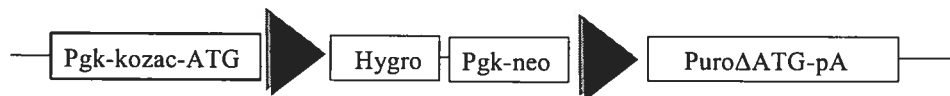


Figure 16: Construction pour tester les cassettes

Les cellules ont été sélectionnées à 300 μ g/ml G418 pendant sept jours et ensuite, les colonies résistantes ont été regroupées et multipliées afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules pour l'électroporation dans chaque condition. 25 μ g de la Cre recombinase circulaire #1633 pCX-CRE a été électroporée dans les cellules ES neo^f . Après l'introduction de la Cre, les cellules ont été étalées sur des MEF DR4 (puro résistantes) et une sélection à 2 μ g/ml de puromycine a été lancée 48 heures après l'électroporation et maintenue pendant cinq jours.

2.5 Infection rétrovirale

La soupe virale est générée en transfectant la construction désirée dans la lignée amphotropique 293GPV (cellules VSV-G) ou la lignée productrice écotropique GP+E86, soit au CaCl_2 ou par lipofectamine. La soupe virale est titrée en infectant les cellules ES ciblées à différentes dilutions et en comptant le rapport des colonies après/avant sélection. L'infection rétrovirale avec la soupe écotropique se fait dans le milieu des cellules ES dans des pétris (Nunc) gélatinisés avec $4\mu\text{g/ml}$ de polybrene (hexadimethrine bromide, Sigma) durant 24h.

3. Analyse des résultats

3.1 Construction du vecteur de ciblage

La construction du vecteur de ciblage fut réalisée en utilisant deux bras D'ADN homologues. Ces bras sont nécessaires à la recombinaison homologue et doivent avoir une taille de plus de 1.5 kb pour obtenir une recombinaison efficace (Babinet C et al. 2001). Le premier bras en 5' est de 5 kb et il est situé juste avant l'exon 1. Le second bras en 3' est de 4kb et comporte les exons 1 et 2. Entre ces 2 bras, il y a une cassette avec un promoteur PGK, un gène de résistance à la néomycine et un site loxP avec un gène de résistance à la puromycine, sans promoteur et sans codon de départ ATG (Figure 17). Un site EcoR1 est présent dans la construction entre la fin du neo et le loxP. Dans la région génomique de BTK, un site EcoR1 se trouve à 1.3 kb en amont du bras d'homologie de 5 kb et un autre dans l'autre bras d'homologie à 1.7 kb à partir de l'extrémité 5'. Donc avec une digestion EcoR1 et avec une sonde dans le bras d'homologie de 5kb (sonde 1), on observe par Southern Blot une bande endogène de 8.04 kb et après recombinaison homologue, cette bande sera de 7.3 kb. Une sonde puro (sonde 2) peut aussi être utilisée pour s'assurer qu'il n'y a pas d'autres intégrants aléatoires ailleurs dans le génome (Figure 17).

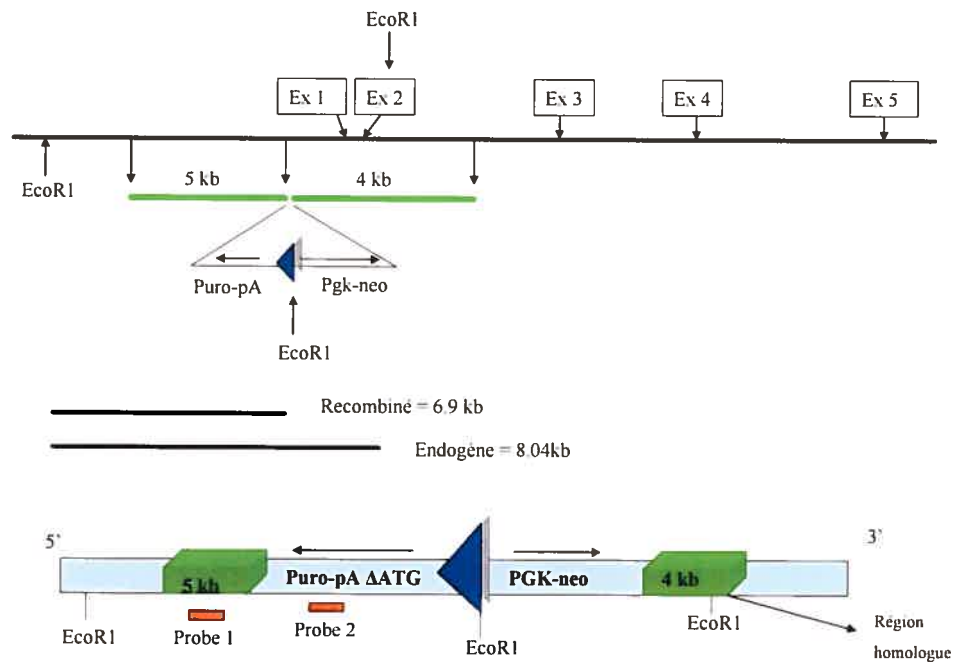


Figure 17: Locus BTK et conception du vecteur de ciblage

3.2 Ciblage par recombinaison homologue

600 clones ont été prélevés, congelés et multipliés afin d'en extraire l'ADN. L'ADN de 400 clones a été digéré et les 212 premiers clones furent analysés par Southern blot (Figures 18 et 19 et annexe II). 9 clones (#48, 53, 90, 92, 134, 151, 201, 205 et 206) ont démontré une perte d'environ 700 bp après digestion EcoRI et hybridation avec une sonde BTK (sonde 1 figure 17). Donc 9 clones ont recombiné spécifiquement au locus ciblé. Ces 6 membranes ont été réhybridées avec une sonde puro (sonde 2 figure 17) afin de démontrer qu'il n'y avait pas d'autres intégrants (Figures 20 et 21 et annexe II).

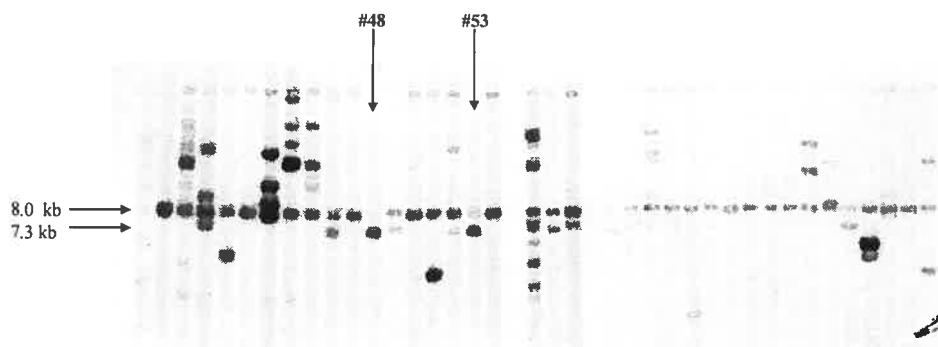


Figure 18: Southern blot démontrant la recombinaison
homologue des clones #48 et 53

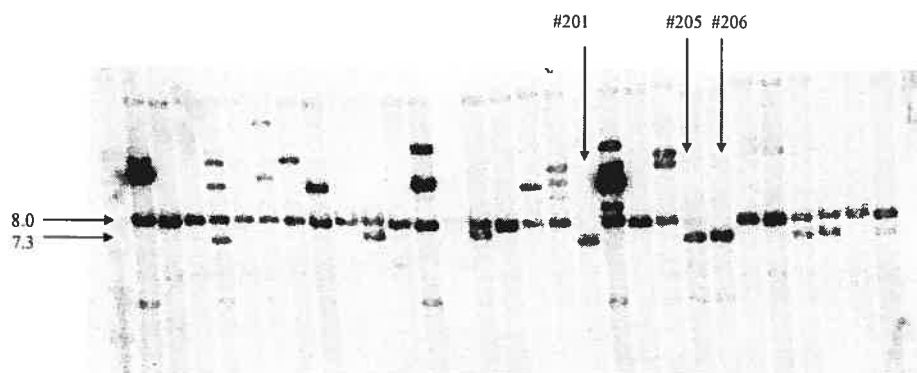


Figure 19: Southern blot démontrant la recombinaison
homologue des clones #201, 205 et 206

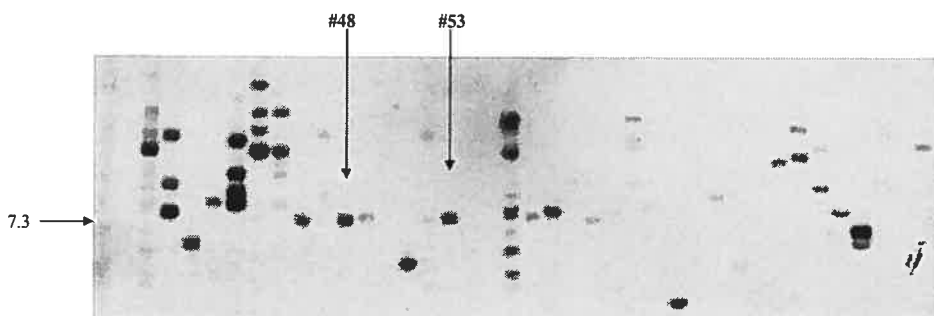


Figure 20: Southern blot démontrant l'intégration unique
pour les clones #48 et 53

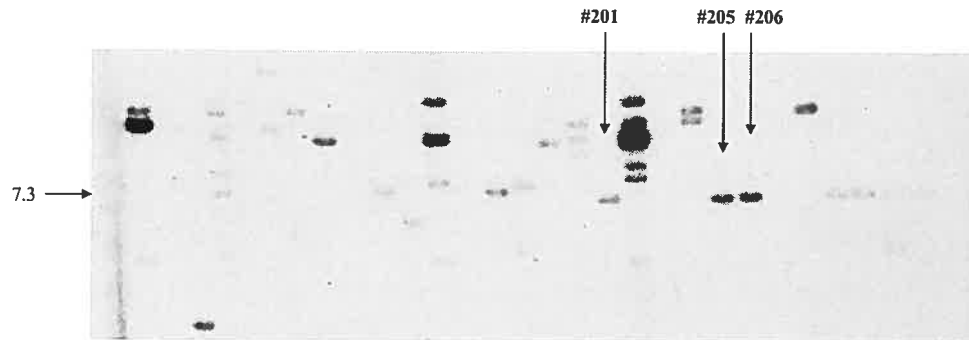


Figure 21: Southern blot démontrant l'intégration unique pour les clones #201, 205 et 206

3.3 Caryotype des clones

5 clones ont été caryotypés par le groupe de la banque de cellules leucémiques de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont, soit les clones #152, 92, 90, 48 et 134. Le caryotype du clone 92 est présenté dans la figure 22 et les caryotypes des 4 autres clones sont présentés en annexe III.

Seul les clones #134 et 92 ont un caryotype normal 40,XY après l'analyse de 20 métaphases chacun.

L'analyse de 15 métaphases du clone #48 a démontré une formule chromosomique a 41,XY,+9 dans toutes les cellules.

L'analyse de 21 métaphases du clone #90 a démontré une formule chromosomique normale 40,XY dans 13 cellules, une formule chromosomique a 41,XY,+1 dans 7 cellules et une formule a 40,XY,t(14;16) dans une cellule.

L'analyse de 20 métaphases du clone #152 a démontré une formule chromosomique a 41,XY,+9 dans 13 cellules. Les 7 autres métaphases n'ont pas de trisomie 9 mais ont des pertes chromosomiques dont la perte du chromosome X dans 4 cellules et perte du chromosome Y dans 2 cellules.



A



B

Figure 22 : Caryotype du clone #92 :

- L'analyse de 20 métaphases a démontré :
- Un caryotype normal 40,XY dans 14 cellules (A et B)
 - Une formule chromosomique à 40,XY,+11,-12 dans une cellule
 - Une translocation 39,XY,-2,t(14;17) dans une cellule
 - Une formule à 32,XY avec pertes aléatoires de chromosomes dans une cellule
 - Une formule chromosomique hypertriploïde à 63 chromosomes dans une cellule
 - Une formule à 46,XY,del(7) dans une cellule et à 46,XY,del(15) dans une cellule

3.4 Autre digestion pour les clones 92 et 134

Une autre analyse Southern blot a été réalisée afin de confirmer la recombinaison des 2 clones au locus BTK. L'analyse a été faite sur l'ADN des clones 92 et 134 (qui possèdent un caryotype normal) et les digestions EcoRI et HpaI ont été utilisées afin de reconfirmer les résultats précédents. La digestion HpaI avec la sonde BTK (sonde 1 dans la Figure 17) permet de distinguer les clones qui ont recombinés comparativement aux cellules sauvages R1. Une bande de 7.8 kb est présente pour les clones comparativement à une bande endogène de 30 kb. La digestion EcoRI reconfirme les résultats obtenus en 3.2 (Voir Figure 23).

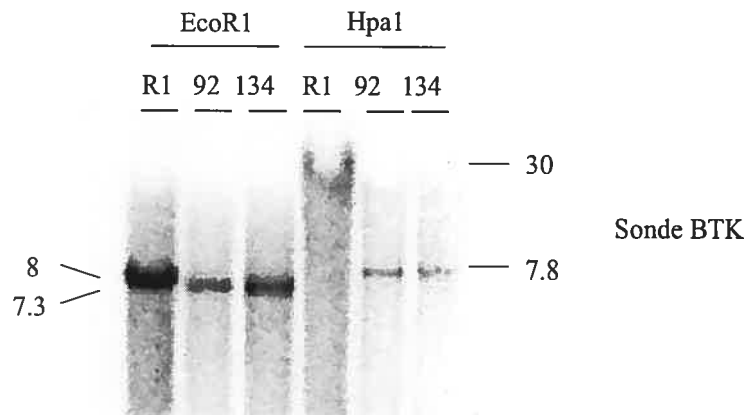


Figure 23 : Autre digestion des clones 92 et 134

3.5 Test de la nouvelle cassette qui sera utilisée pour produire

Les délétions sur le clone ciblé.

Une construction (Figure 16) a été réalisée afin de s'assurer que la nouvelle cassette utilisée est bien compatible et fonctionnelle avec la cassette introduite par ciblage dans les cellules ES. Il est à noter que 2 générations de rétrovirus ont été conçues précédemment et que toutes deux se sont avérées inefficaces dues à des réarrangements intramoléculaires.

Une cassette contenant un pgk-ATG-loxP-hygro a été sous-cloné avant la cassette pgk-neo-loxP-puro Δ ATG-pA, permettant ainsi de transférer cette construction dans les cellules ES et de vérifier si après l'ajout de la Cre, la recombinaison produit bien des clones puro résistants. Les colonies puro^r ont été comptées 6 jours après l'électroporation (après 4 jours de sélection) (Table 1). Le pourcentage d'efficacité de la Cre a été calculé en comparant le nombre total de colonies puro^r après sélection sur le nombre de colonies avant sélection transfectées avec la Cre. 10⁷ cellules ont été électroporées par condition. Le nombre de cellules avant sélection qui possède la Cre a été calculé en prenant en considération les faits suivants: **1)** Seulement 50% des cellules survivront à l'électroporation, et **2)** la moitié de ces cellules incorporeront la construction désirée (Ces données sont valables pour les conditions d'électroporation utilisées, soit 25 μ g d'ADN, 10⁷ cellules, 225V, 950uF, Fradet N, observations non publiées). De plus, **3)** seulement environ 5% des cellules vont adhérer sur les MEFs et survivre, donc 10⁷ x 50% x 50% x 5% = 1.2 x 10⁵. Le nombre de colonies résistantes à la puromycine est similaire que la construction ait été linéarisée ou non. Le pourcentage d'efficacité de recombinaison par la Cre est d'environ 10% pour les 2 conditions.

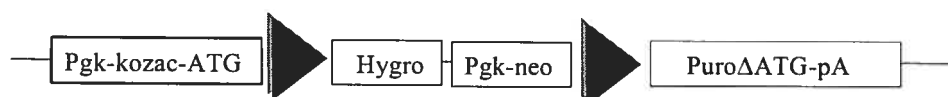


Figure 24: Construction pour tester les cassettes

Conditions	Nb colonies Puro^r	Nb cellules avec CRE	% efficacité de la CRE
ES seul	0	0	0
ES + CRE	0	125 000	0
ES + vecteur lin	0	0	0
ES + vecteur circ	0	0	0
ES + vecteur liné + CRE	~15 680	125 000	~12.5%
ES + vecteur circ + CRE	~12 096	125 000	~9.7%

Table 1: Nombre de colonies puro^r après action de la Cre dans les cellules avec la construction à tester

Les résultats présentés ci-dessus (Table 1) démontrent que les deux constructions générées sont compatibles et fonctionnelles. Le ciblage du premier site d'intégration étant réussi, le système est maintenant prêt à être exploité.

Le clone #92 ciblé au locus Btk a été saturé avec le virus présenté ci-haut et plusieurs colonies (298) ont survécu à la sélection puromycine. La complexité générée était de 16 000. Ces différents clones seront éventuellement analysés et caractérisés. Les cellules de ces clones seront différenciées en EBs et utilisées dans la génération de souris chimères à la recherche d'un phénotype anormal.

La soupe virale ayant servi à la saturation du locus BTK peut aussi être utilisé à la saturation de d'autres locus éventuellement ciblés. Plusieurs locus sur le chromosome X ont leur construction presque terminée pour le ciblage par recombinaison homologe et seront décrits dans la discussion.

De cette façon, plusieurs délétions chevauchantes seront produites pour chaque locus ciblé, permettant un criblage de gènes sur le chromosome X impliqués dans le développement et l'hématopoïèse.

Il existe des méthodes alternatives afin de produire des délétions à partir de sites loxP. Elles sont décrites dans la table 2 ci-dessous.

	Premier site loxP	Deuxième site loxP
Intégration spécifique	-Recombinaison homologue	-Recombinaison homologue
Intégration aléatoire	-Infection rétrovirale -Électroporation	-Infection rétrovirale -Électroporation

Table 2 : Méthodes alternatives pour produire des délétions

Chapitre 3:

Discussion et conclusion

1. Choix du locus Btk sur le chromosome X

La majorité des lignées de cellules ES ont un caryotype XY. Le chromosome X est très conservé entre la souris et l'humain et contient plusieurs gènes ayant une fonction biologique importante ou même essentielle. Par conséquent, le choix du site d'ancrage a été fixé sur ce chromosome. La région possiblement déletée, quant à elle, ne devait pas contenir de gènes létaux ou avec un phénotype embryonnaire sévère. Comme la région 48 à 62 cM chez la souris est connue pour être très riche en gènes, dont plusieurs impliqués dans certaines maladies, le choix du site d'ancrage s'est arrêté sur le locus BTK, situé à 51 cM sur le chromosome X. L'orientation du site loxP est placée de façon à déléter la région distale au gène. La grandeur des délétions sera estimée par la perte de marqueurs STS (Single-Tag Sequence) (Voir annexe IV).

2. Conception du vecteur de ciblage

La conception du vecteur de ciblage a été faite en parallèle avec la conception du rétrovirus, dans le but d'élaborer une stratégie permettant de sélectionner les clones ayant recombines. La méthode de sélection choisie est l'activation d'un marqueur de sélection (puromycine) après recombinaison, et la perte des marqueurs néomycine et hygromycine si la recombinaison produite est une délétion. Cette technique permet de sélectionner et d'identifier facilement les clones qui ont recombines et qui ont déletés un segment chromosomique. Le premier site loxP est introduit dans la construction de ciblage, avec un gène de résistance à la puromycine sans promoteur et sans codon de départ ATG. Un gène de résistance néomycine avec un promoteur Pgk est aussi introduit dans la construction afin de sélectionner les clones ayant intégré la construction. Le gène neo est placé dans le sens inverse au gène puro (pour éviter que le promoteur Pgk du neo puisse activer la transcription du puro). Le gène puro ne va être transcrit que lorsqu'un second site loxP va s'intégrer aléatoirement (précédé d'un promoteur et

d'un site de départ ATG dans le même cadre de lecture que le gène puro) et recombinera avec le loxP de la construction de ciblage (Voir Figure 13). Les régions d'homologie dans le vecteur de ciblage pour la recombinaison homologue dans le gène BTK sont de 5 kb et 4 kb. La construction possède un site de restriction EcoR1 additionnel, permettant de distinguer les clones qui ont recombiné spécifiquement par Southern blot, en utilisant une sonde dans la région d'homologie en 5'. Cette technique permet la révélation d'une bande endogène de 8 kb, qui après recombinaison homologue, du fait de l'introduction d'un site EcoRI supplémentaire est de 7,3kb.

3. Ciblage par recombinaison homologue dans les cellules ES

La recombinaison homologue au locus ciblé a été réalisée avec une efficacité d'environ 4%: 9 clones positifs sur 212 clones analysés (Voir Figures 18 et 19 et annexe II). Il est à noter que pour certains clones, une bande très pâle (moins intense que la bande à 7.3 kb) est présente à 8kb. Cette bande endogène provient des quelques MEFs restant dans le puit lors de l'extraction d'ADN. Cette bande est absente lors de l'hybridation des membranes avec la sonde puro (Voir Figures 20 et 21 et annexe II). Les clones positifs ont été multipliés et caryotypés afin de s'assurer que les cellules ES ciblées ne comportent pas d'anomalies chromosomiques, pouvant causer certains phénotypes non reliés à la région éventuellement délétée et aussi causer un problème dans la production de souris chimères.

Sur les 5 clones analysés, seulement 2 (#92 et 134) présentaient un caryotype normal 40, XY (Figure 22). Les 3 autres clones analysés (#48, 90 et 152) présentaient des réarrangements chromosomiques divers, comme des additions, des délétions ou des translocations (Annexe III). Étant donné les nombreux réarrangements chromosomiques des cellules ES en culture (Longo L et al. 1997, Draper JS et al. 2004), il est

important de caryotyper régulièrement les cellules afin d'éviter de travailler inutilement.

Une analyse Southern blot avec une autre digestion a été réalisée sur les clones ayant un caryotype normal (soit les clones #92 et 134) afin de confirmer que ces 2 clones ont bien recombines au locus ciblé (Figure 23). La digestion Hpa1 avec une sonde BTK révèle une bande d'environ 30 kb pour les cellules R1 contrôle et cette bande descend à 7.8 kb pour les cellules ayant recombines au bon locus (Figure 23). La digestion EcoR1 reconferme les résultats obtenus précédemment. Il est à noter que la distance entre la bande endogène de 8 kb et celles des clones de 7.3 kb (pour la digestion EcoR1) sur la figure 23 est moins grande que dans les membranes présentées dans les figures 18 et 19 et en annexe II, simplement parce que le gel a migré moins longtemps dans ce cas-ci.

4. Infection rétrovirale et complexité

Afin de produire les délétions chevauchantes, une cassette contenant le promoteur et le codon de départ ATG en avant d'un site loxP a été utilisée. L'incorporation du deuxième site loxP peut se faire de plusieurs façons, dont par électroporation ou par infection rétrovirale. La méthode qui a été choisie est l'infection rétrovirale, car elle permet entre autre de diluer la soupe virale de façon à obtenir le pourcentage d'infection désiré.

Les lignées productrices de particules virales utilisées sont les GP+E86 (une lignée murine écotropique) et la lignée amphotropique 293GPV (VSV-G). La lignée 293GPV (VSV-G) exprime gag, pol et VSV-G (l'enveloppe est sous le contrôle d'un promoteur inductible: en absence de tétracycline, tTA se lie au promoteur 7tetO-CMV et conduit l'expression de vsv-G, alors qu'en sa présence, vsv-G est inactif). La cassette contenant le deuxième site loxP est clonée dans un vecteur MSCV (**m**urine stem cell proviral vector) entre les 2 LTR, et co-transfectée dans la lignée VSV-G avec une construction gag-pol (sous le

contrôle du promoteur CMV) et VSV-G. La soupe amphotropique produite par cette lignée après co-transfection est utilisée pour infecter la lignée productrice de particules virales écotropiques GP+E86. La soupe virale produite par l'une de ces 2 lignées (amphotropique ou écotropique) peut être utilisée pour intégrer la cassette désirée dans les cellules ES ciblées.

Étant donné que les rétrovirus s'intègrent aléatoirement dans le génome, la construction va s'intégrer sur les différents chromosomes et dans toutes les directions possibles. Nous voulons intégrer une seule copie de cette construction par cellule. Pour ce faire, nous devons diluer la soupe virale afin d'obtenir un pourcentage d'infection d'environ 1%. Ce pourcentage est déterminé en titrant la soupe virale, donc en comptant et comparant les colonies résistantes pour chaque dilution avant et après sélection. La dilution de la soupe virale qui donne un pourcentage d'infection d'environ 1% (donc environ une colonie résistante après sélection sur 100 colonies avant sélection) est utilisée pour introduire le deuxième site loxP.

Un très grand nombre de cellules ayant incorporé une copie du deuxième site loxP est nécessaire afin d'obtenir quelques cellules ayant introduit ce site loxP à proximité du site loxP d'ancrage et dans la bonne orientation. Étant donné le faible pourcentage d'infection utilisé, le pourcentage de cellules qui vont adhérer et survivre et de la complexité requise, la quantité de cellules ES (contenant le site d'ancrage) qui doit être infectée au départ est énorme. La complexité nécessaire pour produire des délétions dépend évidemment de plusieurs facteurs, tels que le locus ciblé, les conditions utilisées, la distance entre les 2 sites loxP, etc. D'après les études de Allan Bradley (Su H et al. 2000), la complexité minimale afin d'obtenir des délétions est d'environ 24 000, ou autrement dit, 24 000 cellules ont besoin d'une intégration indépendante (à un endroit différent dans le génome).

La construction du rétrovirus qui sera utilisée est présentée dans la figure 25.

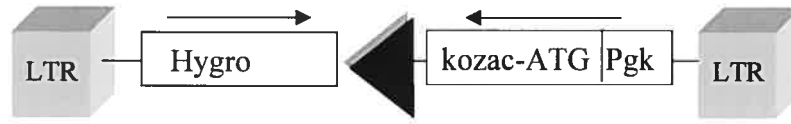


Figure 25 : Construction de la troisième génération de rétrovirus

5. Test de la nouvelle cassette pour l'infection rétrovirale

Afin de tester la compatibilité de ce nouveau rétrovirus avec la construction de départ et l'efficacité de la recombinaison par la Cre, une construction a été faite plaçant les 2 cassettes utilisées à la suite l'une de l'autre (Figure 16). Le vecteur (linéaire ou circulaire) a été intégré dans les cellules ES sélectionnées au G418. Après introduction de la Cre par électroporation, plusieurs colonies ont survécu à la sélection puromycine, alors qu'aucune cellule n'a survécu dans tous les pétris contrôles. Ceci démontre que la cassette utilisée pour la troisième génération de rétrovirus est compatible avec la cassette utilisée dans les cellules ES ciblées. Le calcul approximatif de l'efficacité de la recombinaison par la Cre a été fait en calculant et en comparant le nombre de colonies puro^r et le nombre de cellules avec la Cre (Voir le calcul en 3.5). L'efficacité de la recombinaison par la Cre calculée dans ces conditions est de 12.5 % pour le vecteur linéarisé et de 9.7% pour le vecteur circulaire. Ces chiffres d'efficacité de recombinaison par la Cre corrént avec ceux retrouvés dans la littérature (environ 10% pour des sites loxP distants de moins de 5 cM) (Zheng B et al. 2000, Su H et al. 2000).

La construction de la troisième génération de rétrovirus est illustrée dans la figure 25. Un gène de résistance à l'hygromycine sous le contrôle du LTR est ajouté afin de permettre la sélection des clones ayant incorporé le deuxième site loxP. Aucune séquence répétitive n'est présente dans la construction. Cette construction a été transfectée dans les

GP+E86 et la soupe virale a été titrée et testée par Mélanie Bilodeau. Le clone ciblé a été infecté avec cette soupe virale afin de produire une population de cellules ayant différentes intégrations aléatoires. La complexité qui a été générée est de 16 000 (16 000 intégrations indépendantes). Après électroporation de la cre et sélection puromycine pendant quelques jours, 298 colonies ont survécu. La complexité générée est inférieure à la complexité démontrée par le groupe de Bradley, et un nombre important (298) de colonies a été obtenu. La complexité requise afin de produire des délétions varie d'un locus à l'autre et selon les différentes conditions utilisées. Une hypothèse intéressante est que plus la complexité diminue, plus la grandeur des délétions augmente. Mais cette théorie demeure une hypothèse et devrait certainement être étudiée.

Les clones générés après action de la cre seront éventuellement analysés et caractérisés. Les réarrangements définis comme étant des délétions seront étudiées *in vitro* et *in vivo* afin d'y trouver un(des) gène(s) dont l'absence cause un phénotype important. Ceci démontre que le système fonctionne bien et qu'il peut être utilisé afin de cibler et déléter d'autres régions du chromosome X.

6. Autres locus sur le chromosome X éventuellement ciblés

D'autres locus du chromosome X ont été conçus afin d'être ciblés avec la cassette fonctionnelle utilisée pour le ciblage de BTK. Les gènes dont la construction est presque terminée (où il ne reste qu'à y insérer la cassette pgk-neo-loxp-puro Δ ATG-pA) sont présentés dans la table suivante.

Locus	Distance en cM	# du plasmide	Sites de restriction à utiliser	Grandeur des fragments
F9	22	1277	BglII	12 kb
Gp91	2.9	1315	SmaI	4.8 kb
Grpr	70	1319	BamHI	15 kb
Hprt	17	1227	XhoI	7 + 4.9 kb
Plp	56	1276	BglII	6 kb
Gla	53	1228	EcoRV	1.2 + 6 kb

Table 3 : Locus du chromosome X disponibles dont la construction pour le ciblage est presque terminée

Le gène F9 contient un gène létal embryonnaire à proximité à 18.6 cM et un autre à 28.9 cM (Nsdh1), mais la région distale de 9 cM est quand même intéressante à cribler.

Le gène Gp91 est situé près du gène létal embryonnaire Gata-1 à 2.1 cM, mais la région distale est intéressante à cribler.

Le gène Grpr se trouve à côté du gène Piga qui est létal embryonnaire, mais la région proximale est une région à privilégier.

Le gène Hprt a déjà été ciblé et criblé dans l'expérience du groupe de Su H et al. (Su H et al. 2000) décrite dans l'introduction.

Le gène Plp ne contient pas de gène létal à proximité, il s'avère donc un bon choix pour le ciblage.

Le gène Gla se trouve entre Btk et Plp, alors je favoriserais le ciblage de ces deux derniers avant de cibler Gla.

Comme vous pouvez le constater, cette technique de criblage de gènes essentiels pour le développement et l'hématopoïèse peut s'appliquer à presque n'importe quelle région du chromosome X, mais aussi au génome en entier. L'insertion du premier site loxP (ancrage) peut se faire spécifiquement, mais aussi de façon aléatoire, permettant un criblage à grande échelle.

7. Méthodes alternatives

Il existe plus d'une façon d'insérer les cassettes afin de produire des délétions. Le premier site loxP (site d'ancrage) ainsi que le deuxième site loxP peuvent être introduits : soit spécifiquement par recombinaison homologue, soit aléatoirement par électroporation ou par infection rétrovirale (voir Table 5).

Le désavantage majeur de la technique d'insertion des cassettes par électroporation est que même en diminuant la concentration d'ADN injecté, plusieurs cellules auront plus d'un intégrant. Cette méthode demanderait de tester un nombre important de colonies avant d'obtenir celles recherchées à moins d'avoir une sélection négative (comme le gène tk décrit en 2.2),

Un avantage intéressant de l'insertion par électroporation est que la deuxième cassette peut être insérée simultanément avec la Cre, sauvant ainsi une étape comparativement à la technique décrite dans ce mémoire. Une sélection négative combinée à une sélection positive diminue énormément le nombre de colonies finales résistantes, mais les colonies survivantes seront pour la plupart des colonies positives (ayant subi une délétion).

Il existe plusieurs autres méthodes afin de produire des mutations ciblées dans le génome comme décrit en 2.1. L'avantage majeur de notre technique est la possibilité de produire des grandes délétions définies

dans les cellules ES et de cribler un phénotype facilement en utilisant la différenciation *in vitro*. Cette méthode unique permet de définir rapidement la nature des réarrangements obtenus et de déléter plusieurs gènes simultanément. Je pense que lorsque les constructions sont adéquates et fonctionnelles, l'infection rétrovirale offre beaucoup d'avantages, dont entre autre la possibilité d'intégrer une seule copie de la construction désirée par cellule (ex. loxP). Pour ce faire, il suffit de diluer la soupe virale, permettant ainsi d'évaluer la complexité générée. De plus, le rétrovirus fourni une étiquette (tag) pour le clonage. Notre approche visait à mettre au point une méthode où les conditions seraient bien établies afin de les utiliser à répétitions dans un criblage fonctionnel à grande échelle.

Références

- Allenet,B., Escalier,D., and Garchon,H.J. (1995). A putative human equivalent of the murine Xlr (X-linked, lymphocyte-regulated) protein. *Mamm. Genome* 6, 640-644.
- Antonchuk,J., Sauvageau,G., and Humphries,R.K. (2002). HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. *Cell* 109, 39-45.
- Babinet,C. and Cohen-Tannoudji,M. (2001). Genome engineering via homologous recombination in mouse embryonic stem (ES) cells: an amazingly versatile tool for the study of mammalian biology. *An. Acad. Bras. Cienc.* 73, 365-383.
- Boyd,Y., Herman,G.E., Avner,P., Disteché,C.M., Adler,D., Reed,V., and Blair,H.J. (1997). Mouse X chromosome. *Mamm. Genome* 7 *Spec No*, S313-S326.
- Boyd,Y. (1998). Genetic mapping of the mouse genome. *Methods* 14, 120-134.
- Boyd,Y., Denny,P., Masson,W., Reed,V., and Elliott,R. (1999). Mouse X chromosome. *Mamm. Genome* 10, 961.
- Boyd,Y., Blair,H.J., Cunliffe,P., Masson,W.K., and Reed,V. (2000). A phenotype map of the mouse X chromosome: models for human X-linked disease. *Genome Res.* 10, 277-292.
- Branda,C.S. and Dymecki,S.M. (2004). Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice. *Dev. Cell* 6, 7-28.
- Burns,J.C., Friedmann,T., Driever,W., Burrascano,M., and Yee,J.K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 8033-8037.
- Cao,Z., Henzel,W.J., and Gao,X. (1996). IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* 271, 1128-1131.
- Chambers,I., Colby,D., Robertson,M., Nichols,J., Lee,S., Tweedie,S., and Smith,A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643-655.
- Choi,K. (1998). Hemangioblast development and regulation. *Biochem. Cell Biol.* 76, 947-956.

Clerc,P. and Avner,P. (2003). Multiple elements within the Xic regulate random X inactivation in mice. *Semin. Cell Dev. Biol.* 14, 85-92.

Crispino,J.D., Lodish,M.B., MacKay,J.P., and Orkin,S.H. (1999). Use of altered specificity mutants to probe a specific protein-protein interaction in differentiation: the GATA-1:FOG complex. *Mol. Cell* 3, 219-228.

Daley,G.Q. (2003). From embryos to embryoid bodies: generating blood from embryonic stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 996, 122-131.

Dani,C., Chambers,I., Johnstone,S., Robertson,M., Ebrahimi,B., Saito,M., Taga,T., Li,M., Burdon,T., Nichols,J., and Smith,A. (1998). Paracrine induction of stem cell renewal by LIF-deficient cells: a new ES cell regulatory pathway. *Dev. Biol.* 203, 149-162.

Doetschman,T.C., Eistetter,H., Katz,M., Schmidt,W., and Kemler,R. (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 87, 27-45.

Draper, J.S., Smith,S., Gokhale,P., Moore,H.D., Maltby, E., Johnson,J., Meisner,J., Zwaka, T.P., Thompson,J.A. and Andrews,P.W. (2004). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat. Biotech.* 1, 53-54

Garchon,H.J. and Davis,M.M. (1989). The XLR gene product defines a novel set of proteins stabilized in the nucleus by zinc ions. *J. Cell Biol.* 108, 779-787.

Gauchat,J.F., Henchoz,S., Mazzei,G., Aubry,J.P., Brunner,T., Blasey,H., Life,P., Talabot,D., Flores-Romo,L., Thompson,J (1993). Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* 365, 340-343.

Goodwin N.C., Ishida Y., Hartford S., Wnek C., Bergstrom R.A., Leder P. and Schimenti J.C. (2001). Delbank: a mouse ES-cell resource for generating deletions. *Nat. Genet.* 28, 301-311

Harigae,H., Nakajima,O., Suwabe,N., Yokoyama,H., Furuyama,K., Sasaki,T., Kaku,M., Yamamoto,M., and Sassa,S. (2003). Aberrant iron accumulation and oxidized status of erythroid-specific delta-aminolevulinate synthase (ALAS2)-deficient definitive erythroblasts. *Blood* 101, 1188-1193.

He,Y.W., Levy,R.B., and Malek,T.R. (1995). Blockade of T- and B-lymphocyte development by antibody to the gamma c subunit of the receptors for interleukins 2, 4, and 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 5689-5693.

Hendriks,R.W., de Bruijn,M.F., Maas,A., Dingjan,G.M., Karis,A., and Grosveld,F. (1996). Inactivation of Btk by insertion of lacZ reveals defects in B cell development only past the pre-B cell stage. *EMBO J.* *15*, 4862-4872.

Higuchi M., O'Brien D., Kumaravelu P., Lenny N., Yeoh E.J. and Downing J.R. (2002). Expression of a conditional AML1-ETO oncogene bypasses embryonic lethality and establishes a murine model of human t(8;21) acute myeloid leukemia. *Cancer cell* *1*, 63-74

Janeway, C. A., Jr., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. J. (2001) *Immunobiology: the immune system in health and disease*. New York: Garland Publ. (5th ed.) 50-53.

Keller,G., Kennedy,M., Papayannopoulou,T., and Wiles,M.V. (1993). Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol. Cell Biol.* *13*, 473-486.

Keller,G., Lacaud,G., and Robertson,S. (1999). Development of the hematopoietic system in the mouse. *Exp. Hematol.* *27*, 777-787.

Khan WN, Alt Fw, Gerstein RM, Malynn BA, Larsson I, Rathbun G, Davidson L, Muller S, Kantor AB, Herzenberg LA, et al. (1995). Defective B cell development and function in Btk-deficient mice. *Immunity.* *3*, 283-299.

Kros,J., Beslu,N., Mayotte,N., Humphries,R.K., and Sauvageau,G. (2003). The competitive nature of HOXB4-transduced HSC is limited by PBX1: the generation of ultra-competitive stem cells retaining full differentiation potential. *Immunity.* *18*, 561-571.

Kyba,M., Perlingeiro,R.C., and Daley,G.Q. (2002). HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. *Cell* *109*, 29-37.

Kyba,M. and Daley,G.Q. (2003). Hematopoiesis from embryonic stem cells: lessons from and for ontogeny. *Exp. Hematol.* *31*, 994-1006.

Kyba,M., Perlingeiro,R.C., Hoover,R.R., Lu,C.W., Pierce,J., and Daley,G.Q. (2003). Enhanced hematopoietic differentiation of embryonic stem cells conditionally expressing Stat5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100 Suppl 1*, 11904-11910.

Leahy,A., Xiong,J.W., Kuhnert,F., and Stuhlmann,H. (1999). Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J. Exp. Zool.* *284*, 67-81.

LePage,D.F., Church,D.M., Millie,E., Hassold,T.J., and Conlon,R.A. (2000). Rapid generation of nested chromosomal deletions on mouse chromosome 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 10471-10476.

Lien,L.L., Lee,Y., and Orkin,S.H. (1997). Regulation of the myeloid-cell-expressed human gp91-phox gene as studied by transfer of yeast artificial chromosome clones into embryonic stem cells: suppression of a variegated cellular pattern of expression requires a full complement of distant cis elements. *Mol. Cell Biol.* 17, 2279-2290.

Longo,L., Bygrave,A., Grosveld,F.G. and Pandolfi, P.P. (1997). The chromosome make-up of mouse embryonic stem cells is predictive of somatic and germ cell chimaerism. *Transgenic Res.* 6, 321-328.

Longo,L., Vanegas,O.C., Patel,M., Rosti,V., Li,H., Waka,J., Merghoub,T., Pandolfi,P.P., Notaro,R., Manova,K., and Luzzatto,L. (2002). Maternally transmitted severe glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency is an embryonic lethal. *EMBO J.* 21, 4229-4239.

Maas,A. and Hendriks,R.W. (2001). Role of Bruton's tyrosine kinase in B cell development. *Dev. Immunol.* 8, 171-181.

Metzger,D. and Feil,R. (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10, 470-476.

Mouse Genome Sequencing Consortium (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520-562

Nagy,A. (2000). Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis.* 26, 99-109.

Nakano,T. (1996). In vitro development of hematopoietic system from mouse embryonic stem cells: a new approach for embryonic hematopoiesis. *Int. J. Hematol.* 65, 1-8.

Negrini,M. and Buc,H. (2001). Retroviral recombination: what drives the switch? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 151-155.

Nishikawa,S.I., Nishikawa,S., Hirashima,M., Matsuyoshi,N., and Kodama,H. (1998). Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development* 125, 1747-1757.

Oeltjen,J.C., Liu,X., Lu,J., Allen,R.C., Muzny,D., Belmont,J.W., and Gibbs,R.A. (1995). Sixty-nine kilobases of contiguous human genomic sequence containing the alpha-galactosidase A and Bruton's tyrosine kinase loci. *Mamm. Genome* 6, 334-338.

- Palacios,R., Golunski,E., and Samaridis,J. (1995). In vitro generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *92*, 7530-7534.
- Parthasarathi,S., Varela-Echavarria,A., Ron,Y., Preston,B.D., and Dougherty,J.P. (1995). Genetic rearrangements occurring during a single cycle of murine leukemia virus vector replication: characterization and implications. *J. Virol.* *69*, 7991-8000.
- Perlingeiro,R.C., Kyba,M., and Daley,G.Q. (2001). Clonal analysis of differentiating embryonic stem cells reveals a hematopoietic progenitor with primitive erythroid and adult lymphoid-myeloid potential. *Development* *128*, 4597-4604.
- Peters,D.G., Klucher,K.M., Perlingeiro,R.C., Dessain,S.K., Koh,E.Y., and Daley,G.Q. (2001). Autocrine and paracrine effects of an ES-cell derived, BCR/ABL-transformed hematopoietic cell line that induces leukemia in mice. *Oncogene* *20*, 2636-2646.
- Potocnik,A.J., Nielsen,P.J., and Eichmann,K. (1994). In vitro generation of lymphoid precursors from embryonic stem cells. *EMBO J.* *13*, 5274-5283.
- Puck,J.M., Pepper,A.E., Henthorn,P.S., Candotti,F., Isakov,J., Whitwam,T., Conley,M.E., Fischer,R.E., Rosenblatt,H.M., Small,T.N., and Buckley,R.H. (1997). Mutation analysis of IL2RG in human X-linked severe combined immunodeficiency. *Blood* *89*, 1968-1977.
- Rabbitts T.H. (1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* *372*, 143-149
- Rat Genome Sequencing Consortium (2004). Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* *428*, 493-521.
- Rideout,W.M., III, Hochedlinger,K., Kyba,M., Daley,G.Q., and Jaenisch,R. (2002). Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell* *109*, 17-27.
- Riordan,J.R., Rommens,J.M., Kerem,B., Alon,N., Rozmahel,R., Grzelczak,Z., Zielenski,J., Lok,S., Plavsic,N., Chou,J.L., and . (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* *245*, 1066-1073.
- Risau,W., Sariola,H., Zerwes,H.G., Sasse,J., Ekblom,P., Kemler,R., and Doetschman,T. (1988). Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* *102*, 471-478.

- Robertson,S.M., Kennedy,M., Shannon,J.M., and Keller,G. (2000). A transitional stage in the commitment of mesoderm to hematopoiesis requiring the transcription factor SCL/tal-1. *Development* 127, 2447-2459.
- Sato,N., Meijer,L., Skaltsounis,L., Greengard,P., and Brivanlou,A.H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* 10, 55-63.
- Sauvageau,G., Thorsteinsdottir,U., Eaves,C.J., Lawrence,H.J., Largman,C., Lansdorp,P.M., and Humphries,R.K. (1995). Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev.* 9, 1753-1765.
- Segal,A.W., Heyworth,P.G., Cockcroft,S., and Barrowman,M.M. (1985). Stimulated neutrophils from patients with autosomal recessive chronic granulomatous disease fail to phosphorylate a Mr-44,000 protein. *Nature* 316, 547-549.
- Segal,A.W. (1985). Variations on the theme of chronic granulomatous disease. *Lancet* 1, 1378-1383.
- Shaffer L.G. and Lupski J.R. (2000). Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in human. *Annu. Rev. Genet.* 34, 297-329.
- Shivdasani,R.A., Fujiwara,Y., McDevitt,M.A., and Orkin,S.H. (1997). A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J.* 16, 3965-3973.
- Smith,A.G. (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 435-462.
- Solanilla,A., Dechanet,J., El Andaloussi,A., Dupouy,M., Godard,F., Chabrol,J., Charbord,P., Reiffers,J., Nurden,A.T., Weksler,B., Moreau,J.F., and Ripoche,J. (2000). CD40-ligand stimulates myelopoiesis by regulating flt3-ligand and thrombopoietin production in bone marrow stromal cells. *Blood* 95, 3758-3764.
- Stanford,W.L., Cohn,J.B., and Cordes,S.P. (2001). Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 2, 756-768.
- Su,H., Wang,X., and Bradley,A. (2000). Nested chromosomal deletions induced with retroviral vectors in mice. *Nat. Genet.* 24, 92-95.

Tam,P.P. and Rossant,J. (2003). Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development. *Development* 130, 6155-6163.

Temple,S. (2003). Embryonic stem cell self-renewal, analyzed. *Cell* 115, 247-248.

Thomas,J.A., Allen,J.L., Tsen,M., Dubnicoff,T., Danao,J., Liao,X.C., Cao,Z., and Wasserman,S.A. (1999). Impaired cytokine signaling in mice lacking the IL-1 receptor-associated kinase. *J. Immunol.* 163, 978-984.

Thyagarajan B., Guimaraes M.J., Groth A.C. and Calos M.P. (2000). Mammalian genomes contain active recombinase recognition sites. *Gene* 244, 47-54.

Weissman,I.L. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100, 157-168.

Wiles,M.V. and Keller,G. (1991). Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development* 111, 259-267.

Wilson,T.J. and Kola,I. (2001). The LoxP/CRE system and genome modification. *Methods Mol. Biol.* 158, 83-94.

Wood,S.A., Allen,N.D., Rossant,J., Auerbach,A., and Nagy,A. (1993). Non-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimaeras. *Nature* 365, 87-89.

Yamashita,J., Itoh,H., Hirashima,M., Ogawa,M., Nishikawa,S., Yurugi,T., Naito,M., Nakao,K., and Nishikawa,S. (2000). Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408, 92-96.

Ying,Q.L., Nichols,J., Chambers,I., and Smith,A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281-292.

Yu,Y. and Bradley,A. (2001). Engineering chromosomal rearrangements in mice. *Nat. Rev. Genet.* 2, 780-790.

Zhang,J. and Sapp,C.M. (1999). Recombination between two identical sequences within the same retroviral RNA molecule. *J. Virol.* 73, 5912-5917.

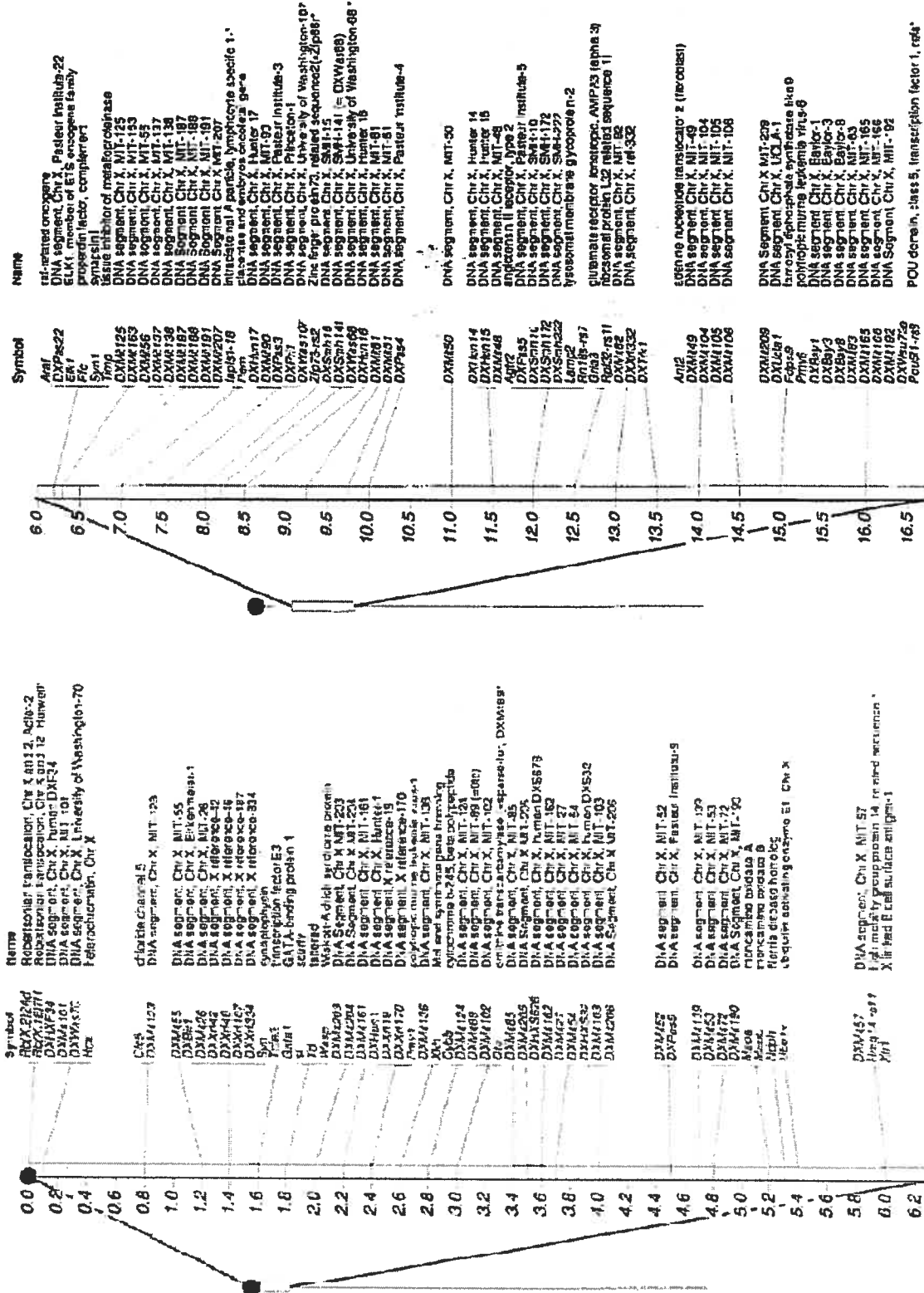
Zhang,J. and Ma,Y. (2001). Evidence for retroviral intramolecular recombinations. *J. Virol.* 75, 6348-6358.

Zheng,B., Sage,M., Sheppard,E.A., Jurecic,V., and Bradley,A. (2000). Engineering mouse chromosomes with Cre-loxP: range, efficiency, and somatic applications. *Mol. Cell Biol.* 20, 648-655.

Zheng,B., Mills,A.A., and Bradley,A. (2001). Introducing defined chromosomal rearrangements into the mouse genome. *Methods* 24, 81-94.

Annexe I :

Gènes présents sur le chromosome X



POU domain, class 5, transcription factor 1, rat*

Symbol	Name	Symbol	Name
DXHS64E	DNA segment, Chr X, human DXS64E	DXHLN3	DNA segment, Chr X, Hunter-3
End1	emelin	Mip-95	Alacs-related protein related sequence 5
G9II	GDP dissociation inhibitor 1	TKX1816V	DNA polymerase alpha 1, 180 kDa
DXIC201	DNA segment, Chr X, CEPH 1	DXCF14C	reciprocal translocation, Chr X and 1E, Harwell-16
DXHS24E	DNA segment, Chr X, human DXS24E	DXCF14C	DNA segment, Chr X, Clinical Research Centre-140
DXS211	DNA segment, Chr X, SADO-1	DXCF19C	DNA segment, Chr X, Clinical Research Centre-190
DXL242	DNA segment, Chr X, UCLA-2	DXCF19C	DNA segment, Chr X, Clinical Research Centre-57
Hmg11-r8	high mobility group protein 14, related sequence 6	DXCF19C	DNA segment, Chr X, Hunter 19
Hmg11-r5	high mobility group protein 17, related sequence 3	DXCF22B	DNA segment, Chr X, Clinical Research Centre-28
Neop11-r3	neofectin A type particle, US region, SINE r	DXM06	DNA segment, Chr X, MIT-6
Neop11-r2	neofectin A type particle, US region, SINE r	DXM02	DNA segment, Chr X, MIT-2
DXHS23E	DNA segment, Chr X, MIT-23	DXM02	DNA segment, Chr X, MIT-23
DXM02	DNA segment, Chr X, MIT-2	DXM04	DNA segment, Chr X, Hunter-4
DXM03	DNA segment, Chr X, MIT-3	DXM04	DNA segment, Chr X, Hunter-4
DXM04	DNA segment, Chr X, MIT-4	DXM05	DNA segment, Chr X, Hunter-5
DXM05	DNA segment, Chr X, MIT-5	DXM06	DNA segment, Chr X, Hunter-6
DXM06	DNA segment, Chr X, MIT-6	DXM07	DNA segment, Chr X, Hunter-7
DXM07	DNA segment, Chr X, MIT-7	DXM08	DNA segment, Chr X, Hunter-8
DXM08	DNA segment, Chr X, MIT-8	DXM09	DNA segment, Chr X, Hunter-9
DXM09	DNA segment, Chr X, MIT-9	DXM10	DNA segment, Chr X, Hunter-10
DXM10	DNA segment, Chr X, MIT-10	DXM11	DNA segment, Chr X, Hunter-11
DXM11	DNA segment, Chr X, MIT-11	DXM12	DNA segment, Chr X, Hunter-12
DXM12	DNA segment, Chr X, MIT-12	DXM13	DNA segment, Chr X, Hunter-13
DXM13	DNA segment, Chr X, MIT-13	DXM14	DNA segment, Chr X, Hunter-14
DXM14	DNA segment, Chr X, MIT-14	DXM15	DNA segment, Chr X, Hunter-15
DXM15	DNA segment, Chr X, MIT-15	DXM16	DNA segment, Chr X, Hunter-16
DXM16	DNA segment, Chr X, MIT-16	DXM17	DNA segment, Chr X, Hunter-17
DXM17	DNA segment, Chr X, MIT-17	DXM18	DNA segment, Chr X, Hunter-18
DXM18	DNA segment, Chr X, MIT-18	DXM19	DNA segment, Chr X, Hunter-19
DXM19	DNA segment, Chr X, MIT-19	DXM20	DNA segment, Chr X, Hunter-20
DXM20	DNA segment, Chr X, MIT-20	DXM21	DNA segment, Chr X, Hunter-21
DXM21	DNA segment, Chr X, MIT-21	DXM22	DNA segment, Chr X, Hunter-22
DXM22	DNA segment, Chr X, MIT-22	DXM23	DNA segment, Chr X, Hunter-23
DXM23	DNA segment, Chr X, MIT-23	DXM24	DNA segment, Chr X, Hunter-24
DXM24	DNA segment, Chr X, MIT-24	DXM25	DNA segment, Chr X, Hunter-25
DXM25	DNA segment, Chr X, MIT-25	DXM26	DNA segment, Chr X, Hunter-26
DXM26	DNA segment, Chr X, MIT-26	DXM27	DNA segment, Chr X, Hunter-27
DXM27	DNA segment, Chr X, MIT-27	DXM28	DNA segment, Chr X, Hunter-28
DXM28	DNA segment, Chr X, MIT-28	DXM29	DNA segment, Chr X, Hunter-29
DXM29	DNA segment, Chr X, MIT-29	DXM30	DNA segment, Chr X, Hunter-30
DXM30	DNA segment, Chr X, MIT-30	DXM31	DNA segment, Chr X, Hunter-31
DXM31	DNA segment, Chr X, MIT-31	DXM32	DNA segment, Chr X, Hunter-32
DXM32	DNA segment, Chr X, MIT-32	DXM33	DNA segment, Chr X, Hunter-33
DXM33	DNA segment, Chr X, MIT-33	DXM34	DNA segment, Chr X, Hunter-34
DXM34	DNA segment, Chr X, MIT-34	DXM35	DNA segment, Chr X, Hunter-35
DXM35	DNA segment, Chr X, MIT-35	DXM36	DNA segment, Chr X, Hunter-36
DXM36	DNA segment, Chr X, MIT-36	DXM37	DNA segment, Chr X, Hunter-37
DXM37	DNA segment, Chr X, MIT-37	DXM38	DNA segment, Chr X, Hunter-38
DXM38	DNA segment, Chr X, MIT-38	DXM39	DNA segment, Chr X, Hunter-39
DXM39	DNA segment, Chr X, MIT-39	DXM40	DNA segment, Chr X, Hunter-40
DXM40	DNA segment, Chr X, MIT-40	DXM41	DNA segment, Chr X, Hunter-41
DXM41	DNA segment, Chr X, MIT-41	DXM42	DNA segment, Chr X, Hunter-42
DXM42	DNA segment, Chr X, MIT-42	DXM43	DNA segment, Chr X, Hunter-43
DXM43	DNA segment, Chr X, MIT-43	DXM44	DNA segment, Chr X, Hunter-44
DXM44	DNA segment, Chr X, MIT-44	DXM45	DNA segment, Chr X, Hunter-45
DXM45	DNA segment, Chr X, MIT-45	DXM46	DNA segment, Chr X, Hunter-46
DXM46	DNA segment, Chr X, MIT-46	DXM47	DNA segment, Chr X, Hunter-47
DXM47	DNA segment, Chr X, MIT-47	DXM48	DNA segment, Chr X, Hunter-48
DXM48	DNA segment, Chr X, MIT-48	DXM49	DNA segment, Chr X, Hunter-49
DXM49	DNA segment, Chr X, MIT-49	DXM50	DNA segment, Chr X, Hunter-50
DXM50	DNA segment, Chr X, MIT-50	DXM51	DNA segment, Chr X, Hunter-51
DXM51	DNA segment, Chr X, MIT-51	DXM52	DNA segment, Chr X, Hunter-52
DXM52	DNA segment, Chr X, MIT-52	DXM53	DNA segment, Chr X, Hunter-53
DXM53	DNA segment, Chr X, MIT-53	DXM54	DNA segment, Chr X, Hunter-54
DXM54	DNA segment, Chr X, MIT-54	DXM55	DNA segment, Chr X, Hunter-55
DXM55	DNA segment, Chr X, MIT-55	DXM56	DNA segment, Chr X, Hunter-56
DXM56	DNA segment, Chr X, MIT-56	DXM57	DNA segment, Chr X, Hunter-57
DXM57	DNA segment, Chr X, MIT-57	DXM58	DNA segment, Chr X, Hunter-58
DXM58	DNA segment, Chr X, MIT-58	DXM59	DNA segment, Chr X, Hunter-59
DXM59	DNA segment, Chr X, MIT-59	DXM60	DNA segment, Chr X, Hunter-60
DXM60	DNA segment, Chr X, MIT-60	DXM61	DNA segment, Chr X, Hunter-61
DXM61	DNA segment, Chr X, MIT-61	DXM62	DNA segment, Chr X, Hunter-62
DXM62	DNA segment, Chr X, MIT-62	DXM63	DNA segment, Chr X, Hunter-63
DXM63	DNA segment, Chr X, MIT-63	DXM64	DNA segment, Chr X, Hunter-64
DXM64	DNA segment, Chr X, MIT-64	DXM65	DNA segment, Chr X, Hunter-65
DXM65	DNA segment, Chr X, MIT-65	DXM66	DNA segment, Chr X, Hunter-66
DXM66	DNA segment, Chr X, MIT-66	DXM67	DNA segment, Chr X, Hunter-67
DXM67	DNA segment, Chr X, MIT-67	DXM68	DNA segment, Chr X, Hunter-68
DXM68	DNA segment, Chr X, MIT-68	DXM69	DNA segment, Chr X, Hunter-69
DXM69	DNA segment, Chr X, MIT-69	DXM70	DNA segment, Chr X, Hunter-70
DXM70	DNA segment, Chr X, MIT-70	DXM71	DNA segment, Chr X, Hunter-71
DXM71	DNA segment, Chr X, MIT-71	DXM72	DNA segment, Chr X, Hunter-72
DXM72	DNA segment, Chr X, MIT-72	DXM73	DNA segment, Chr X, Hunter-73
DXM73	DNA segment, Chr X, MIT-73	DXM74	DNA segment, Chr X, Hunter-74
DXM74	DNA segment, Chr X, MIT-74	DXM75	DNA segment, Chr X, Hunter-75
DXM75	DNA segment, Chr X, MIT-75	DXM76	DNA segment, Chr X, Hunter-76
DXM76	DNA segment, Chr X, MIT-76	DXM77	DNA segment, Chr X, Hunter-77
DXM77	DNA segment, Chr X, MIT-77	DXM78	DNA segment, Chr X, Hunter-78
DXM78	DNA segment, Chr X, MIT-78	DXM79	DNA segment, Chr X, Hunter-79
DXM79	DNA segment, Chr X, MIT-79	DXM80	DNA segment, Chr X, Hunter-80
DXM80	DNA segment, Chr X, MIT-80	DXM81	DNA segment, Chr X, Hunter-81
DXM81	DNA segment, Chr X, MIT-81	DXM82	DNA segment, Chr X, Hunter-82
DXM82	DNA segment, Chr X, MIT-82	DXM83	DNA segment, Chr X, Hunter-83
DXM83	DNA segment, Chr X, MIT-83	DXM84	DNA segment, Chr X, Hunter-84
DXM84	DNA segment, Chr X, MIT-84	DXM85	DNA segment, Chr X, Hunter-85
DXM85	DNA segment, Chr X, MIT-85	DXM86	DNA segment, Chr X, Hunter-86
DXM86	DNA segment, Chr X, MIT-86	DXM87	DNA segment, Chr X, Hunter-87
DXM87	DNA segment, Chr X, MIT-87	DXM88	DNA segment, Chr X, Hunter-88
DXM88	DNA segment, Chr X, MIT-88	DXM89	DNA segment, Chr X, Hunter-89
DXM89	DNA segment, Chr X, MIT-89	DXM90	DNA segment, Chr X, Hunter-90
DXM90	DNA segment, Chr X, MIT-90	DXM91	DNA segment, Chr X, Hunter-91
DXM91	DNA segment, Chr X, MIT-91	DXM92	DNA segment, Chr X, Hunter-92
DXM92	DNA segment, Chr X, MIT-92	DXM93	DNA segment, Chr X, Hunter-93
DXM93	DNA segment, Chr X, MIT-93	DXM94	DNA segment, Chr X, Hunter-94
DXM94	DNA segment, Chr X, MIT-94	DXM95	DNA segment, Chr X, Hunter-95
DXM95	DNA segment, Chr X, MIT-95	DXM96	DNA segment, Chr X, Hunter-96
DXM96	DNA segment, Chr X, MIT-96	DXM97	DNA segment, Chr X, Hunter-97
DXM97	DNA segment, Chr X, MIT-97	DXM98	DNA segment, Chr X, Hunter-98
DXM98	DNA segment, Chr X, MIT-98	DXM99	DNA segment, Chr X, Hunter-99
DXM99	DNA segment, Chr X, MIT-99	DXM100	DNA segment, Chr X, Hunter-100

Symbol	Name	Map
DXM117	DNA segment, Chr X, MIT-117	49.5
DXM120	DNA segment, Chr X, MIT-120	50.0
DXM121	DNA segment, Chr X, MIT-121	50.5
DXM122	DNA segment, Chr X, MIT-122	51.0
DXM123	DNA segment, Chr X, MIT-123	51.5
DXM124	DNA segment, Chr X, MIT-124	52.0
DXM125	DNA segment, Chr X, MIT-125	52.5
DXM126	DNA segment, Chr X, MIT-126	53.0
DXM127	DNA segment, Chr X, MIT-127	53.5
DXM128	DNA segment, Chr X, MIT-128	54.0
DXM129	DNA segment, Chr X, MIT-129	54.5
DXM130	DNA segment, Chr X, MIT-130	55.0
DXM131	DNA segment, Chr X, MIT-131	55.5
DXM132	DNA segment, Chr X, MIT-132	56.0
DXM133	DNA segment, Chr X, MIT-133	56.5
DXM134	DNA segment, Chr X, MIT-134	57.0
DXM135	DNA segment, Chr X, MIT-135	57.5
DXM136	DNA segment, Chr X, MIT-136	58.0
DXM137	DNA segment, Chr X, MIT-137	58.5
DXM138	DNA segment, Chr X, MIT-138	59.0
DXM139	DNA segment, Chr X, MIT-139	59.5
DXM140	DNA segment, Chr X, MIT-140	60.0
DXM141	DNA segment, Chr X, MIT-141	60.5
DXM142	DNA segment, Chr X, MIT-142	61.0
DXM143	DNA segment, Chr X, MIT-143	61.5
DXM144	DNA segment, Chr X, MIT-144	62.0
DXM145	DNA segment, Chr X, MIT-145	62.5
DXM146	DNA segment, Chr X, MIT-146	63.0

Symbol	Name	Map
DXM147	DNA segment, Chr X, MIT-147	49.5
DXM148	DNA segment, Chr X, MIT-148	50.0
DXM149	DNA segment, Chr X, MIT-149	50.5
DXM150	DNA segment, Chr X, MIT-150	51.0
DXM151	DNA segment, Chr X, MIT-151	51.5
DXM152	DNA segment, Chr X, MIT-152	52.0
DXM153	DNA segment, Chr X, MIT-153	52.5
DXM154	DNA segment, Chr X, MIT-154	53.0
DXM155	DNA segment, Chr X, MIT-155	53.5
DXM156	DNA segment, Chr X, MIT-156	54.0
DXM157	DNA segment, Chr X, MIT-157	54.5
DXM158	DNA segment, Chr X, MIT-158	55.0
DXM159	DNA segment, Chr X, MIT-159	55.5
DXM160	DNA segment, Chr X, MIT-160	56.0
DXM161	DNA segment, Chr X, MIT-161	56.5
DXM162	DNA segment, Chr X, MIT-162	57.0
DXM163	DNA segment, Chr X, MIT-163	57.5
DXM164	DNA segment, Chr X, MIT-164	58.0
DXM165	DNA segment, Chr X, MIT-165	58.5
DXM166	DNA segment, Chr X, MIT-166	59.0
DXM167	DNA segment, Chr X, MIT-167	59.5
DXM168	DNA segment, Chr X, MIT-168	60.0
DXM169	DNA segment, Chr X, MIT-169	60.5
DXM170	DNA segment, Chr X, MIT-170	61.0
DXM171	DNA segment, Chr X, MIT-171	61.5
DXM172	DNA segment, Chr X, MIT-172	62.0
DXM173	DNA segment, Chr X, MIT-173	62.5
DXM174	DNA segment, Chr X, MIT-174	63.0

Symbol	Name	Map
DXM175	DNA segment, Chr X, MIT-175	49.5
DXM176	DNA segment, Chr X, MIT-176	50.0
DXM177	DNA segment, Chr X, MIT-177	50.5
DXM178	DNA segment, Chr X, MIT-178	51.0
DXM179	DNA segment, Chr X, MIT-179	51.5
DXM180	DNA segment, Chr X, MIT-180	52.0
DXM181	DNA segment, Chr X, MIT-181	52.5
DXM182	DNA segment, Chr X, MIT-182	53.0
DXM183	DNA segment, Chr X, MIT-183	53.5
DXM184	DNA segment, Chr X, MIT-184	54.0
DXM185	DNA segment, Chr X, MIT-185	54.5
DXM186	DNA segment, Chr X, MIT-186	55.0
DXM187	DNA segment, Chr X, MIT-187	55.5
DXM188	DNA segment, Chr X, MIT-188	56.0
DXM189	DNA segment, Chr X, MIT-189	56.5
DXM190	DNA segment, Chr X, MIT-190	57.0
DXM191	DNA segment, Chr X, MIT-191	57.5
DXM192	DNA segment, Chr X, MIT-192	58.0
DXM193	DNA segment, Chr X, MIT-193	58.5
DXM194	DNA segment, Chr X, MIT-194	59.0
DXM195	DNA segment, Chr X, MIT-195	59.5
DXM196	DNA segment, Chr X, MIT-196	60.0
DXM197	DNA segment, Chr X, MIT-197	60.5
DXM198	DNA segment, Chr X, MIT-198	61.0
DXM199	DNA segment, Chr X, MIT-199	61.5
DXM200	DNA segment, Chr X, MIT-200	62.0
DXM201	DNA segment, Chr X, MIT-201	62.5
DXM202	DNA segment, Chr X, MIT-202	63.0

Symbol	Name	Map
DXM203	DNA segment, Chr X, MIT-203	49.5
DXM204	DNA segment, Chr X, MIT-204	50.0
DXM205	DNA segment, Chr X, MIT-205	50.5
DXM206	DNA segment, Chr X, MIT-206	51.0
DXM207	DNA segment, Chr X, MIT-207	51.5
DXM208	DNA segment, Chr X, MIT-208	52.0
DXM209	DNA segment, Chr X, MIT-209	52.5
DXM210	DNA segment, Chr X, MIT-210	53.0
DXM211	DNA segment, Chr X, MIT-211	53.5
DXM212	DNA segment, Chr X, MIT-212	54.0
DXM213	DNA segment, Chr X, MIT-213	54.5
DXM214	DNA segment, Chr X, MIT-214	55.0
DXM215	DNA segment, Chr X, MIT-215	55.5
DXM216	DNA segment, Chr X, MIT-216	56.0
DXM217	DNA segment, Chr X, MIT-217	56.5
DXM218	DNA segment, Chr X, MIT-218	57.0
DXM219	DNA segment, Chr X, MIT-219	57.5
DXM220	DNA segment, Chr X, MIT-220	58.0
DXM221	DNA segment, Chr X, MIT-221	58.5
DXM222	DNA segment, Chr X, MIT-222	59.0
DXM223	DNA segment, Chr X, MIT-223	59.5
DXM224	DNA segment, Chr X, MIT-224	60.0
DXM225	DNA segment, Chr X, MIT-225	60.5
DXM226	DNA segment, Chr X, MIT-226	61.0
DXM227	DNA segment, Chr X, MIT-227	61.5
DXM228	DNA segment, Chr X, MIT-228	62.0
DXM229	DNA segment, Chr X, MIT-229	62.5
DXM230	DNA segment, Chr X, MIT-230	63.0

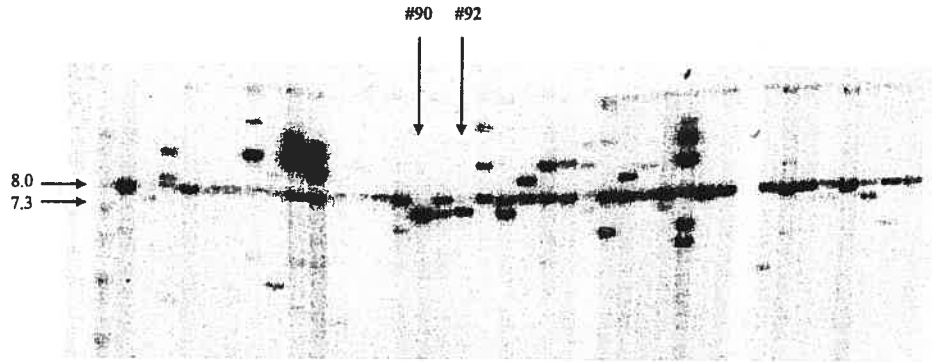
Symbol	Name	Map Position (kb)	Symbol	Name	Map Position (kb)
Act-12	actin, non-muscle isoform-2	63.0	DXPas18	DNA segment, Chr X, Pasteur Institute-1E	68.0
Alexp	DNA segment, Chr X, Hunter-8	63.2	DXPas31	DNA segment, Chr X, University of Washington-31	68.2
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4	Xca1	X-linked catalyst	68.4
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			68.6
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			68.8
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			69.0
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			69.2
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			69.4
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			69.6
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			69.8
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			70.0
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			70.2
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			70.4
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			70.6
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			70.8
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			71.0
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			71.2
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			71.4
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			71.6
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			71.8
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			72.0
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			72.2
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			72.4
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			72.6
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			72.8
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			73.0
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			73.2
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			73.4
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			73.6
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			73.8
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			74.0
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			74.2
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			74.4
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			74.6
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			74.8
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			75.0
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			75.2
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			75.4
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			75.6
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			75.8
DXH19	DNA segment, Chr X, Hunter-19	63.4			76.0

sex chromosome association
 telomeric sequence, Chr X, Chr Y, q arm-1

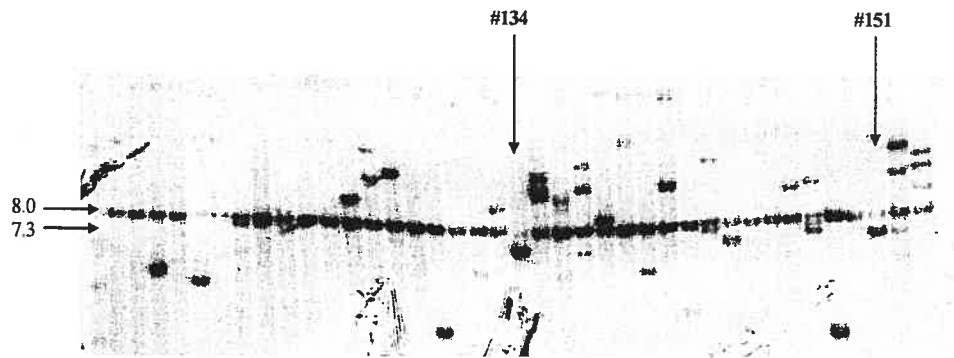
Sexp191,2,3

Annexe II

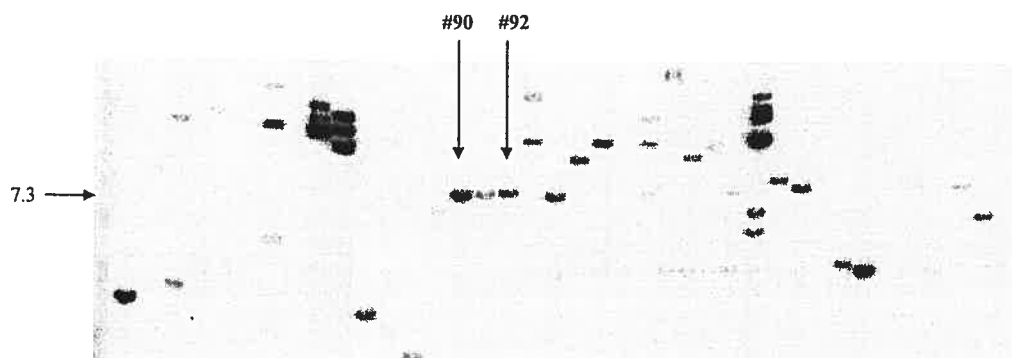
Southern blot de l'analyse des clones
ciblés au locus BTK
pour les membranes #3 et #4



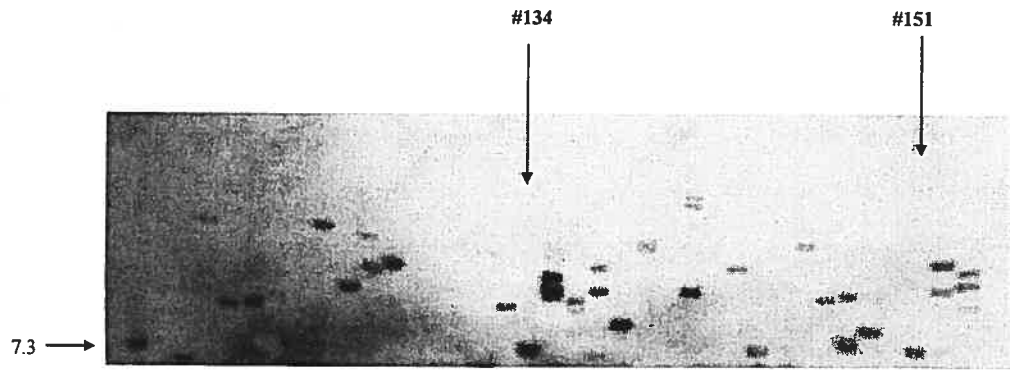
Southern blot démontrant la recombinaison homologue des clones #90 et 92



Southern blot démontrant la recombinaison homologue des clones #134 et 151



Southern blot démontrant l'intégration unique pour les clones #90 et 92

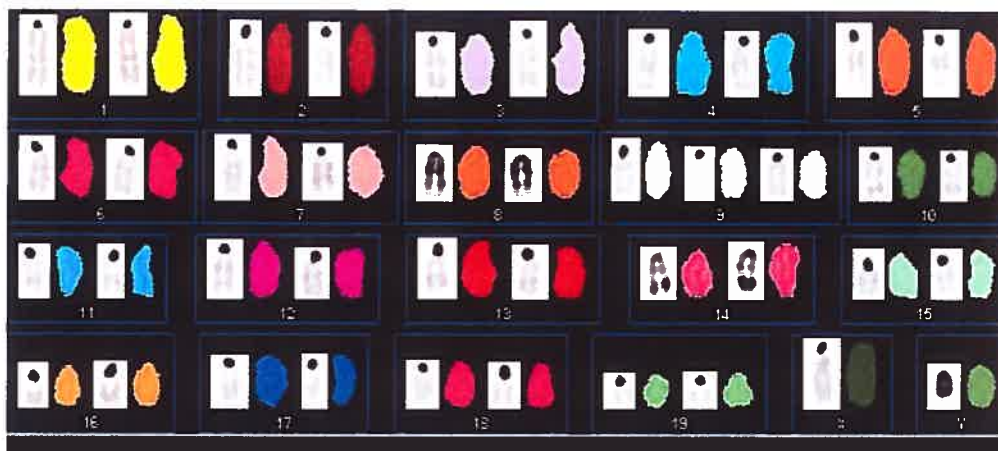


Southern blot démontrant l'intégration unique des clones #134 et 151

ANNEXE III

Caryotype de 4 clones de cellules ES
(#48, 92, 134 et 152)
ciblés au locus BTK

Clone #48 : L'analyse de 15 métaphases a démontré une formule chromosomique 41,XY,+9 dans toutes les cellules (A et B)



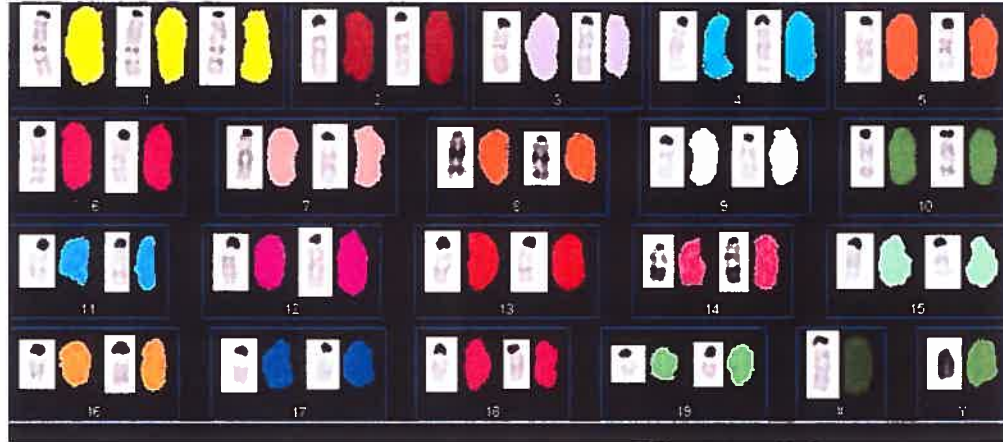
A



B

Clone #90 : L'analyse de 21 métaphases a démontré :

- Un caryotype normal 40,XY dans 13 cellules (D)
- Une formule chromosomique à 41,XY,+1 dans 7 cellules (C)
- Une translocation 40,XY,t(14;16) dans une cellule



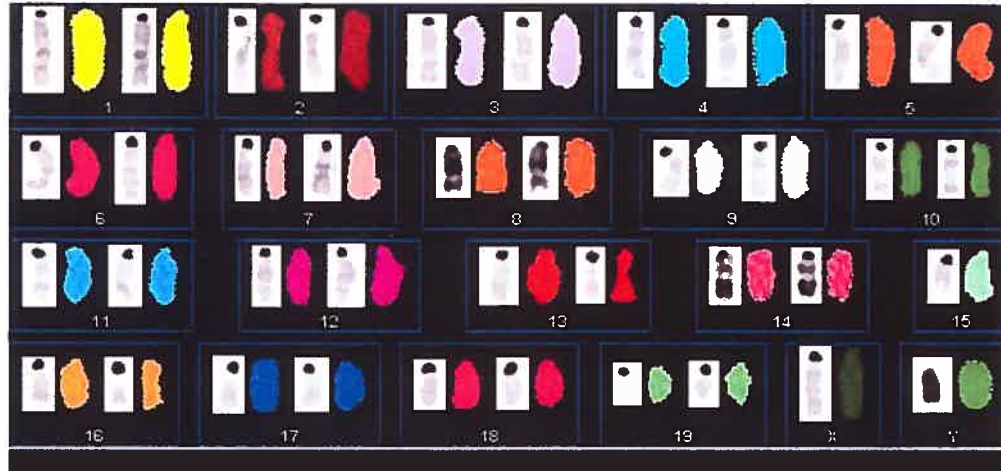
C



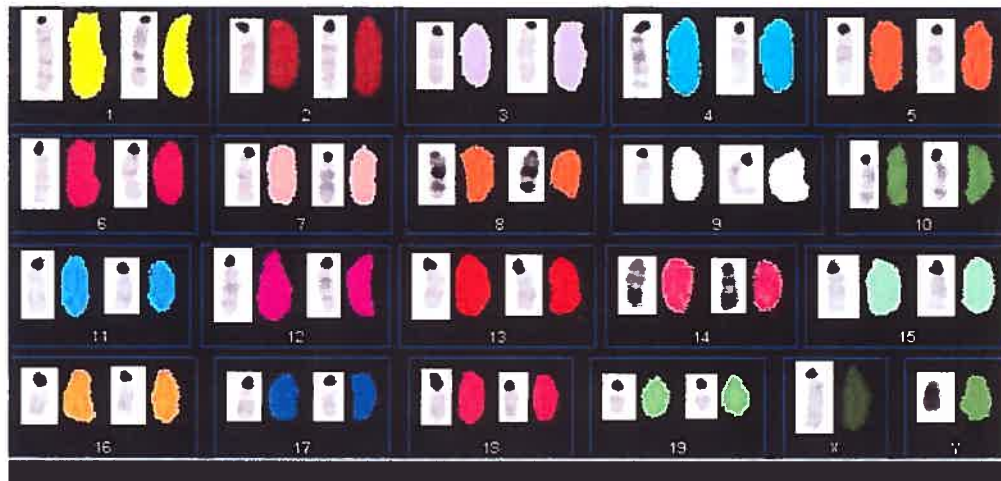
D

Clone #134 : L'analyse de 20 métaphases a démontré :

- Un caryotype normal 40,XY dans 8 métaphases (F)
- Une formule chromosomique avec trisomie 8 dans 2 cellules
- Une formule chromosomique avec pertes aléatoires de chromosomes sans autres anomalies dans 5 cellules (E)
- Une formule chromosomique à 40,XY,t(8;17) dans une cellule, à 40,XY,t(2;8) dans une cellule, à 40,XY,del(19) dans une cellule, à 40,XY,del(3) dans une cellule et à 40,XY,del(6) dans une autre.



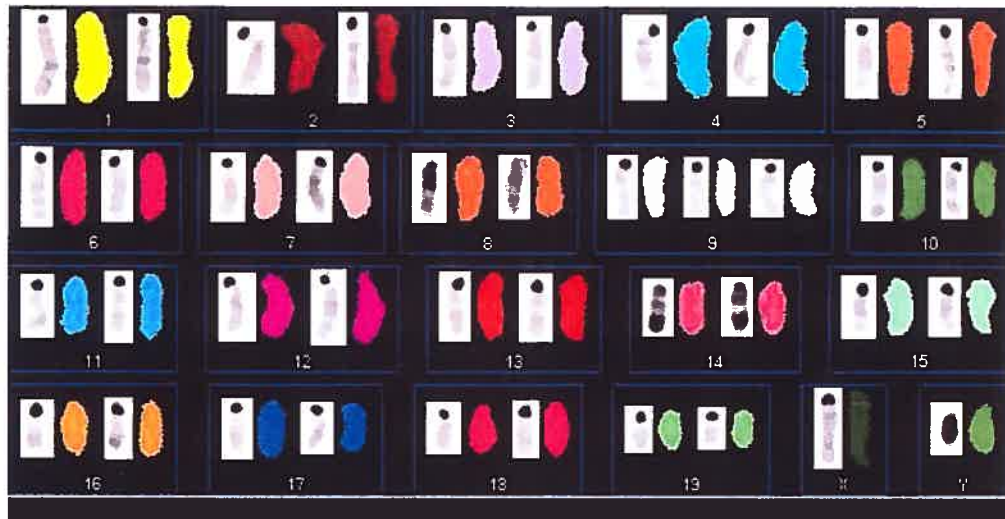
E



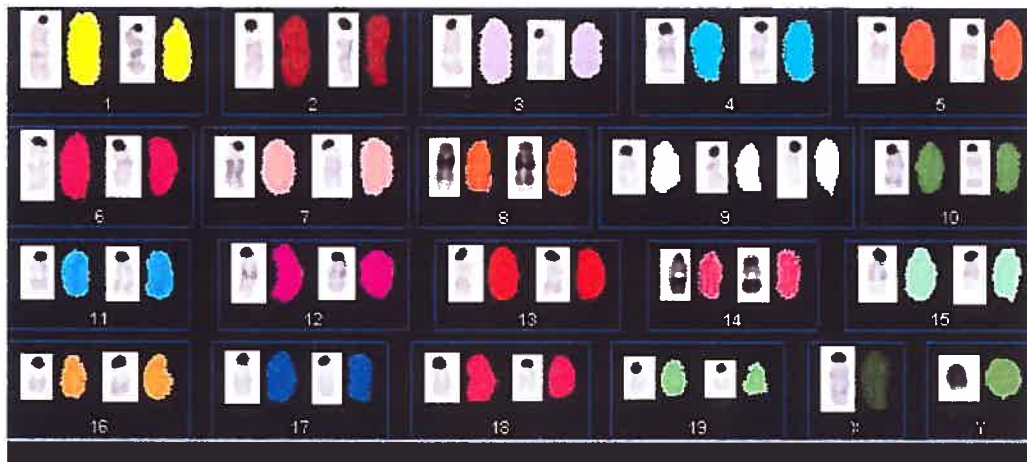
F

Clone #152 : L'analyse de 20 métaphases a démontré :

- Une formule chromosomique à 41,XY,+9 dans 13 cellules (G,H)
- Les 7 autres métaphases n'ont pas la trisomie 9, mais ont des pertes chromosomiques dont la perte du chromosome X dans 4 cellules et la perte du chromosome Y dans 2 cellules.



G



H

ANNEXE IV :

Marqueurs STS dans la région distale
au locus BTK

