

Filière Technologies du vivant

Orientation Biotechnologie

Diplôme 2007

Jonathan Thevenet

*Développement de vecteurs viraux
permettant une expression spécifique
du transgène dans les neurones*

Professeur

Sergio Schmid

Experts

Jean—Charles Bensadoun
Bernard Schneider

SI	TV	EE	IG	EST
X	X	X	X	

Filière / Studiengang : Life Technologies

Confidentiel / Vertraulich ☐

Etudiant / Student Jonathan Thevenet	Année scolaire / Schuljahr 2006/07	No TD / Nr. DA TV/2007/70
Proposé par / vorgeschlagen von Dr. Jean-Charles Bensadoun Neurodegenerative Studies Laboratory EPFL CH-1015 Lausanne jean-charles.bensadoun@epfl.ch	Lieu d'exécution / Ausführungsort EPFL Expert / Experte Jean-Charles Bensadoun Bernard Schneider	

Titre / Titel:

Développement de vecteurs viraux permettant une expression spécifique du transgène dans les neurones

Description / Beschreibung:

Dans le cadre de nombreuses maladies neurodégénératives parmi lesquelles la maladie de Parkinson et la sclérose latérale amyotrophique, et depuis ces 10 dernières années, l'utilisation de vecteurs viraux permettant une expression localisée d'un transgène dans une zone du système nerveux central s'est largement répandue. Plus spécifiquement, des vecteurs viraux tels que l'adénovirus, le lentivirus et le virus adéno-associé ont permis dans un premier temps de considérer la thérapie génique comme une alternative potentielle pour les maladies neurodégénératives. Parallèlement, et avec l'implication soutenue de facteurs héréditaires dans la transmission de plusieurs pathologies, l'outil viral a permis la création de modèles animaux génétiques aussi bien chez les rongeurs que chez le primate.

Dans une perspective clinique et dans le but de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les processus de neurodégénérescence, il serait intéressant de pouvoir orienter d'avantage l'expression du gène d'intérêt en se limitant à un certain type cellulaire.

Le développement et l'optimisation de modèles animaux génétiques de la maladie de Parkinson représente un projet primordial dans le cadre de notre laboratoire. Les résultats de ce projet devraient ainsi faciliter le screening de traitements potentiels de la maladie.

Objectifs / Ziele:

Le but de ce projet de master serait dans un premier temps axé sur le développement de constructions virales, principalement de type AAV, par des méthodes de biologie moléculaire afin d'insérer des promoteurs spécifiques connus et ainsi obtenir une expression du transgène uniquement chez les neurones. Le promoteur du gène de la synapsine et de l'énolase neurone-spécifique représentent deux candidats intéressants. La fonctionnalité des constructions, après production de particules virales AAV dans notre laboratoire, se testera à l'aide d'un gène rapporteur du type GFP (green fluorescent protein) après injection stéréotaxique dans la substance noire de rats. Dans un deuxième temps, le projet vise à cloner une forme mutée de l' α -synucléine (impliquée dans des formes héréditaires de la maladie de Parkinson) dans ces nouveaux systèmes d'expression promoteur-spécifique, et de les tester in vivo. L'injection localisée de solutions concentrées de virus contenant la forme mutée de l' α -synucléine sous le contrôle d'un promoteur spécifique aux neurones devrait nous permettre d'élaborer un modèle plus précis de la maladie de Parkinson et également de faciliter la compréhension des mécanismes moléculaires liés à la neurodégénérescence induite par la forme mutée de l' α -synucléine.

Signature ou visa / Unterschrift oder Visum

Leiter Vertiefungsrichtung Biotechnologie

Professeur/Dozent: Sergio Schmid

Etudiant/Student:

Délais / Termine

Attribution du thème / Ausgabe des Auftrags:
03.09.2007Remise du rapport / Abgabe des Schlussberichts:
01.02.2008 — 16.00 UhrExposition publique / Ausstellung Diplomarbeiten:
30.11.2007Défenses orales / Mündliche Verfechtungen
14.02.2008 — 15.02.2008

Développement de vecteurs viraux permettant une expression spécifique du transgène dans les neurones

Objectif

Ce projet consiste à développer une série de constructions pour la production de virus recombinants adéno-associés (AAV), permettant une expression du transgène dans les neurones, à l'aide de différents promoteurs spécifiques. Ces constructions seront appliquées pour l'expression de transgènes pathogéniques et neuroprotecteurs dans un modèle animal génétique de la maladie de Parkinson.

Résultats

Les différents virus de type AAV sont générés par recombinaison entre une construction receveuse contenant le génome de l'AAV2 et de trois plasmides donneurs différents contenant les promoteurs neurospécifiques synapsine, prion ou énalase, à l'aide du système Gateway[®] développé par Invitrogen. Le gène rapporteur codant pour la protéine fluorescente FPmax est cloné pour tester l'expression obtenue. Le promoteur du cytomégalo virus (CMV) est utilisé comme promoteur ubiquitaire de référence.

Dans un deuxième temps, la fonctionnalité des plasmides générés, ainsi que des vecteurs viraux AAV de sérotype 6 produits à partir de ces plasmides, est testée dans différents types cellulaires. Tout d'abord, chaque plasmide est transfecté dans des cellules humaines rénales HEK 293T par précipitation au phosphate de calcium. Contrairement au promoteur CMV, les trois promoteurs neurospécifiques n'induisent pas d'expression dans ce type cellulaire et l'expression du transgène n'interfèrera donc pas avec la production virale effectuée dans ce même type cellulaire.

Les différents virus sont ensuite produits afin de tester leur expression *in vitro* et *in vivo*.

L'expression et la spécificité des constructions sont testées, *in vitro*, par infection de co-cultures primaires de cellules neuronales et gliales. Bien que l'expression virale ne présente pas une distribution strictement neuronale, les taux d'expression obtenus dans ces deux types cellulaires reflètent clairement leur spécificité. Le promoteur synapsine est fortement neurospécifique, prion est strictement neuronal mais présente une très faible expression tandis que le promoteur énalase est peu spécifique. Le promoteur CMV possède une forte expression au niveau des cellules gliales.

In vivo, les virus sont testés par injection stéréotaxique dans la substance noire chez le rat. Au contraire du spectre d'infection observé *in vitro*, l'AAV possède un tropisme presque exclusivement neuronal dans cette structure, qui ne permet donc pas une évaluation de la spécificité cellulaire de l'expression. Les différents promoteurs montrent une nette expression dans les neurones dopaminergiques, mais plus faible qu'avec le promoteur CMV.

Sur cette base, le promoteur synapsine est sélectionné pour le clonage de l' α -synucléine, un gène impliqué dans la pathogenèse de la maladie de Parkinson. Le virus est produit mais n'a pu être testé dans le cadre de cette étude.

Bien que les promoteurs neurospécifiques procurent un premier degré de spécificité cellulaire dans le niveau d'expression, ils ne permettent pas d'obtenir une expression strictement confinée à un certain type cellulaire. Chaque type cellulaire exprime un ensemble de microARN endogènes qui lui est propre. La présence de ces ARN peut être exploitée pour réprimer la traduction de transcrits portant la séquence cible du microARN, afin d'améliorer la spécificité cellulaire de l'expression du transgène.

Dans le but de contrôler l'applicabilité de cette approche *in vivo*, la répression de l'expression via le clonage de la séquence cible du microARN mir-133b, qui est exprimé spécifiquement dans les neurones dopaminergiques de la substance noire, est testée au niveau des neurones dopaminergiques. Malheureusement, l'insertion de quatre copies de la séquence cible du mir-133b dans la partie 3' non traduite du transgène FPmax sous le contrôle du promoteur CMV, ne permet pas une répression majeure de l'expression de la protéine FPmax au niveau des cellules neuronales de la substance noire.

Mots-clés

AAV, culture primaire, maladie de Parkinson, promoteurs neurospécifiques, microARN, thérapie génique

Entwicklung von viralen Vektoren zur Neuron-spezifischen Transgenexpression

Zielsetzung

Das vorliegende Projekt bestand in der Aufgabe, eine Palette von Konstrukten zur Produktion von Adeno-assoziierten rekombinanten Viren zu entwickeln, die es, mittels verschiedener spezifischer Promotoren, erlauben würden, bestimmte Transgene spezifisch in neuronalen Zellen zu exprimieren. Diese Konstrukte werden im Weiteren verwendet werden, um verschiedene pathogene und protektive Transgene in einem Parkinson-Tiermodell zu testen.

Resultate

Die verschiedenen Konstrukte wurden hergestellt durch die Rekombination eines Empfänger-Plasmids, das das Genom für den AAV-2 enthält, und drei verschiedener Geber-Plasmide, die entweder die Sequenz für Neuron-spezifisches Synapsin, diejenige für Neuron-spezifisches Prionprotein, oder aber diejenige für Neuron-spezifische Enolase enthalten. Die Rekombinationsreaktion wurde mittels dem sogenannten Gateway® -System (Invitrogen) erzielt. Um die jeweilige Expressionsstärke der Vektoren direkt ermitteln zu können, wurde als Transgen das Gen für das FPmax-Markerprotein hinzugefügt. Der Cytomegalovirus-Promoter schliesslich wurde wegen seinem weitverbreiteten Expressionsmuster als Referenzpromotor verwendet.

In einer zweiten Phase des Projekts wurden die so hergestellten Plasmid-Konstrukte, sowie die daraus resultierenden Virusvektoren (AAV6), ausführlich auf ihre Funktionalität hin in verschiedenen Zelllinien getestet. Zuerst wurde jedes einzelne Konstrukt zur Calcium/Phosphat-Transfektion von humanen HEK 293T-Zellen verwendet. Im Gegensatz zum CMV-Promotor führten die drei anderen Plasmide zu keinerlei Transgenexpression – was uns auch zeigt, dass es bei der Virusproduktion in der 293T-Zelllinie voraussichtlich nicht zu Komplikationen kommen sollte, die auf eine Transgenexpression zurückzuführen wären.

Die verschiedenen Virusvektoren wurden anschliessend auf ihre Expressionsstärke und Zelltyp-Spezifität hin *in vitro* und *in vivo* getestet.

In vitro geschah dies durch die Infektion von Kulturen, die sowohl Neuronen wie Glia enthielten. Auch wenn das Expressionsmuster nicht ausschliesslich neuronal war, so spiegelte doch die quantitative Expression in den zwei Zelltypen eine Neuron-spezifische Infektivität wider. Der für Synapsin codierende Promotor zeigte sich als klar neuronal und wies eine hohe Infektionsrate auf; der Prion-Promotor erwies sich als am ausschliesslichsten Neuron-spezifisch, war aber nicht sehr effizient; der Enolase-Promotor stellte sich als der wenigst Zelltyp-spezifische heraus. Der als Referenz verwendete CMV-Promotor zuletzt exprimierte das getestete Transgen vor allem in den Glia.

In vivo wurden die Virusvektoren stereotaxisch in die *Substantia Nigra* von Ratten injiziert. Im Gegensatz zu den Tests, die wir *in vitro* ausführen konnten, besitzt der AAV6 in dieser Hirnregion ohnehin schon eine fast ausschliessliche Affinität für Neuronen – weshalb wir hier die zellspezifische Transgenexpression nicht testen konnten. Alle verwendeten Vektoren zeigten ein klares Expressionsmuster in den dopaminergen Nervenzellen, während der CMV-Promotor die schwächste Infektivität und niedrigste Expressionsrate aufwies.

Im Licht dieser Resultate wurde der Synapsin-Promotor ausgewählt, um damit ein Konstrukt herzustellen, das anstelle des Markerproteins das mit der Pathogenese von Parkinson assoziierte α -Synuclein-Protein exprimieren würde. Der entsprechende Virusvektor wurde bereits hergestellt – ist aber aus Zeitgründen nicht mehr im Rahmen des beschriebenen Projekts getestet worden.

Abschliessend ist zu sagen, dass, obwohl diese Promotoren einen ersten Schritt in Richtung einer Neuron-lastigen Expression darstellen, ein ausschliesslich neuronaler Tropismus damit noch nicht erreicht ist.

Jeder Zelltyp exprimiert jedoch eine Auswahl an sogenannten microRNAs, die man sich zu Nutze machen könnte, um die Transkription derjenigen Transkripte zu unterdrücken, die die entsprechende Zielsequenz tragen. Auf diese Weise könnte man womöglich am Ende das Expressionsmuster des jeweiligen Transgens auf einen Zelltyp beschränken. Mit dem Ziel, die Umsetzbarkeit dieser Methode *in vivo* zu testen, haben wir zu ermitteln versucht, ob die Transgenexpression in dopaminergen Neuronen mittels der Verwendung der Sequenz für die microRNA mir-133b, die spezifisch in dopaminergen Nervenzellen der *Substantia Nigra* vorhanden ist, unterdrückt werden kann. Unglücklicherweise zeigte diese Zielsequenz, deren vier Kopien in das nicht-transkribierte 3'-Ende des FPmax unter der Kontrolle des CMV- Promotors kloniert wurden, keine klare Unterdrückung des FPmax in den dopaminergen Neuronen.

Schlüsselbegriffe

AAV, Primärkultur, Parkinson, Neuron-spezifische Promotoren, microRNA, Gentherapie

Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Patrick Aebischer pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce sujet.

Je remercie vivement Jean-Charles Bensadoun et Bernard Schneider pour leur encadrement, leur soutien, leur disponibilité, leurs conseils et surtout leur bonne humeur. Merci également à mon professeur Sergio Schmid.

Mes remerciements vont également au personnel technique du laboratoire en commençant par Vivianne Padrun et Fabienne Pidoux pour la production des virus, Philippe Colin pour les expériences sur les animaux et Cristel Sadeghi pour ces conseils en histologie et en immunohistochimie. Je remercie ensuite les membres du laboratoire, spécialement Meret Gaugler pour la traduction en allemand de mon résumé et Delphine Charvin pour le temps passé à me former et à m'aider au développement des co-cultures primaires de neurones. Merci à Liliane Glauser pour ces conseils et pour ces magnifiques co-cultures matures de neurones.

Merci à Osvaldo Mirante sans qui je n'aurais jamais fait la démarche pour demander ce stage dans ce laboratoire. Merci à Joëlle Quiquerez ;-) et Françoise Flejszman pour la relecture de mon travail et les corrections apportées. Merci à mes amis Cristina, Emilie, Florent et Fabrice, ainsi qu'à mes collègues de marche, de bateau, de bus et de métro : Lauren, Magalie et Stéphane.

Mes remerciements vont bien évidemment à mes parents et pour finir, à ma fiancée, Nolwenn, pour son soutien, sa compréhension et sa patience.

Table des matières

1. INTRODUCTION	10
1.1. OBJECTIFS	10
1.2. MALADIE DE PARKINSON	11
1.3. VIRUS ASSOCIÉ À L'ADÉNOVIRUS.....	13
1.4. PROMOTEUR	15
1.5. FPMAX	18
1.6. TECHNOLOGIE GATEWAY®	19
1.7. MICROARN.....	22
2. CONSTRUCTION DES PLASMIDES	23
2.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	23
2.1.1. <i>Matériel</i>	23
2.1.2. <i>Méthodes</i>	27
2.1.2.1. Electroporation	27
2.1.2.2. Extraction de plasmide - Miniprep	28
2.1.2.3. Extraction de plasmide - Maxiprep	30
2.1.2.4. Restriction enzymatique	31
2.1.2.5. Préparation d'un gel d'agarose.....	32
2.1.2.6. Ligation.....	33
2.1.2.7. Extraction d'ADN du gel d'agarose	33
2.1.2.8. Conversion de vecteurs en vecteurs de destination Gateway	34
2.1.2.9. Réaction de recombinaison.....	36
2.1.2.10. Préparation et clonage du mir	37
2.2. RÉSULTATS.....	39
2.2.1. <i>Stratégie de clonage</i>	39
2.2.2. <i>Amplification des plasmides de départ</i>	47
2.2.3. <i>Modification du plasmide pENTR/D-TOPO-Prion</i>	52
2.2.4. <i>Conversion des vecteurs pAAV en vecteurs de destination Gateway®</i>	57
2.2.5. <i>LR réaction</i>	66
2.2.6. <i>Séquençage des promoteurs de vecteurs de type pEXP</i>	73
2.2.7. <i>Clonage du gène FPmax</i>	76
2.2.8. <i>Clonage du gène Synucléine</i>	81
2.2.9. <i>Clonage du mir-133b</i>	86
2.2.10. <i>Amplification des vecteurs pour la production virale</i>	90
2.2.11. <i>Séquençage des gènes insérés dans les plasmides de type pAAV</i>	92

3. EXPRESSION ET SPECIFICITE DES VIRUS.....	93
3.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	93
3.1.1. <i>Matériel</i>	93
3.1.2. <i>Méthodes</i>	96
3.1.2.1. Transfection par précipitation au phosphate de calcium	96
3.1.2.2. Production virale	96
3.1.2.3. Titration des virus.....	96
3.1.2.4. Co-culture primaire de neurones et de cellules gliales	100
3.1.2.5. Immunologie sur les cultures	103
3.1.2.6. Injection stéréotaxique et perfusion	104
3.1.2.7. Coupe des cerveaux de rat	104
3.1.2.8. Immunologie sur les coupes flottantes des cerveaux de rat.....	105
3.2. RÉSULTATS.....	106
3.2.1. <i>Expression du FPmax dans les cellules HEK 293T</i>	106
3.2.2. <i>Production et titration des virus</i>	107
3.2.3. <i>Optimisation des co-cultures primaires de cellules neuronales et gliales</i>	108
3.2.4. <i>Essai d'infection des co-cultures primaires avec les différents virus</i>	110
3.2.5. <i>Expression neuronale du FPmax in vitro</i>	111
3.2.6. <i>Spécificité des différents virus in vitro</i>	115
3.2.7. <i>Expression neuronale du FPmax in vivo</i>	117
3.2.8. <i>Spécificité des différents virus in vivo</i>	120
4. DISCUSSION.....	123
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	126
6. BIBLIOGRAPHIE.....	127
7. ANNEXES.....	132

Liste des abréviations :

a.a	acides aminés
AAV	Virus Adéno-Associé
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
Ap ^R	résistance à l'ampicilline
ARN	Acide RiboNucléique
<i>att</i>	séquences spécifiques d'attachement
BSA	Albumine de sérum bovin
<i>cap</i>	gène codant pour la capsid
<i>ccdB</i>	gène codant pour la protéine CcdB
CMV	promoteur CytoMégaloVirus (CMV)
DAPI	diamidino-4',6-phénylindol-2-dichlorhydrate
DIV	division
FBS	sérum fœtal de bovin (Fœtal Bovin Serum)
GFAP	Acide Protéique Fibrillaire Glial
GFP	protéines fluorescentes vertes (Green Fluorescent Protein)
HEK 293T	cellules cancéreuses d'embryon de reins humain
HS	sérum de cheval (Horse Serum)
ITRs	séquences de répétitions inversées (Inverted Terminal Repeats)
Km ^R	résistance à la kanamycine
MAP2	protéines II associées aux microtubules
MCS	Multiple Cloning Site
NDS	Sérum normal d'âne (Normal Donkey Serum)
miRNA ou mir	micro Acide RiboNucléique
NSE	Neuron-Spécific Enolase
pb	paires de bases
PC12	cellules tumorales de glande médullo-surrénale de rat
<i>rep</i>	gène de la réplicase
siRNA	« silencingRNA »
SNpc	Substance Noire pars compacta (SNpc).
TH	Tyrosine Hydroxylase
TU	unité de transduction

1. INTRODUCTION

Depuis ces 10 dernières années, l'utilisation de vecteurs viraux tels que l'adénovirus, le lentivirus et le virus adéno-associé (AAV) a permis de considérer la thérapie génique comme un traitement potentiel pour les maladies neurodégénératives. En outre, l'outil viral a favorisé la création de modèles animaux génétiques aussi bien chez les rongeurs que chez les primates.

Le laboratoire développe et optimise des vecteurs viraux de type AAV afin de créer des modèles de la maladie de Parkinson servant à étudier les mécanismes pathologiques et de tester des substances neuroprotectrices. Une expression spécifique du transgène au niveau neuronal améliorerait les modèles existants et favoriserait une meilleure appréhension des mécanismes moléculaires.

1.1. Objectifs

L'objectif de ce projet consiste d'abord à développer une série de constructions virales de type AAV exprimant spécifiquement le transgène dans les neurones.

Pour ce faire, différentes constructions avec des promoteurs neurospécifiques sont réalisées à partir de plasmides de type pAAV.

La fonctionnalité des constructions est testée, *in vivo*, par injection stéréotaxique dans la substance noire chez le rat, de particules virales produites à partir des plasmides possédant un gène rapporteur codant pour la protéine FPmax.

Dans un deuxième temps, le projet vise à cloner une forme mutée de l' α -synucléine dans ces nouveaux systèmes d'expression promoteurs spécifiques et de les tester *in vivo*.

Trois promoteurs neurospécifiques sont étudiés, soit : le synapsine, le prion et l'énolase neurospécifique (NSE). Les promoteurs sont insérés à la place du promoteur cytomégalovirus (CMV) en utilisant le système Gateway[®] développé par Invitrogen. Le gène rapporteur ou d'expression est inséré au niveau du « multiple cloning site » (MCS).

1.2. Maladie de Parkinson

1.2.1. Pathologie

La maladie de Parkinson est la deuxième maladie neurodégénératrice après la maladie d'Alzheimer. Elle affecte plus de 1 à 2 % de la population après 60 ans. Elle se manifeste cliniquement par un tremblement, une rigidité, une difficulté et une lenteur à exécuter des mouvements volontaires et des problèmes d'équilibre.

Elle est marquée par la dégénération sélective des neurones dopaminergiques de la substance noire et la formation d'inclusions cytoplasmiques nommées Corps de Lewy.

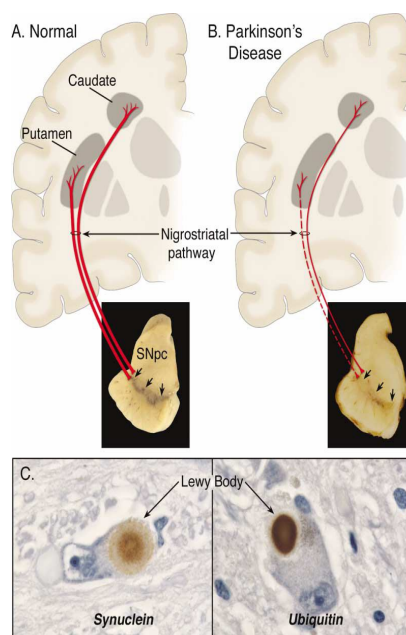


Figure 1 : Neuropathologie de la maladie de Parkinson ^[1]

- A. Représentation de la voie nigro-striée, chez une personne saine
- B. Représentation de la voie nigro-striée, chez une personne malade
- C. Immunohistochimie d'inclusion intra-neuronale

La voie nigro-striée est composée de neurones dopaminergiques dont les corps cellulaires sont localisés dans la substance noire pars compacta (SNpc). Ces neurones se prolongent pour former des synapses au niveau du striatum (putamen et caudate nucleus). Ils produisent de la neuromélanine qui donne cette pigmentation à la SNpc, surlignée par des flèches au niveau de la photographie de la figure 1, A.

Dans la maladie de Parkinson, la perte des neurones dopaminergiques, au niveau de la SNpc, entraîne la dégénération de la voie nigro-striée. Cette perte de neurone s'observe avec la dépigmentation de la SNpc sur la photographie de la figure 1, B ^[1].

1.2.2. Neurodégénérescence

La maladie se présente principalement sous forme sporadique (90 % des cas). De ce fait, la raison de la dégénérescence neuronale reste mal comprise.

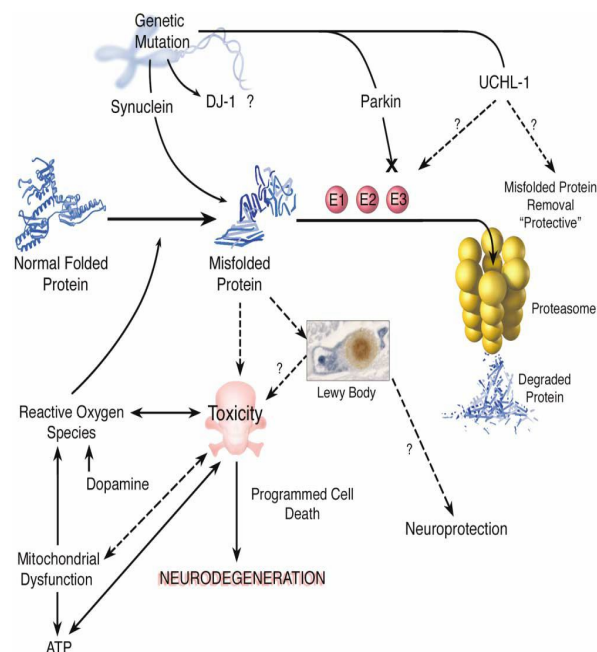


Figure 2 : Mécanisme de la neurodégénération ^[1]

Certaines mutations peuvent induire directement des protéines avec une conformation anormale (α -synucléine). D'autres mutations endommagent la machinerie cellulaire capable de détecter et de dégrader les protéines anormalement conformées (Parkin, UCH-L1). Un dommage oxydatif lié à un dysfonctionnement mitochondrial et un métabolisme dopaminergique anormal peuvent également provoquer des protéines avec une conformation anormale. Cependant, le rôle de ces protéines mal conformées reste incertain. Ces protéines peuvent être directement toxiques ou alors endommager les cellules par la formation d'agrégats (Corps de Lewy).

1.2.3. Alpha synucléine

Dans la maladie de Parkinson, 13 loci et 8 gènes sont identifiés pour les formes héréditaires. Le gène codant pour l' α -synucléine suscite un grand intérêt pour cette maladie car ses formes mutées (A53T, A30P, E46K, duplication et triplification) sont responsables d'une forme héréditaire. De plus, il est également impliqué dans les formes sporadiques de la maladie par la présence de l' α -synucléine comme composant principal des corps de Lewy (Figure 1, C).

L' α -synucléine humaine est une protéine neuronale (presynaptic nerve terminal) de 140 acides aminés (a.a) codée par un gène situé sur le chromosome 4. Naturellement dépliée, elle représente environ 1 % des protéines cytosoliques dans le cerveau. L' α -synucléine appartient à une famille de protéines de structure qui sont exprimées dans le système nerveux central et qui inclut la β -synucléine et la γ -synucléine.

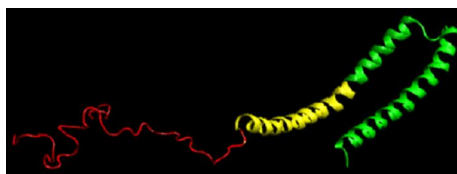


Figure 3 : Structure de l' α -synucléine ^[2]

N-terminal : partie répétitive associé aux membranes (1-60 a.a)
NAC : partie hydrophobique → aggrégation (61-97)
C-terminal : partie acide (98-140)

1.3. Virus associé à l'adénovirus

1.3.1. Généralités

Le virus associé à l'adénovirus a été découvert en 1965 en tant que contaminant dans un extrait d'adénovirus ^[3,4]. L'AAV est un virus à ADN monocaténaire de la famille des parvoviridés ^[5].

L'AAV mesure 20 nm de diamètre avec un génome d'environ 5 kb. Il possède une capacité de clonage maximale de 4.5 kb. Il infecte les cellules quiescentes et possède une faible réaction immunitaire.

L'AAV est naturellement déficient pour la réplication comme tous les virus dépendants (dependovirus). De ce fait, pour effectuer un cycle infectieux, il nécessite la présence d'un autre virus auxiliaire, tel qu'un adénovirus, un virus herpétique, un cytomégalovirus ou encore un virus pseudorabies ^[3,4,6,7].

Lorsqu'un AAV infecte une cellule en l'absence d'un virus auxiliaire, l'ADN de l'AAV s'intègre dans le génome de la cellule-hôte, où il reste sous forme de provirus latent ^[8]. L'intégration dans des cellules humaines s'effectue préférentiellement à un locus sur le chromosome 19 ^[9]. Dans des cellules infectées par un virus auxiliaire, l'AAV effectue un cycle lytique produisant des virions ^[6]. Les AAV recombinants (rAAV) produits à partir du plasmide pAAV perdent leur capacité à s'intégrer. Les rAAV restent sous forme épisomale.

L'infection par l'AAV est non pathogène mais très répandue. Selon les études, 35 à 80 % de la population est séropositive à l'AAV ^[10,11,12].

L'AAV est très utilisé pour la thérapie génique du système nerveux. En effet, certains sérotypes ciblent essentiellement les neurones et l'expression du transgène est maintenue à long terme ^[13].

1.3.2. Génome de l'AAV

Le génome de l'AAV de petite taille (environ 5 kb) comporte une région centrale avec les gènes *rep* (réplicase) et *cap* (capside) bordés par des séquences de répétitions inversées de 145 bp notées ITRs (inverted terminal repeats) ^[14].

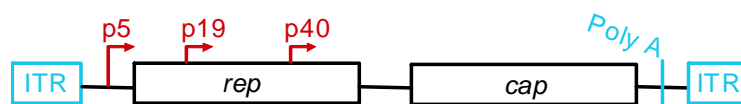


Figure 4 : Génome du virus adéno-associé ^[14]

Les répétitions terminales sont les seuls éléments nécessaires pour la réplication virale et la transcription. Les AAV recombinants (rAAV) pour la thérapie génique sont construits en supprimant les gènes *rep* et *cap* remplacés par le transgène.

1.3.3. Production de virus

La manipulation *in vitro* de l'AAV est facilitée par le clonage des répétitions inversées dans un vecteur plasmidique pour insérer le transgène entre elles.

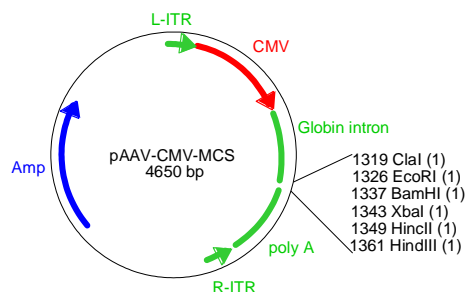


Figure 5 : Carte du vecteur pAAV-CMV-MCS

Le plasmide utilisé possède le gène *amp* permettant une sélection des plasmides au niveau bactérien. La partie comprise entre les deux ITR (partie formant le génome du virus souhaité) possède un promoteur, un intron et un polyA. Le promoteur CMV régule la région codante. L'intron globine améliore la transcription. Il est supprimé lors des modifications co-transcriptionnelles de l'ARN durant l'étape d'excision épissage. Le polyA permet de stabiliser l'ARN messager.

La production virale à partir des plasmides pAAV s'effectue par cotransfection (Figure 6). En effet, le plasmide contenant l'information génétique du virus est introduit dans des cellules HEK 293T avec un autre plasmide contenant les gènes nécessaires à la réplication et à l'encapsidation du génome viral ^[15].

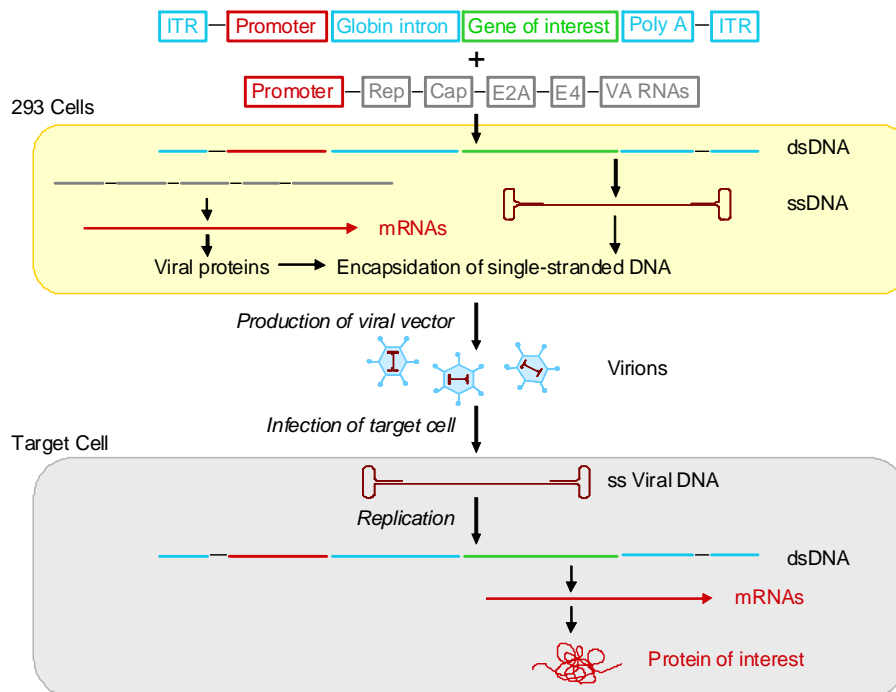


Figure 6 : Procédé de production virale et expression du transgène par infection des cellules cibles à l'aide du virus produit ^[15]

1.4. Promoteur

1.4.1. Généralités

Le promoteur est une région de régulation située en amont de la région codante d'un gène, à proximité de son extrémité 5'. Il comporte certaines séquences d'ADN caractéristiques permettant, d'une part, la fixation du complexe d'initiation et d'autre part, la liaison avec des protéines régulatrices de la transcription.

Les promoteurs, chez les eucaryotes, possèdent des structures spécifiques aux différents gènes. Certaines séquences consensus se retrouvent dans les différents promoteurs ^[16, 17] :

- * Boîte TATA : séquence consensus de 6 nucléotides (TATAAA) riche en Adénine et Thyrosine. Elle est située entre -26 et -34 paires de bases (pb) de l'origine de transcription. Cette séquence fixe un facteur général de transcription (TFIID)
- * Boîte GC : motif riche en GC (GGGCGG) qui peut être répété plusieurs fois. Il est situé le plus souvent dans la région -110 et -40 pb
- * Boîte CCAAT : séquence située dans la région -120 et -80 pb

1.4.2. Promoteur neuro-spécifique

1.4.2.1. Synapsine

Les synapsines sont des phosphoprotéines synaptiques associées aux vésicules. La famille des synapsines est composée de 10 isoformes chez les mammifères. Les synapsines sont impliquées dans de multiples interactions avec les protéines des vésicules synaptiques et les phospholipides, les actines et les protéines kinases. A travers ces interactions, les synapsines jouent des rôles multiples dans la transmission synaptique, tels que ^[18] :

- * Le contrôle de la formation des synapses
- * La régulation des vésicules synaptiques
- * Le relâchement des neurotransmetteurs
- * L'expression à court terme du phénomène de plasticité synaptique

Le promoteur de la synapsine ne présente pas de motif consensus TATA et CCAAT. Un seul site d'initiation de la transcription est observé. La séquence comprise entre les nucléotides -225 et -152 pb, par rapport à l'origine de transcription, est critique pour la fonction spécifique du promoteur ^[19]. La région comprise entre -316 et +48 pb est utilisée comme séquence promotrice pour cette étude.

1.4.2.2. Prion

La maladie du prion humaine est une maladie neurodégénérative rare qui regroupe la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJD), le syndrome Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) et l'insomnie familiale fatale (FFI).

La maladie est caractérisée par une accumulation dans le cerveau d'une forme anormale d'une glycoprotéine endogène, la protéine prion (PrP).

Le promoteur du prion possède une séquence consensus CCAAT, à la position -710. La séquence comprise entre les nucléotides -148 et -114, par rapport à l'origine de transcription, est critique pour l'expression neuronale. La région comprise entre -225 et -25 est utilisée comme séquence promotrice pour cette étude ^[20, 21].

1.4.2.3. Enolase neurospécifique

L'énolase neurospécifique (NSE) est un isoforme de l'enzyme glycolitique énolase. Trois isoformes de l'énolase (2-phospho-D-glycerate hydrolase, EC 3.2.11) sont présents dans les tissus mammifères humains :

- * $\alpha\alpha$, énolase non-neuronale (NNE)
- * $\beta\beta$, énolase muscle-spécifique (MSE)
- * $\gamma\gamma$, énolase neurospécifique (NSE)

NSE est localisée dans les cellules neuronales et les cellules neuroendocrines. Elle est reconnue comme un marqueur protéique des neurones matures ^[22].

Le promoteur de NSE ne présente pas de motifs consensus typiques TATA et CCAAT ^[23].

1.5. FPmax

Les protéines fluorescentes vertes (GFP) sont largement connues grâce à leur utilisation comme marqueurs fluorescents dans les études scientifiques ^[24].

La recherche sur ces protéines a commencé suite à la découverte de la GFP issue de la méduse *Aequorea victoria*. La protéine fluorescente utilisée lors de cette étude est la FPmax verte. Le gène codant pour la FPmax a été isolé d'un petit crustacé copépode (Règne : *Animalia*, Phylum : *Arthropoda*, Sous-phylum : *Crustacea*, Classe : *Maxillopoda*, Sous-classe : *Copepoda*) ^[25].



Figure 7 : Copepod *Pontellina plumata* ^[26]

La protéine FPmax possède les caractéristiques suivantes :

- × Poids moléculaire de 26 kDa
- × Polypeptide de 232 acides aminés
- × Longueur d'onde d'excitation à 482 nm
- × Longueur d'onde d'émission à 502 nm

FPmax est privilégiée par rapport à la protéine fluorescente GFP commune car elle ne présenterait pas de réaction avec les voies de signalisation étudiées et elle possède les avantages suivants ^[27] :

- × Rapide maturation de la protéine favorisant une détection précoce
- × Vive fluorescence verte facilement détectable
- × Pas d'agrégation
- × Expression stable

1.6. Technologie Gateway®

1.6.1. Généralités

La technologie Gateway® est une méthode de clonage universelle basée sur les propriétés des sites spécifiques de recombinaison du bactériophage lambda. Elle procure une méthode rapide et efficace pour transférer des séquences d'ADN dans plusieurs vecteurs de différents types : clonage, expression, purification de protéines, production de sonde ARN, etc., comme montré sur la figure suivante.

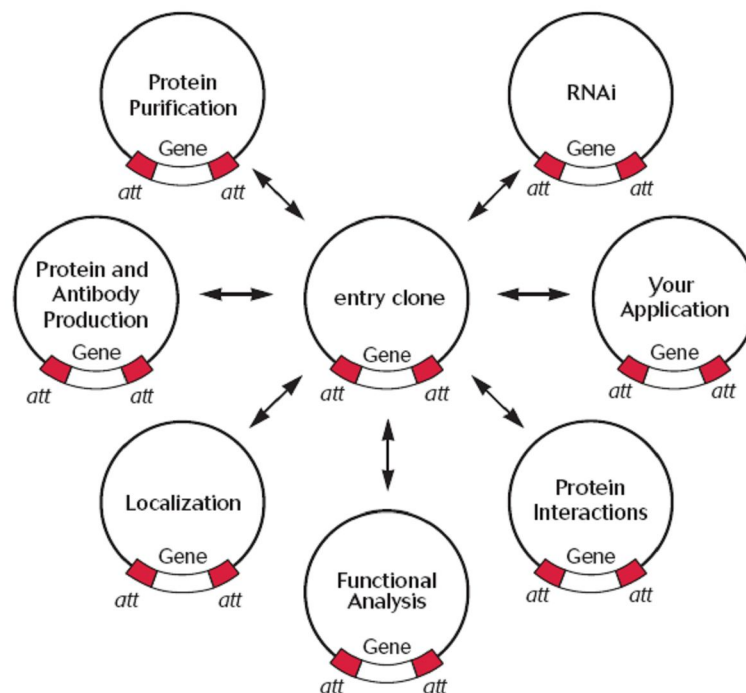


Figure 8 : Passage d'une application à l'autre avec la technologie Gateway® [28]

Le système consiste à créer un vecteur d'entrée contenant le gène d'intérêt. Celui-ci permet ensuite de transférer le gène par clonage recombinationnel (recombinational cloning) dans différents vecteurs de destination selon l'application recherchée comme illustré sur la figure ci-dessus.

Pour ce travail, le système est employé différemment. Plusieurs vecteurs d'entrée contenant les différents promoteurs sont construits. Par recombinaison avec un vecteur de destination, de type AAV, les promoteurs sont interchangeables.

1.6.2. Recombinaison

La recombinaison lambda entre 2 molécules d'ADN s'effectue au niveau de séquences spécifiques d'attachement (*att*). Les sites *att* permettent la fixation de protéines de recombinaison ^[29]. Ces protéines découpent, attachent et lient de façon covalente l'ADN.

La réaction de recombinaison par les recombinases de la famille λ intégrase est conservative (pas de gain ni de perte de nucléotides) et hautement spécifique ^[29]. Elle diffère selon que le bactériophage Lambda utilise le cycle lytique ou lysogénique ^[28].

Le système est composé de 2 types de réactions :

- * Réaction BP $attB \times attP \rightarrow attL + attR$
- * Réaction LR $attL \times attR \rightarrow attB + attP$

La première réaction (voie lysogénique) est catalysée par le bactériophage Lambda intégrase (Int) et les protéines d'*E.coli* « integration host factor » (IHF) et la seconde (voie lytique) par Int, IHF et l'excisionase (Xis) ^[30].

La recombinaison BP s'effectue entre 2 vecteurs ou un vecteur avec un produit PCR :

- * Vecteur donneur
- * Vecteur d'expression
- * Vecteur donneur
- * Produit PCR

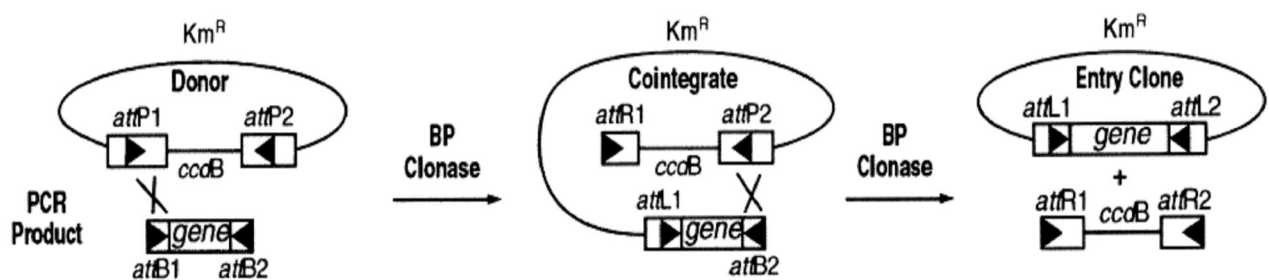


Figure 9 : Recombinaison de type BP d'un gène, contenu dans un produit PCR, dans un vecteur donneur ^[30]

La recombinaison représentée par une croix s'effectue entre 2 sites *att* (site spécifique d'attachement) catalysée par un mélange d'enzymes BP Clonase. Celles-ci permettent l'échange du gène d'intérêt avec le gène *ccdB*.

Km^R : résistance à la kanamycine

ccdB : gène codant pour la protéine CcdB (protéine interférant avec l'ADN gyrase)

Ce type de réaction a permis la création des vecteurs pENTR/D-TOPO-Synapsin, Prion et Enolase fournis pour ce travail.

La recombinaison LR s'effectue entre 2 vecteurs :

- × Vecteur d'entrée contenant le segment d'ADN à transférer
- × Vecteur de destination

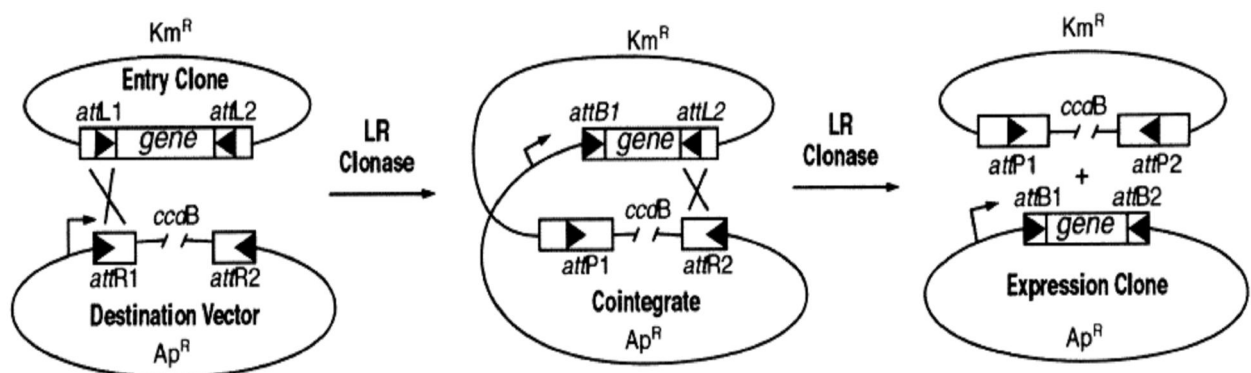


Figure 10 : Recombinaison de type LR d'un gène, contenu dans un vecteur d'entrée, dans un vecteur de destination ^[30]

La recombinaison représentée par une croix s'effectue entre 2 sites att (site spécifique d'attachement) catalysée par un mélange d'enzymes LR Clonase. Celles-ci permettent l'échange du gène d'intérêt avec le gène *ccdB*. Le sens du promoteur est indiqué par la flèche.

Km^R : résistance à la kanamycine

Ap^R : résistance à l'ampicilline

ccdB : gène codant pour la protéine CcdB (protéine interférant avec l'ADN gyrase)

Dans ce travail, les gènes de résistance sont identiques. Par contre, le gène est un promoteur neurospécifique et le vecteur de destination est un vecteur de type pAAV.

1.7. MicroARN

Les microARN sont de petits ARN non codants qui régulent l'expression des gènes en réprimant la traduction de transcrit cellulaire ciblé.

Chaque type cellulaire exprime des microARN endogènes particuliers. Ces ARN peuvent être utilisés pour réprimer la traduction des transcrits portant la séquence cible du microARN.

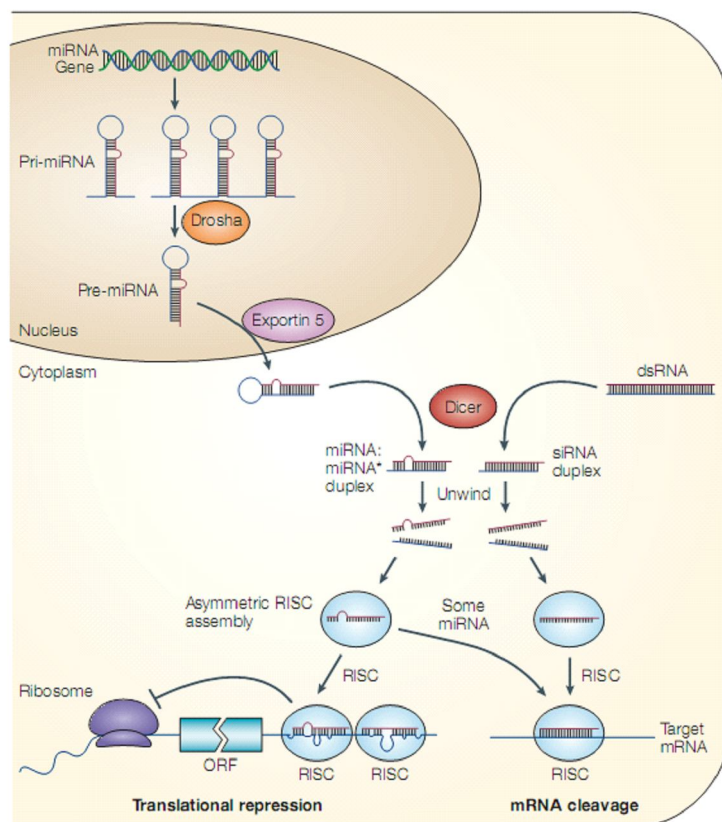


Figure 11 : Modèle de la biogenèse et de la suppression post-transcriptionnelle des microRNA et des small interfering RNA ^[31]

Les « siRNA » et « miRNA » sont similaires en termes de leurs caractéristiques moléculaires, leur biogenèse et leurs fonctions effectrices. Cependant, les « miRNA » sont différents par leur origine et leur mode de reconnaissance des cibles. En effet, les « siRNA » forment un duplex parfait avec l'ARNm cible au niveau d'un seul site et le clivage de l'ARNm cible s'effectue au niveau du site de complémentarité. Les « miRNA » se fixent au niveau de l'extrémité 3' sur plusieurs sites de complémentarités imparfaites agissant comme des régulateurs négatifs de la transcription ^[31].

2. CONSTRUCTION DES PLASMIDES

2.1. Matériel et méthodes

2.1.1. Matériel

Plasmides

pENTR/D-TOPO-Synapsin	EPFL, Lausanne (Suisse)
pENTR/D-TOPO-Prion	EPFL, Lausanne (Suisse)
pENTR/D-TOPO-Rat NSE	EPFL, Lausanne (Suisse)
pAAV-CMV-MCS	EPFL, Lausanne (Suisse)
pAAV-CMV-MCS modifié	EPFL, Lausanne (Suisse)
pAAV-CMV-FPmax	EPFL, Lausanne (Suisse)
pAAV-PGK-asyn WT	EPFL, Lausanne (Suisse)
pAAV-PGK-A30P	EPFL, Lausanne (Suisse)
pUC19	Invitrogen, Bâle (Suisse), kit N° 11828-029

Cellules

<i>E.coli</i> DH10B électrocompétentes préparées par Vivianne Padrun et Fabienne Pidoux	
One shot® <i>ccdB</i> Survival™	Invitrogen, Bâle (Suisse), N° C7510-03
T1 Phage-Resistant Cells	

Milieux nutritionnels

Luria Broth Base (Miller's LB), 25 g/l	Invitrogen, Bâle (Suisse), N° 12795-084
Lennox L Agar (LB-Agar), 32 g/l	Invitrogen, Bâle (Suisse), N° 22700-041
SOC Medium, 31g/l	Q-Bio Gene, Irvine (USA), # 3031-012
Terrific Broth II (TB), 50 capsules/l	Q-Bio Gene, Irvine (USA), # 3046-041

Les différents milieux sont préparés par Vivianne Padrun et Fabienne Pidoux

Amorces pour le séquençage

	Synthétisées par Mycrosynth, Balgach (Suisse)
betaglobin intron rev	5'-TACGTCACCTCTTGGCACG-3'
betaglobin intron rev2	5'-GCAAAGAGGCATGATACATTG-3'
betaglob fw	5'-TCTTATCTTCCTCCCACAGC-3'
hGH rev	5'-TAGGACAAGGCTGGTGGGCA-3'

Enzymes et tampons

Enzymes de restriction et tampons :

<i>Bam</i> HI (10 U/μl)	Roche Diagnostics, Rotkreuz (Suisse), # 10656275001
<i>Bgl</i> II (10 U/ μl)	Roche Diagnostics, Rotkreuz (Suisse), # 10348767001
<i>Cla</i> I (10 U/μl)	Roche Diagnostics, Rotkreuz (Suisse), # 10656291001
<i>Eco</i> RI (10 U/μl)	Roche Diagnostics, Rotkreuz (Suisse), # 11175084001
<i>Hind</i> III (10 U/μl)	Roche Diagnostics, Rotkreuz (Suisse), # 10656313001
<i>Mlu</i> I (10 U/μl)	Roche Diagnostics, Rotkreuz (Suisse), # 10909718001
<i>Nar</i> I (10 U/μl)	Roche Diagnostics, Rotkreuz (Suisse), # 11103016001
<i>Not</i> I (10 U/μl)	Roche Diagnostics, Rotkreuz (Suisse), # 11014714001
<i>Pst</i> I (10 U/μl)	Roche Diagnostics, Rotkreuz (Suisse), # 10621633001
<i>Sac</i> II (<i>Ksp</i> I) (10 U/μl)	Roche Diagnostics, Rotkreuz (Suisse), # 11117807001
<i>Xho</i> I (10 U/μl)	Roche Diagnostics, Rotkreuz (Suisse), # 10899194001
SuRE/Cut Buffer A (10 ×)	Roche Diagnostics, Rotkreuz (Suisse), # 11417959001
SuRE/Cut Buffer B (10 ×)	Roche Diagnostics, Rotkreuz (Suisse), # 11417967001
SuRE/Cut Buffer H (10 ×)	Roche Diagnostics, Rotkreuz (Suisse), # 11417991001
SuRE/Cut Buffer L (10 ×)	Roche Diagnostics, Rotkreuz (Suisse), # 11417975001

Ligase et tampon :

T4 DNA ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main (Allemagne), N° M0202S
T4 DNA ligase buffer (10 ×)	New England Biolabs, Frankfurt am Main (Allemagne), N° B0202S

Polymérase, tampon et nucléotide :

T4 DNA polymerase &	Roche Diagnostics, Rotkreuz (Suisse), # 11004786001
T4 DNA polymerase buffer (5 ×)	
dNTPs, Set	Invitrogen, Bâle (Suisse), N° 10279-018

Phosphatase :

Alkaline Phosphatase, shrimp &	Roche Diagnostics, Rotkreuz (Suisse), # 11758250001
Dephosphorylation buffer (10 ×)	

Kits

Kit NucleoSpin [®] Extract II	Macherey-Nagel, Oensingen (Suisse), N° 740609.50
Kit NucleoSpin [®] Plasmid	Macherey-Nagel, Oensingen (Suisse), N° 740588.50
Plasmide DNA Purification	Macherey-Nagel, Oensingen (Suisse), N° 740574.25
Gateway [®] Vector Conversion System with One Shot [®] <i>ccdB</i> Survival [™] Competent cells	Invitrogen, Bâle (Suisse), N° 11828-029

Solutions

Compléments pour les milieux :

Ampicilline	Roche, Bâle (Suisse), # 835269
Kanamycine	Roche, Bâle (Suisse), # 106801
Chloramphenicol	Roche, Bâle (Suisse), # 220551

Electrophorèse sur gel d'agarose :

Agarose, LE Analytical Grade	Promega, Madison (USA), # V3125
Bromure d'éthidium	Sigma-Aldrich, Steinheim (Allemagne), N° E-1510
Tampon de migration TBE 1 × : (pH 8.3)	
89 mM Tris-Base	Biosolve B.V, Valkenswaard (Pays-Bas), N° 20092391
89 mM acide borique	Fluka Chemie GmbH, Buchs (Suisse), N° 15660
2 mM EDTA	Applichem GmbH, Darmstadt (Allemagne), N° 2937,0500
Tampon de migration TAE 50 × : (pH 8.5)	
89 mM Tris-Base	Biosolve B.V, Valkenswaard (Pays-Bas), N° 20092391
50 mM EDTA	Applichem GmbH, Darmstadt (Allemagne), N° 2937,0500
17.5 % Acide Acétique	Merck Darmstadt (Allemagne), N° 1.00063.2500
Tampon de chargement 10 × :	
0.35 % (w/v) Bleu de bromophénol	BioRad, Reinach (Suisse), N° 161-0404
0.35 % (w/v) Xylène cyanol FF	Fluka Chemie GmbH, Buchs (Suisse), N° 95600
45 % (v/v) Glycérol	Fluka Chemie GmbH, Buchs (Suisse), N° 49767
100 mM EDTA	Applichem GmbH, Darmstadt (Allemagne), N° 2937,0500
Marqueur :	
O'Gene Ruler 1 kb (0.1 µg/µl)	Fermentas, St.Leon-Rot (Allemagne), N° #SM1163
Bandes : 10000 – 8000 – 6000 – 5000 – 4000 – 3500 – 3000 – 2500 – 2000 – 1500 – 1000 – 750 – 500 – 250 bp	

Matériel & Appareils

Acquisition d'image :

Focus & Image Acquisition tips Alpha Innotech Corporation, San Leandro (USA)

Logiciel Fluorchem Version 2.00

Balances :

AG204

Mettler Toledo, Greifensee (Suisse)

PG3001-S

Mettler Toledo, Greifensee (Suisse)

Centrifugeuses :

Eppendorf 5415D

Eppendorf, Hamburg (Allemagne)

Sorvall Evolution

Kendro, Newton (USA)

Megafuge 1.0R

Heraeus Instruments GmbH, Hanau (Allemagne)

Cuvette d'électroporation :

Cuvette EPECU 101 50 × 1 mm Thermo Hybaid, Middlesex (Angleterre)

Electroporateur :

Gene Pulser II

Biorad, Reinach (Suisse)

Etuve :

Firlabo

Firlabo, Meyzieu (France)

Incubateur :

Agitateur incubateur HT

Infors AG, Bottlingen (Suisse)

Mélangeur chauffant :

Thermomixer comfort

Eppendorf, Hamburg (Allemagne)

Micro-ondes :

Easytronic M0201

Whirlpool, Lenzbourg (Suisse)

pH-mètre :

pH-mètre MP225

Mettler Toledo, Greifensee (Suisse)

Spectrophotomètre :

NanoDrop ND-1000

Witec AG, Littau (Suisse)

Logiciel NanoDrop 3.1.0

Coleman Technologies Inc., Orlando (USA)

2.1.2. Méthodes

2.1.2.1. Electroporation

- Décongeler les cellules compétentes sur la glace
- Pour chaque échantillon, déposer un tube Eppendorf de 1.5 ml et une cuvette d'électroporation sur glace
- Incuber à 37 °C un tube Falcon® de 14 ml (polystyrène à fond rond) contenant 1 ml de milieu SOC pour chaque échantillon
- Mélanger correctement 1 µl d'ADN (dilué dans de l'eau distillée si nécessaire) avec 50 µl de cellules compétentes et laisser incuber sur glace pendant 1 minute
- Allumer l'électroporateur et régler les paramètres suivants : 1.7 kV et 25 µF
- Transférer le mélange cellules/ADN dans une cuvette refroidie et taper pour que la suspension descende au fond
- Mettre la cuvette dans la chambre d'électroporation et pulser une fois
- Enlever la cuvette et ajouter immédiatement 1 ml de milieu SOC préchauffé à 37 °C
- Rapidement, mais avec précaution, re-suspendre les cellules avec la pipette
- Transférer la suspension de cellules dans le tube Falcon® de 14 ml (polystyrène à fond rond) et incuber 1 h à 37 °C en agitant à ~200 rpm
- Contrôler la valeur du temps d'impulsion qui doit être proche de 5 millisecondes
- Etaler 20 à 100 µl sur plaque contenant un milieu sélectif
 - Une plaque pour le contrôle
 - Deux plaques par échantillon
- Incuber les plaques 24 h à 37 °C

☞ En plus des échantillons étudiés, un contrôle négatif est effectué. Il n'y a pas d'ajout d'ADN pour le contrôle négatif. Un contrôle positif est réalisé avec un plasmide contenant le même gène de résistance que celui utilisé pour la sélection des bactéries transformées avec l'échantillon étudié.

2.1.2.2. Extraction de plasmide - Miniprep

L'extraction de plasmide s'effectue à partir de 2 ml de culture issue d'une colonie isolée.

A partir des plaques NA contenant l'antibiotique utilisé :

- Repiquer une colonie isolée dans un Tube contenant 2 ml de milieu LB
 - Supplémenté de 50 µg/ml de kanamycine pour les bactéries transformées avec un plasmide contenant le gène de résistance à la kanamycine
 - Supplémenté de 100 µg/ml d'ampicilline pour les bactéries transformées avec un plasmide possédant le gène de résistance à l'ampicilline
- Incuber 24 h à 37 °C à ~200 rpm

La préparation d'ADN s'effectue d'après deux modes opératoires selon la pureté requise :

Première méthode : Kit NucleoSpin® Plasmid

- Culture et récolte des bactéries
 - Centrifuger 30 s à 11000 g 2 ml de culture, dans du milieu LB, d'*E.coli*
 - Jeter le surnageant
- Lyse cellulaire
 - Ajouter 250 µl de tampon A1
 - Mettre en suspension le culot de cellules en vortexant
 - Ajouter 250 µl de tampon A2
 - Mélanger en inversant le tube 8 fois – Ne pas vortexer
 - Incuber 5 min à température ambiante
 - Ajouter 300 µl de tampon A3
 - Mélanger en inversant le tube 8 fois – Ne pas vortexer
- Clarification du lysat
 - Centrifuger 8 min à 11000 g à température ambiante
- Liaison de l'ADN à la membrane
 - Placer une colonne NucleoSpin® Plasmide dans un tube collecteur de 2 ml
 - Charger le surnageant de la clarification du lysat
 - Centrifuger 1 min à 11000 g à température ambiante
 - Jeter le filtrat
- Lavage de la membrane
 - Ajouter 600 µl de tampon A4
 - Centrifuger 1 min à 11000 g
 - Jeter le filtrat
- Séchage de la membrane
 - Centrifuger 2 min à 11000 g pour sécher la membrane

- Elution de l'ADN
 - Transférer la colonne dans un tube Eppendorf
 - Ajouter 50 µl de tampon AE
 - Incuber 1 min à température ambiante
 - Centrifuger 1 min à 11000 g

Deuxième méthode :

- Tampons :
 - S1 : 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8.0
 - S2 : 200 mM NaOH, 1 % SDS
 - S3 : 2.8 M KAc, pH 5.1
 - Culture et récolte des bactéries
 - Centrifuger 1 min à 11000 g 1.5 ml de culture, dans du milieu LB, d'*E.coli*
 - Jeter le surnageant
 - Lyse cellulaire
 - Ajouter 120 µl de tampon S1
 - Mettre en suspension le culot de cellules en pipetant
 - Ajouter 120 µl de tampon S2
 - Mélanger en inversant le tube 8 fois – Ne pas vortexer
 - Ajouter 120 µl de tampon S3
 - Mélanger en inversant le tube 8 fois
 - Clarification du lysat
 - Centrifuger 5 min à 11000 g à température ambiante
 - Transférer le surnageant dans un nouvel eppendorf
 - Précipitation de l'ADN
 - Ajouter 1 ml d'éthanol 100 %
 - Centrifuger 10 min à 11000 g
 - Jeter le surnageant
 - Lavage de l'ADN précipité
 - Ajouter 1 ml d'éthanol 70 %
 - Mélanger en vortexant doucement
 - Centrifuger 1 min à 11000 g
 - Jeter le surnageant
 - Laisser sécher à l'air libre minimum 5 min
 - Elution de l'ADN
 - Mettre en suspension dans 20 µl d'eau distillé (Concentration d'ADN totale ~5 µg)
- ☞ La deuxième méthode donne de l'ADN moins pur (présence d'ADN génomique) mais possède l'avantage d'être moins chère.

2.1.2.3. Extraction de plasmide - Maxiprep

L'extraction de plasmide s'effectue à partir de 250 ml de culture issue de 100 µl de culture de miniprep.

A partir de la culture de la miniprep :

- Inoculer 100 µl de culture dans 250 ml de milieu TB
 - Supplémenté de 100 µg/ml d'ampicilline pour les bactéries possédant le gène de résistance à cette antibiotique
- Incuber 24 h à 37 °C à ~ 200 rpm

La préparation d'ADN s'effectue selon le mode opératoire du kit NucleoBond® Plasmid Purification :

- Culture et récolte des bactéries
 - Centrifuger 15 min, à 6000 g, à 4 °C, 250 ml de culture, dans du milieu TB, d'*E.coli*
- Lyse cellulaire
 - Ajouter 12 ml de tampon S1 + RNase A
 - Mettre en suspension le culot de cellules en pipetant
 - Ajouter 12 ml de tampon S2
 - Mélanger en inversant le tube 8 fois – Ne pas vortexer
 - Incuber 2 min à température ambiante
 - Ajouter 12 ml de tampon S3 refroidi à 4 °C
 - Mélanger en inversant le tube 8 fois – Ne pas vortexer
 - Incuber 5 min dans de la glace
- Clarification du lysat
 - Filtrer la suspension avec le filtre fourni
- Equilibrage de la colonne
 - Ajouter 6 ml de tampon N2 dans une colonne NucleoBond® AX 500
 - Laisser filtrer par gravité
 - Jeter le filtrat
- Liaison de l'ADN à la membrane
 - Charger le lysat clarifié sur la colonne équilibrée
 - Laisser filtrer par gravité
 - Jeter le filtrat
- Lavage de la membrane
 - Ajouter 32 ml de tampon N3
 - Laisser filtrer par gravité
 - Jeter le filtrat

- Elution de l'ADN
 - Transférer la colonne sur un tube Falcon de 50 ml
 - Ajouter 15 ml de tampon N5
 - Laisser filtrer par gravité
- Précipitation
 - Ajouter 11 ml d'isopropanol
 - Centrifuger 45 min, à 4 °C, à 11000 g
 - Jeter le surnageant
- Lavage et séchage du culot d'ADN
 - Ajouter 5 ml d'éthanol 70 %
 - Vortexer
 - Centrifuger 10 min, à 11000 g, à température ambiante
 - Jeter le surnageant
 - Laisser sécher le culot 20 min à température ambiante
- Solubilisation de l'ADN
 - Ajouter 200 µl de tampon TE

2.1.2.4. Restriction enzymatique

Les plasmides sont digérés avec une ou deux enzymes de restriction :

0.5–2 µg ADN (5-10 µl de miniprep)	~ 2 µg ADN (10 µl de miniprep)
3-7 µl d.H ₂ O	6 µl d.H ₂ O
2 µl tampon	2 µl tampon
1 µl enzyme	1 µl enzyme 1
	1 µl enzyme 2
<hr/>	<hr/>
20 µl	20 µl

- Le tampon varie en fonction des enzymes utilisées
 - Le tampon recommandé par le fournisseur est utilisé lors de l'utilisation d'une seule enzyme
 - Les tampons suivants sont utilisés lors de l'utilisation de plusieurs enzymes :

Tableau 1 : Tampon de réaction en fonction des combinaisons d'enzymes utilisées

Enzymes de restriction (activité dans le tampon)		Tampon de réaction
<i>NotI</i> (50-75 %)	<i>BamHI</i> (100 %)	B
<i>NarI</i> (100 %)	<i>ClaI</i> (100 %)	A
<i>EcoRI</i> (100 %)	<i>HindIII</i> (100 %)	B
<i>BglII</i> (100 %)	<i>HindIII</i> (100 %)	B
<i>EcoRI</i> (100 %)	<i>NotI</i> (100 %)	H
<i>SalI</i> (100 %)	<i>NotI</i> (100 %)	H

- Incuber 2 h à 37 °C
- Stopper la réaction en ajoutant le volume adéquat de tampon de chargement 6 ×
- Charger les restrictions sur gel d'agarose 1 % pour contrôle

☞ Les contrôles négatifs s'effectuent en remplaçant la ou les enzymes par respectivement 1 ou 2 µl d'eau distillée.

2.1.2.5. Préparation d'un gel d'agarose ^[32]

- Mélanger l'agarose et le tampon
- Porter à ébullition au micro-ondes
- Compenser la perte de poids due à l'évaporation par de l'eau chauffée en même temps que l'agarose
- Refroidir et ajouter 1 µl de bromure d'éthidium
- Couler le gel

☞ Le contrôle des restrictions s'effectue par migration sur gel agarose 1 × TBE. Le tampon 1 × TAE est utilisé si une extraction d'ADN à partir du gel doit être réalisée.

2.1.2.6. Ligation

- Pour refermer le plasmide pENTR-D-TOPO-Prion short
 - 20 µl ADN miniprep
 - 6 µl d.H₂O
 - 3 µl tampon T4 DNA ligase
 - 1 µl T4 DNA ligase
- 30 µl
- Incuber 24 h à 16 °C

- Pour insérer le gène d'intérêt, le vecteur et l'insert sont mis en proportion stœchiométrique
 - Incuber 24 h à 16 °C

2.1.2.7. Extraction d'ADN du gel d'agarose

L'extraction d'ADN s'effectue selon le mode opératoire du kit NucleoSpin® Extract II :

- Excision du fragment d'ADN
 - Couper le fragment d'ADN du gel d'agarose avec une lame de scalpel
 - Déterminer la masse du fragment de gel
- Lyse du gel
 - Placer une colonne NucleoSpin® Extract II dans un tube collecteur de 2 ml
 - Ajouter 200 µl de tampon NT pour chaque 100 mg de gel d'agarose
 - Incuber à 50 °C pendant 10 min en vortexant toutes les 3 minutes
 - S'assurer que le gel soit entièrement dissout avant de continuer
- Liaison de l'ADN sur la membrane
 - Placer une colonne NucleoSpin® Extract II dans un tube collecteur de 2 ml
 - Transférer la solution dans la colonne
 - Centrifuger 1 min à 11000 g
 - Jeter le filtrat
- Lavage de la membrane
 - Ajouter 600 µl de tampon NT3
 - Centrifuger 1 min à 11000 g
 - Jeter le filtrat
- Séchage de la membrane
 - Centrifuger 2 min à 11000 g pour sécher la membrane

- Elution de l'ADN
 - Transférer la colonne dans un tube Eppendorf
 - Ajouter 40 µl de tampon NE
 - Incuber 1 min à température ambiante
 - Centrifuger 1 min à 11000 g

2.1.2.8. Conversion de vecteurs en vecteurs de destination Gateway

La conversion s'effectue selon le mode opératoire du kit Gateway® Vector Conversion System with One Shot® *ccdB* Survival™ Competent Cells ^[33] :

Préparation des vecteurs :

- Restriction des vecteurs

Les plasmides sont digérés avec deux enzymes de restriction en deux étapes dans deux tampons de réaction :

	10 µg plasmide	
	X µl d.H ₂ O	
	1 µl tampon L	
	1 µl <i>Sac</i> II	
	<hr/>	
	10 µl	
	-----	■ Incube 2 h à 37 °C
+	25 µl d.H ₂ O	
	4 µl tampon H	
	1 µl <i>Mlu</i> I	
	<hr/>	
	40 µl	
	-----	■ Incube 2 h à 37 °C
	8 µl tampon de chargement	

- Charger les restrictions sur gel d'agarose 1 %
- Extraire les bandes d'intérêt selon le mode opératoire **Extraction d'ADN du gel d'agarose (point 2.1.2.7)**

■ Conversion des extrémités en bouts francs

La conversion s'effectue selon le mode opératoire du Current Protocols in Molecular Biology (Unit 3.5.11) ^[34] :

10 µl ADN (~ 1 µg)
4 µl Tampon T4 DNA polymerase (5 ×)
5 µl T4 DNA polymerase
1 µl dNTP 100 µg de chaque (20 ×)

20 µl

- Incuber 20 min à 11 °C
- Inactiver 10 min à 75 °C

■ Déphosphorylation

La déphosphorylation s'effectue selon le mode opératoire Alkaline Phosphatase shrimp ^[35] :

20 µl ADN bout franc
1 µl Tampon Déphosphorylation (10 ×)
1 µl Alkaline Phosphatase
8 µl d.H₂O

30 µl

- Incuber 1 h à 37 °C
- Inactiver 15 min à 65 °C

Ligation des vecteurs avec la Gateway[®] reading frame cassette :

	Contrôle négatif
2 µl ADN déphosphorylé (20-50 ng)	2 µl
1 µl Tampon T4 DNA ligase (10 ×)	1 µl
2 µl Gateway [®] reading frame cassette A (10 ng)	-
1 µl T4 DNA ligase	1 µl
4 µl dH ₂ O	6 µl
<hr/>	
10 µl	10 µl

- Incuber 24 h à 16 °C

Transformation des cellules One Shot[®] :

- Diluer 5 fois la réaction de ligation dans de l'eau distillée
- Décongeler les cellules compétentes sur la glace
- Ajouter 1 µl de réaction de ligation dilué pour 50 µl de cellules
 - Pour le contrôle positif ajouter 1 µl de pUC19 pour 50 µl de cellules
- Incuber 30 min dans la glace
- Incuber 30 s à 42 °C dans un bain-marie
- Incuber 2 min dans la glace
- Ajouter 250 µl de milieu SOC à température ambiante
- Incuber 1 h à 37 °C en agitant à ~200 rpm
- Etaler sur plaque contenant un milieu sélectif
 - 100 µl du contrôle positif dilué 10 × dans de l'eau distillée sur une plaque contenant 100 µg/ml d'ampicilline pour le contrôle positif
 - 100 µl du contrôle négatif sur plaque contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 27 µg/ml de chloramphénicol
 - 20 µl et 100 µl de transformation par échantillon sur plaque contenant 100 µg/ml d'ampicilline et 27 µg/ml de chloramphénicol
- Incuber les plaques 24 h à 37 °C

2.1.2.9. Réaction de recombinaison

La recombinaison LR s'effectue selon le mode opératoire fourni avec l'enzyme Gateway[®] LR clonase[™] II enzyme mix ^[36] :

1-3 µl Clone d'entrée pENTR (~ 150 ng)	
2-4 µl Vecteur de destination pDEST (~ 150 ng)	
3-5 µl d.H ₂ O	
<hr/>	
8 µl	

- Mélanger
- Décongeler la LR clonase™ II enzyme mix sur glace, mélanger en vortexant légèrement
- Ajouter 2 µl d'enzyme à chaque échantillon, mélanger en vortexant légèrement
- Incuber 1 h à 25 °C
- Ajouter 1 µl de Proteinase K pour arrêter la réaction, mélanger en vortexant légèrement
- Incuber 10 min à 37 °C
- Stocker les réactions à -20 °C

☞ Les contrôles négatifs s'effectuent en remplaçant l'enzyme par 2 µl d'eau distillée.

Transformer par électroporation des cellules DH10B avec 1 µl de la réaction LR selon le mode opératoire d'électroporation.

2.1.2.10. Préparation et clonage du mir

Préparation des oligos :

- Ajouter de l'eau distillée afin d'obtenir une concentration d'oligos de 100 µM
 - Vortexer
 - Vérifier la concentration en mesurant au NanoDrop
 - Appariement des oligos
 - Mélanger 2 oligos complémentaires :
 - 2 µl oligos A
 - 2 µl oligos B
 - 5 µl tampon de la T4 DNA
 - 41 µl d.H₂O
-
- 50 µl
- Incuber 5 min à 95 °C
 - Laisser refroidir pendant 2 h en éteignant le mélangeur chauffant

Ligation du mir-133b en 2 étapes de ligation :

■ Formation du 4 × mir-133b

■ Préparer le mélange de ligation suivant :

2 µl oligos AB

2 µl oligos CD

2 µl tampon de la T4 DNA

1 µl T4 DNA ligase

13 µl d.H₂O

20 µl

■ Incuber 2 h à température ambiante

■ Charger 10 µl sur gel d'électrophorèse (+ 2 µl de tampon de chargement 6 ×) pour contrôler la ligation

■ Ligation dans le plasmide

■ Préparer le mélange de ligation suivant :

1.5 µl 4 × mir-133b

2 µl plasmide linéarisé (~ 50 ng)

1 µl tampon de la T4 DNA

1 µl T4 DNA ligase

4.5 µl d.H₂O

10 µl

■ Incuber 24 h à 16 °C

■ Transformer des bactéries DH10B par électroporation avec 1 µl de produit de ligation

Ligation du mir-133b en 1 étape de ligation :

■ Préparer le mélange de ligation suivant :

2 µl oligos double brins AB dilué 30 fois

2 µl oligos double brins CD dilué 30 fois

2 µl plasmide linéarisé (~ 50 ng)

1 µl tampon de la T4 DNA

1 µl T4 DNA ligase

2 µl d.H₂O

10 µl

■ Incuber 24 h à 16 °C

■ Transformer des bactéries DH10B par électroporation avec 1 µl de produit de ligation

2.2. Résultats

La première partie de ce travail est consacrée à la construction des vecteurs de type pAAV avec trois promoteurs neurospécifiques. Le gène FPmax est ensuite cloné dans chacun de ces vecteurs. Le gène synucléine muté et non muté est cloné, uniquement dans le vecteur contenant le promoteur synapsine.

2.2.1. Stratégie de clonage

2.2.1.1. Clonage des promoteurs neurospécifiques et des gènes d'intérêt

Le but de ce travail est de développer des vecteurs viraux permettant une expression spécifique du transgène dans les neurones.

Tout d'abord, les séquences des différents promoteurs fournis par le laboratoire contenus dans les vecteurs de type pENTR-D-TOPO sont contrôlées par alignement avec les séquences théoriques à l'aide du programme informatique BLAST (bl2seq, National Center for Biotechnology Information). Le vecteur pENTR-D-TOPO-synapsin est aligné avec la séquence du promoteur Human synapsin I ([M55301](#)) et pENTR-D-TOPO-NSE avec la séquence du promoteur Rat Neuron Specific Enolase ([AB038993](#)).

Le promoteur prion contenu dans le vecteur pENTR-D-TOPO-Prion contient une séquence qui ne correspond pas à la séquence du promoteur prion. Un alignement entre la séquence du vecteur et la séquence du promoteur prion PRNP ([AJ289875](#)) permet de localiser 204 pb en commun correspondant au promoteur^[37]. Une restriction avec l'enzyme *NarI* et *ClaI* permet de supprimer 343 pb sur les 492 pb indésirables.

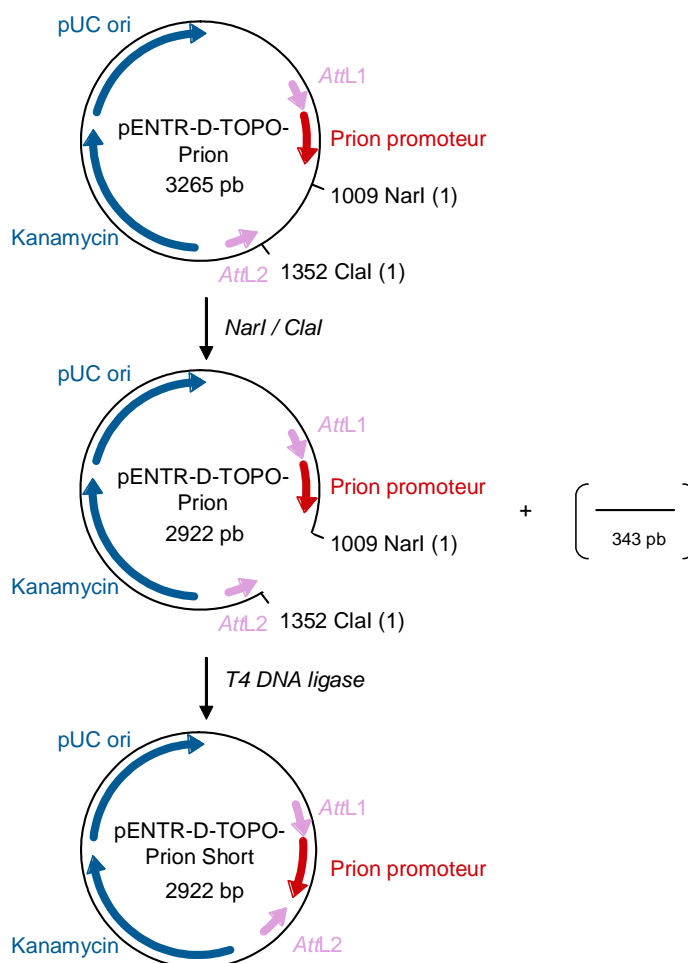


Figure 12 : Formation du vecteur pENTR-D-TOPO-Prion Short

Le système Gateway[®] d'Invitrogen est utilisé pour le clonage des différents promoteurs dans le vecteur pAAV-CMV-MCS.

Le vecteur pAAV-CMV-MCS est converti en vecteur de destination Gateway[®]. Pour ce faire, le promoteur CMV est enlevé du vecteur par restriction avec les enzymes *MluI* et *SacII* (Fig. 13, ①).

Les extrémités sont ensuite converties en bouts francs à l'aide de l'activité exonucléasique 3' → 5' et l'activité polymérase 5' → 3' de l'ADN polymérase T4 (Fig. 13, ②). Pour garantir une bonne ligation de la cassette A (i.e pour éviter que le vecteur ne se referme sans l'insert), les extrémités sont déphosphorylées avec l'alkaline phosphatase shrimp (Fig. 13, ③).

La cassette A, contenant les gènes *Cm^R* et *ccdB* codant pour respectivement le gène de résistance au chloramphénicol et celui de la protéine *ccdB*, est insérée par ligation dans le vecteur avec la T4 DNA ligase (Fig. 13, ④). La construction donne le vecteur pDEST-A-AAV-MCS.

La transformation de cellules DH10B, par électroporation avec le plasmide pDEST-A-AAV-MCS, et la sélection dans un milieu contenant du chloramphénicol, permettent de sélectionner les bactéries

possédant le plasmide contenant la cassette A. Le plasmide est vérifié par restriction avec l'enzyme *NotI* pour contrôler la présence et l'orientation de la cassette A.

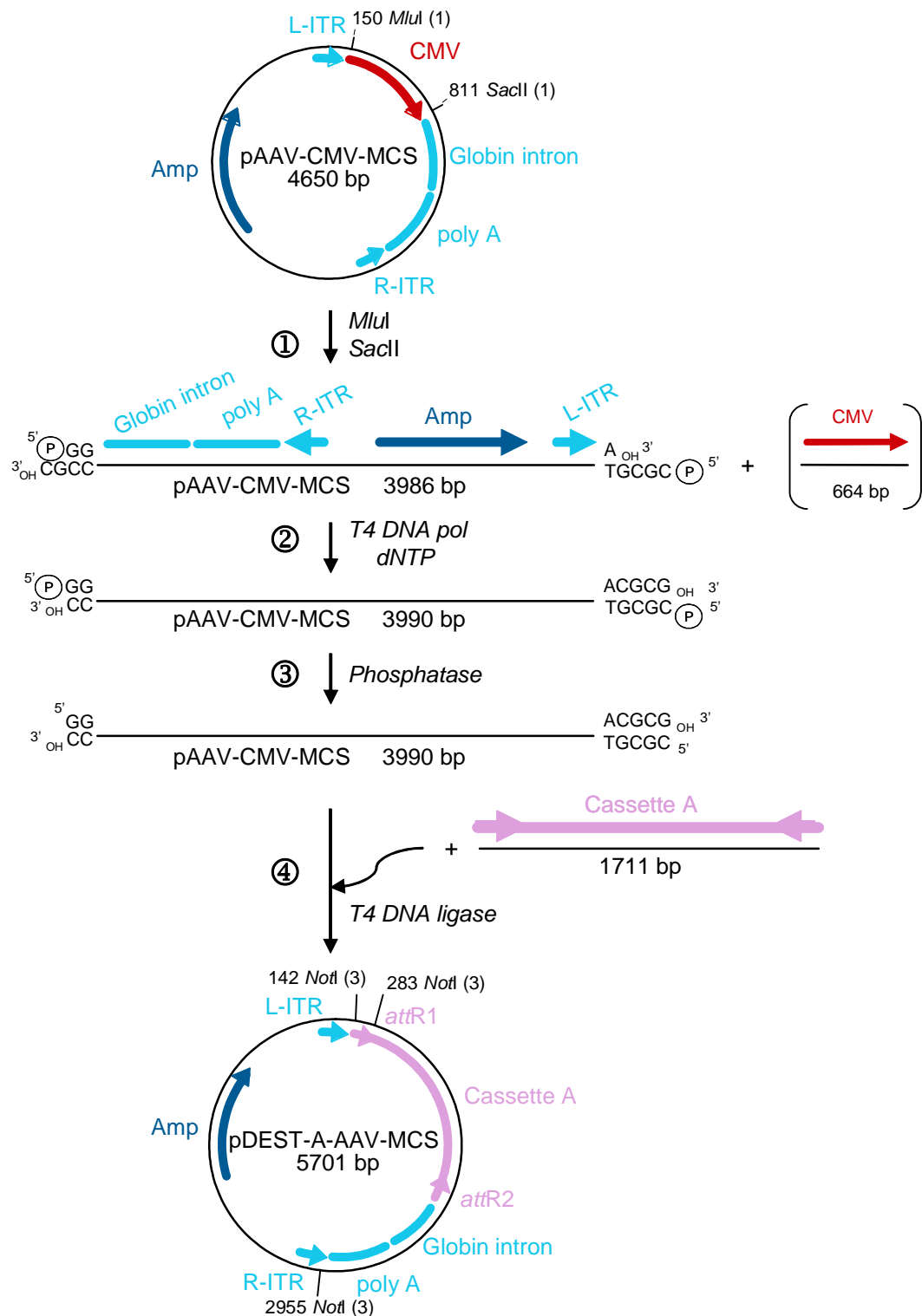


Figure 13 : Conversion du vecteur pAAV-CMV-MCS en vecteur de destination Gateway®

Une recombinaison est ensuite réalisée, avec la LR clonase II enzyme mix, entre le vecteur de destination et les différents vecteurs d'entrée contenant les promoteurs désirés. Cette recombinaison intermoléculaire entre les sites d'attachement (*attR* × *attL*) provoque l'échange de la cassette A du vecteur de destination avec le promoteur contenu dans le vecteur d'entrée. Le nouveau vecteur formé de type pEXP-AAV-MCS contient le promoteur neurospécifique désiré (Fig. 14, ⑤).

Le gène FPmax est extrait du vecteur pAAV-CMV-FPmax par restriction avec les enzymes *EcoRI* et *HindIII*. Il est ensuite inséré par ligation au niveau du MCS des vecteurs de type pEXP-AAV-MCS (contenant le promoteur neurospécifique) préalablement linéarisés par restriction avec les mêmes enzymes (Fig. 14, ⑥ et ⑦).

Le gène synucléine A30P est extrait du vecteur pAAV-PGK-asynWT par restriction avec les enzymes *HindIII* et *BglII* puis inséré dans le vecteur de type pEXP-AAV-Synapsin-MCS linéarisé avec les mêmes enzymes (Fig. 14, ⑥ et ⑦). Ce gène est inséré uniquement dans le vecteur possédant le promoteur synapsine.

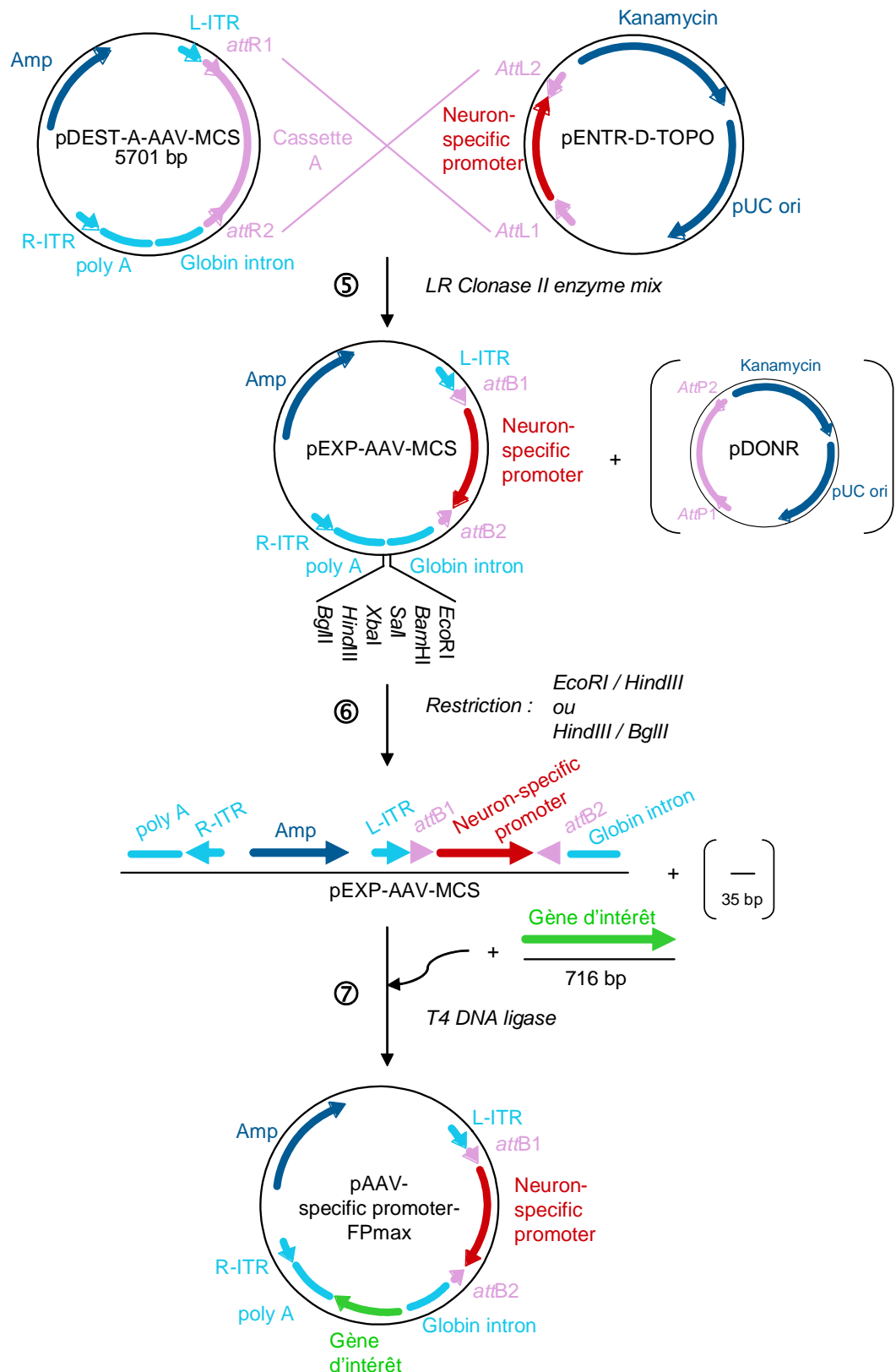


Figure 14 : Stratégie de recombinaison pour intégrer le promoteur neurospécifique au vecteur et clonage du gène d'intérêt au niveau du MCS

2.2.1.2. Clonage du mir-133b

Le clonage du mir-133b s'effectue en plusieurs étapes :

- * « Design » des oligos permettant la construction du 4 × mir-133b
- * Appariement des oligos
- * Clonage du mir-133b dans le plasmide pAAV-CMV-FPmax

La première étape consiste à décrire 4 oligos qui forment le 4 × mir133-b double brin. Le mir formé possède des extrémités à bouts collants compatibles avec les enzymes *HindIII* et *BglII*. De plus, deux sites de restriction sont ajoutés soit, celui de l'enzyme *AgeI* entre les 4 copies du mir et celui de *Sall* après le site *HindIII*. Cette construction est faite selon la construction du 4 × mir142 ^[38].

- * mir-133b oligo 1

5' AGC TTG TCG ACT AGC TGG TTG AAG GGG ACC AAA CGA T TA GCT GGT TGA AGG
GGA CCA AAA CCG GT 3'

- * mir-133b oligo 2

5' TAG CTG GTT GAA GGG GAC CAA ATC ACT AGC TGG TTG AAG GGG ACC AAA A 3'

- * mir-133b oligo 3

5' GAT CTT TTG GTC CCC TTC AAC CAG CTA GTG ATT TGG TCC CCT TCA ACC AGC
TA A CCG GT 3'

- * mir-133b oligo 4

5' TTT GGT CCC CTT CAA CCA GCT AAT CGT TTG GTC CCC TTC AAC CAG CTA GTC
GAC A 3'

La deuxième étape conduit à appairer les brins complémentaires pour créer deux fragments d'ADN double brin. Ces deux fragments peuvent être ligués pour former un seul fragment double brin correspondant au 4 × mir-133b.

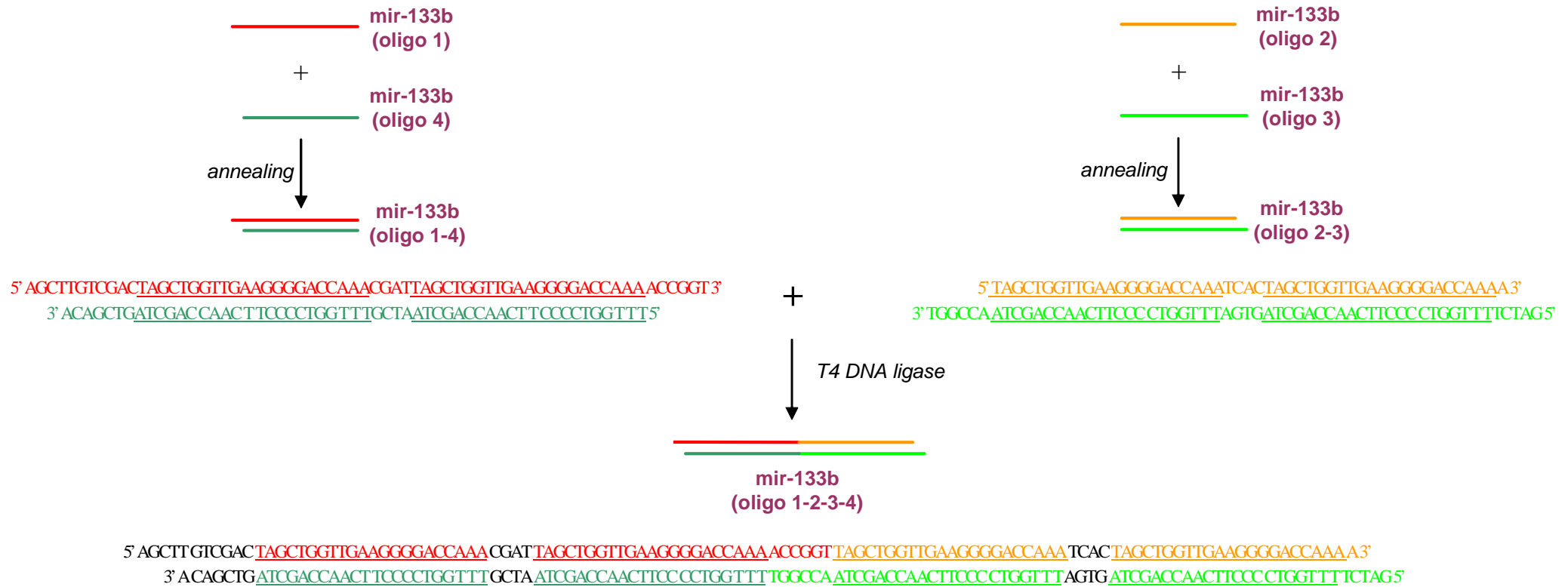


Figure 15 : Construction du 4 × mir-133

Le but de la dernière étape est d'insérer le mir à la suite du gène FPmax du plasmide pAAV-CMV-FPmax. Pour ce faire, le plasmide est digéré avec les enzymes de restriction *Hind*III et *Bgl*II. Les extrémités ainsi formées sont compatibles avec celles du mir synthétisé. Pour insérer le mir, 2 ligations différentes sont réalisées. Une ligation s'effectue à partir du 4 × mir-133b et l'autre à partir des deux fragments formant le mir final.

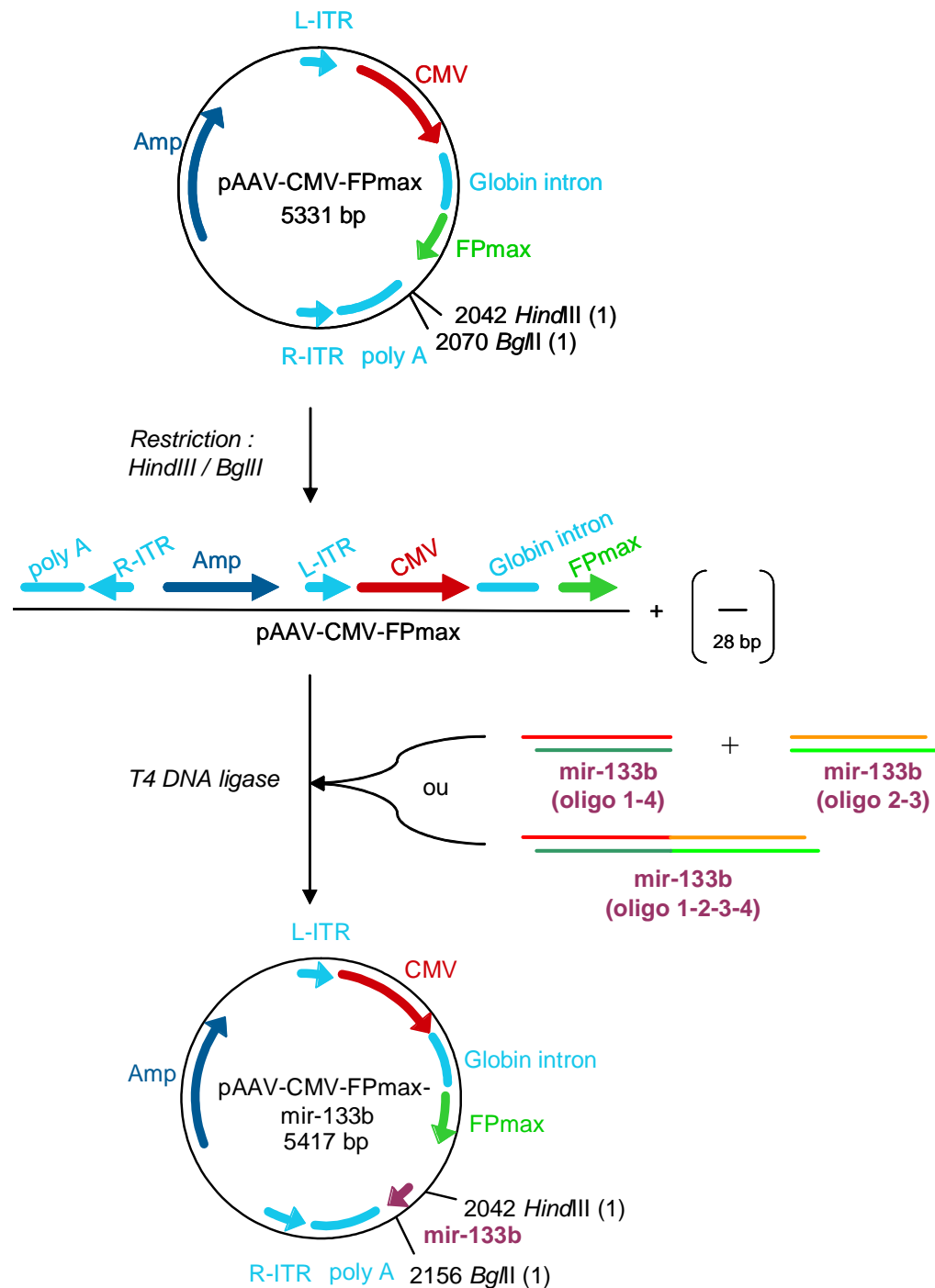


Figure 16 : Stratégie de clonage du 4 × mir-133b dans le plasmide pAAV-CMV-FPmax

2.2.2. Amplification des plasmides de départ

L'amplification sert à créer un stock des plasmides utilisés pour la suite du projet. Le plasmide pENTR/D-TOPO-Synapsin et le plasmide pAAV-CMV-MCS sont amplifiés. L'amplification se déroule en plusieurs étapes :

- ✖ Transformation par électroporation de bactéries électrocompétentes
- ✖ Sélection de clone et mise en culture
- ✖ Extraction de l'ADN plasmidique
- ✖ Vérification de l'ADN extrait par restriction et migration sur gel d'électrophorèse

Les plasmides pENTR/D-TOPO-Prion, pENTR/D-TOPO-NSE, pAAV-CMV-FPmax, pAAV-PGK-asynWT et pAAV-PGK-A30P ne sont pas amplifiés car le laboratoire possède déjà un stock suffisant.

2.2.2.1. Transformation

La transformation a pour but d'intégrer un plasmide aux cellules *E.coli* DH10B. Les plasmides pENTR/D-TOPO-Synapsin et pAAV-CMV-MCS possèdent respectivement le gène accédant à une résistance à la kanamycine et à l'ampicilline, ce qui permet la sélection des cellules transformées. Les bactéries électrocompétentes sont transformées par électroporation.

Tableau 2 : Paramètres d'électroporation et nombre de colonies obtenues sur plaque NA pour chaque électroporation testée

Nom du tube	Paramètres d'électroporation			Antibiotique	Volume étalé sur plaque [μl]	Nombre de colonies [-]
	Voltage [kV]	Capacité [μF]	Temps [ms]			
Contrôle	1.70	25	4.72	Kanamycine	100	0
pENTR/D-TOPO-Synapsin	1.70	25	4.82	Kanamycine	100	> 300
				Kanamycine	100	> 300
Contrôle	1.70	25	4.70	Ampicilline	100	0
pAAV –CMV-MCS	1.70	25	4.74	Ampicilline	100	> 300
				Ampicilline	20	> 300

Lors de l'électroporation, les temps d'impulsion ont été mesurés afin de vérifier le bon déroulement de la transformation. En effet, le temps d'impulsion doit être proche de 5 ms, condition idéale pour le transfert de l'ADN et la survie des cellules. Chaque essai possède un temps d'impulsion proche de 5 ms. Ainsi, les électroporations se sont normalement effectuées dans les conditions requises.

Le contrôle négatif ne permet pas le développement de colonies sur les plaques contenant de l'ampicilline ou de la kanamycine car les bactéries *E.coli* DH10B ne sont naturellement pas résistantes à ces antibiotiques.

Deux colonies isolées sont utilisées pour réaliser une culture pour l'extraction de plasmide. Ainsi, deux clones, notés 1 et 2, sont utilisés pour l'extraction de plasmide. La culture s'effectue dans du milieu LB enrichi d'un antibiotique dépendant de la résistance du plasmide.

2.2.2.2. Concentration en ADN des minipreps

L'ADN plasmidique est extrait à partir des minicatures à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid. Les concentrations sont ensuite mesurées à l'aide d'un NanoDrop et présentées dans le tableau suivant.

Tableau 3 : Mesures de l'absorbance pour la détermination de la concentration en ADN des minipreps

Plasmide	Absorbance 260 nm [-]	Absorbance $\frac{260}{230}$ [-]	Absorbance $\frac{260}{280}$ [-]	Concentration [ng/μl]
pENTR/D- TOPO-Synapsin 1	2.820	1.55	1.88	141.01
pENTR/D- TOPO-Synapsin 2	2.955	1.64	1.91	147.74
pAAV –CMV- MCS 1	4.222	2.41	1.91	211.08
pAAV –CMV- MCS 2	2.300	2.44	1.88	115.00

Lors de la mesure de la concentration en ADN, deux rapports d'absorbance sont calculés pour déterminer la pureté de l'ADN. Le rapport d'absorbance 260 nm / 280 nm doit être compris entre 1.8 et 1.9 pour s'assurer d'une bonne pureté. Aucun rapport n'est inférieur à cette fourchette. Ainsi, l'ADN extrait n'est pas contaminé par des protéines car le rapport est supérieur à 1.8, ni par de l'ARN car le rapport est inférieur ou proche de 1.9.

Le rapport 260 nm / 230 nm permet également de définir la pureté de l'échantillon. Le rapport doit être compris entre 1.8 et 2.2 ^[39]. Ce rapport est inférieur pour les plasmides pENTR/D-TOPO-Synapsin 1 et 2 et légèrement supérieur pour les pAAV-CMV-MCS 1 et 2.

2.2.2.3. Restriction des plasmides des minipreps

L'ADN plasmidique extrait est vérifié par restriction enzymatique. Ce contrôle permet de s'assurer que l'ADN extrait à partir des colonies est bien celui recherché en comparant les tailles des fragments obtenus avec la taille théorique due à la restriction.

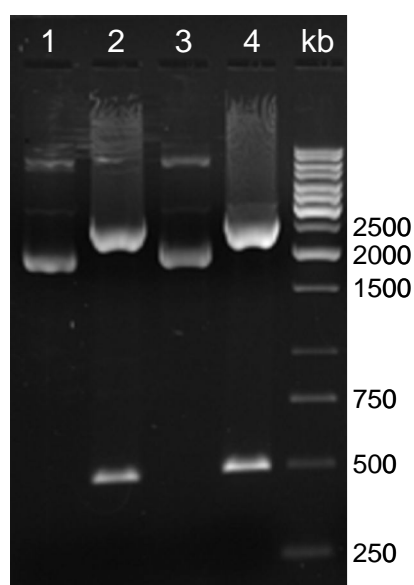


Figure 17 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % des restrictions des 2 clones du plasmide pENTR/D-TOPO-Synapsin

1 : pENTR/D-TOPO-Synapsin, clone 1, non digéré ; **2** : pENTR/D-TOPO-Synapsin, clone 1, digéré par NotI et BamHI ; **3** : pENTR/D-TOPO-Synapsin, clone 2, non digéré ; **4** : pENTR/D-TOPO-Synapsin, clone 2, digéré par NotI et BamHI
kb : Marqueur 1 kb en pb

Les deux clones présentent les mêmes modèles de bandes. Trois bandes sont détectées pour les plasmides qui n'ont pas été digérés correspondant aux différentes formes d'enroulement de l'ADN (ccc, oc et linéaire), (Figure 17, piste 1 et 3). La migration de l'ADN non digéré permet de contrôler la qualité de l'ADN et le fonctionnement de la restriction. Deux bandes sont visibles pour les restrictions avec les enzymes *NotI* et *BamHI* (Figure 17, piste 2 et 4) d'une taille de 2300 et 480 pb (taille déterminée à l'aide de la relation linéaire entre le logarithme de la taille des bandes du marqueur en fonction de la distance de migration des bandes) correspondant aux fragments désirés (en théorie : 2571 et 490 pb).

Le contrôle du plasmide pAAV-CMV-MCS s'effectue par restriction avec l'enzyme *PstI*.

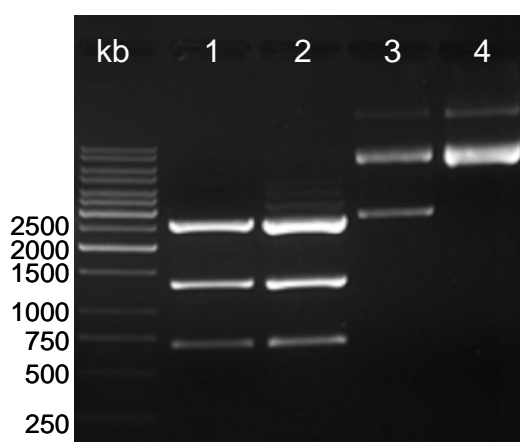


Figure 18 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % des restrictions des 2 clones du plasmide pAAV-CMV-MCS

1 : clone 2 digéré par *PstI* ; **2** : clone 1 digéré par *PstI* ; **3** : clone 2 non digéré ; **4** : clone 1 non digéré

kb : Marqueur 1 kb en pb

Les deux clones digérés présentent les mêmes profils de bandes. Trois bandes sont détectées pour le plasmide du clone 2 non digéré correspondant aux différentes formes d'enroulement de l'ADN (ccc, oc et linéaire). Par contre, seules deux formes d'enroulement sont visibles pour le clone 1 non digéré. (Figure 18, piste 3 et 4) Trois bandes sont visibles lors de la restriction avec l'enzyme *PstI* des deux clones d'une taille de 2670, 1420 et 680 pb (taille déterminée à l'aide du marqueur) correspondant aux fragments désirés (en théorie : 2605, 1353 et 692 pb).

Le clone 2 est choisi pour la préparation d'une maxiculture pour l'amplification du plasmide.

2.2.2.4. Concentration en ADN de la maxiprep

La concentration en ADN obtenu après extraction de l'ADN plasmidique à partir de la maxiculture est déterminée par mesure de l'absorbance à l'aide du NanoDrop.

Tableau 4 : Mesures de l'absorbance pour la détermination de la concentration en ADN de la maxiprep

Plasmide	Absorbance 260 nm [-]	Absorbance $\frac{260}{230}$ [-]	Absorbance $\frac{260}{280}$ [-]	Concentration [ng/μl]
pAAV-CMV- MCS	55.423	2.25	1.87	2771.1

Les deux rapports d'absorbance se situent dans la bonne fourchette. L'ADN obtenu est exempt de contamination.

2.2.3. Modification du plasmide pENTR/D-TOPO-Prion

La modification du plasmide pENTR/D-TOPO-Prion se produit en deux étapes :

- ✱ Suppression de la séquence non désirée
- ✱ Amplification du plasmide modifié

2.2.3.1. Suppression de la séquence non désirée

Pour modifier le plasmide pENTR/D-TOPO-Prion, une restriction avec les enzymes *NarI* et *ClaI* est réalisée, afin de supprimer 343 pb de la séquence d'intérêt.

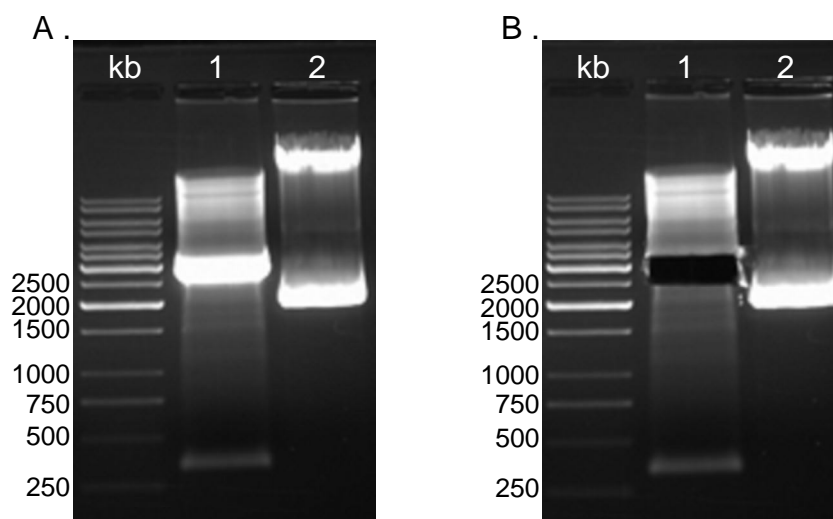


Figure 19 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % du plasmide pENTR/D-TOPO-Prion après restriction avec *PstI*

A. Gel avant l'isolation du fragment

1 : pENTR/D-TOPO-Prion digéré ; **2 :** pENTR/D-TOPO-Prion non digéré

B. Gel après l'isolation du fragment

1 : pENTR/D-TOPO-Prion digéré ; **2 :** pENTR/D-TOPO-Prion non digéré

kb : Marqueur 1 kb en pb

La comparaison entre le plasmide non digéré et celui digéré permet de confirmer une bonne restriction. Le plasmide digéré avec l'enzyme *PstI* (Figure 19 A) montre la présence de deux bandes de tailles 2990 et 340 pb (taille déterminée à l'aide du marqueur) correspondant aux tailles désirées (en théorie : 2922, 343 pb). Les bandes sont diffuses et présentent des traînées à cause de la grande quantité d'ADN chargée sur le gel (5 µg).

La figure 19 B permet d'observer que la totalité du gel contenant l'ADN désiré a bien été extraite. L'ADN extrait à partir du gel est sous forme linéaire. Comme les deux enzymes utilisées possèdent des bouts compatibles, une simple ligation permet de refermer le plasmide qui porte désormais le nom : pENTR/D-TOPO-Prion Short.

2.2.3.2. Amplification de pENTR/D-TOPO-Prion Short

La transformation induit l'intégration du plasmide aux cellules *E.coli* DH10B. Le plasmide possède le gène de résistance à la kanamycine responsable de la sélection des cellules transformées. Les bactéries électrocompétentes sont transformées par électroporation.

Tableau 5 : Paramètres d'électroporation et nombre de colonies obtenues sur plaque NA contenant de la kanamycine pour chaque électroporation testée

Nom du tube	Paramètres d'électroporation			Volume étalé sur plaque [μl]	Nombre de colonies [-]
	Voltage [kV]	Capacité [μF]	Temps [ms]		
Contrôle	1.70	25	4.50	100	0
pENTR/D-TOPO-Prion Short (Linéaire)	1.70	25	4.38	100	2
pENTR/D-TOPO-Prion Short (Ligation)	1.70	25	4.04	100	> 300
				20	145

Lors de l'électroporation, les temps d'impulsion ont été mesurés afin de vérifier le bon déroulement de la transformation. En effet, le temps d'impulsion doit être proche de 5 ms, condition idéale pour le transfert de l'ADN et la survie des cellules. Chaque essai possède un temps d'impulsion proche de 5 ms. Ainsi, les électroporations se sont normalement effectuées dans les conditions requises.

Le contrôle négatif ne permet pas le développement de colonies sur les plaques contenant de la kanamycine car les bactéries *E.coli* DH10B ne sont naturellement pas résistantes à cet antibiotique.

Le contrôle de la transformation avec le vecteur sous forme linéaire présente 2 colonies. La ligation effectuée ici est intramoléculaire, ainsi, il se peut que cette réaction se soit réalisée naturellement, expliquant la présence de ces colonies. Cette faible proportion de colonies sous cette condition montre que l'ADN extrait du gel est bien sous forme linéaire et que cette ligation naturelle est peu courante.

La grande quantité de colonies obtenues après la ligation montre une très bonne efficacité de la réaction. De ce fait, seules 2 colonies isolées sont testées par la suite.

L'extraction de l'ADN des minicultures s'effectue avec la deuxième méthode (point 2.1.2.2). La concentration en ADN est mesurée à l'aide du NanoDrop.

Tableau 6 : Mesures de l'absorbance pour la détermination de la concentration en ADN des minipreps

Plasmide	Absorbance 260 nm [-]	Absorbance $\frac{260}{230}$ [-]	Absorbance $\frac{260}{280}$ [-]	Concentration [ng/μl]
pENTR/D- TOPO-Prion Short 1	87.594	2.14	1.93	4379.7
pENTR/D- TOPO-Prion Short 2	89.219	2.14	1.93	4460.9

Les deux rapports d'absorbance se situent dans la bonne fourchette. L'ADN obtenu est exempt de contamination de type protéique. Cependant la concentration en ADN obtenu n'est pas possible pour une miniprep. L'extraction effectuée n'utilise pas de colonne de purification. L'échantillon est certainement contaminé par de l'ADN génomique.

Le contrôle de l'ADN extrait s'effectue par restriction avec l'enzyme *XhoI*.

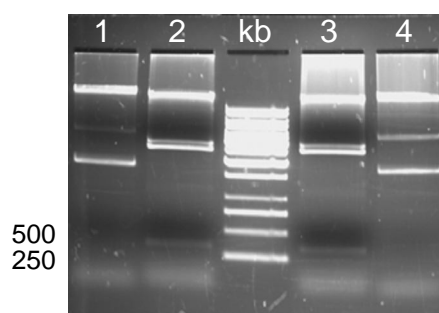


Figure 20 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % des restrictions des 2 clones du plasmide *pENTR/D-TOPO-Prion Short* avec *PstI*

1 : clone 1 non digéré ; **2** : clone 1 digéré ; **3** : clone 2 digéré ; **4** : clone 2 non digéré
kb : Marqueur 1 kb en pb

Tous les échantillons présentent une bande à haut poids moléculaire. Cette bande confirme la présence d'ADN génomique.

Les échantillons digérés avec l'enzyme présentent trois autres bandes de tailles 2920, 2700 et 340 pb (taille déterminée à l'aide du marqueur). Les deux bandes inférieures correspondent aux fragments désirés (en théorie : 2585 et 337 pb). La bande supérieure correspond au plasmide linéaire (en théorie : 2922 pb). Cette bande montre que la restriction était partielle.

Afin d'obtenir une quantité suffisante pour la suite des expériences, une amplification en maxipreps est réalisée à partir du clone 1.

La concentration en ADN est déterminée par mesure de l'absorbance à l'aide du NanoDrop.

Tableau 7 : Mesures de l'absorbance pour la détermination de la concentration en ADN de la maxiprep

Plasmide	Absorbance 260 nm [-]	Absorbance $\frac{260}{230}$ [-]	Absorbance $\frac{260}{280}$ [-]	Concentration [ng/μl]
pAAV-CMV-MCS	55.423	2.25	1.87	2771.1

L'échantillon d'ADN est propre comme le montre les rapports d'absorbances.

Le plasmide obtenu est contrôlé par restriction avec une autre enzyme que celle utilisée pour le contrôle de la miniprep afin d'éviter une restriction partielle.

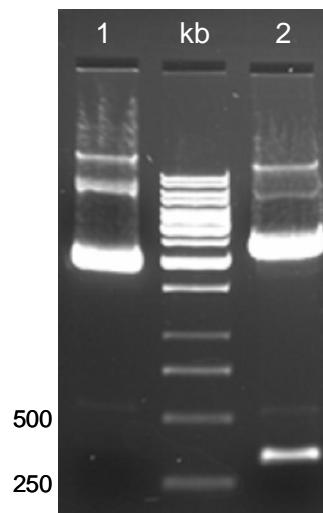


Figure 21 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % de la restriction avec XhoI du plasmide pENTR/D-TOPO-Prion-Short

1 : plasmide non digéré ; **2** : plasmide digéré

kb : Marqueur 1 kb en pb

Le plasmide digéré présente 5 bandes. Les bandes supérieures et celle d'environ 510 pb sont également présentes dans le plasmide non digéré.

Les deux bandes d'intérêt ont une taille de 330 et 2510 pb (taille déterminée à l'aide du marqueur) qui correspond aux tailles désirées (en théorie : 2585 et 337 pb).

Le plasmide extrait est celui recherché. Il est utilisé pour la suite des manipulations.

2.2.4. Conversion des vecteurs pAAV en vecteurs de destination Gateway®

Les trois vecteurs de type pAAV : pAAV-CMV-MCS, pAAV-CMV-MCS-Short et pAAV-CMV-Short-Park9 sont convertis en vecteur de destination Gateway® à l'aide du kit d'Invitrogen.

La conversion s'effectue en 3 étapes :

- × Suppression du promoteur CMV par restriction
- × Création de bouts francs et déphosphorylation
- × Ligation de la cassette A à la place du CMV
- × Transformation des cellules avec les ligations
- × Amplification des vecteurs obtenus

2.2.4.1. Suppression du promoteur CMV

Le promoteur CMV est retiré des plasmides par restriction avec les enzymes *SacII* et *MluI*.

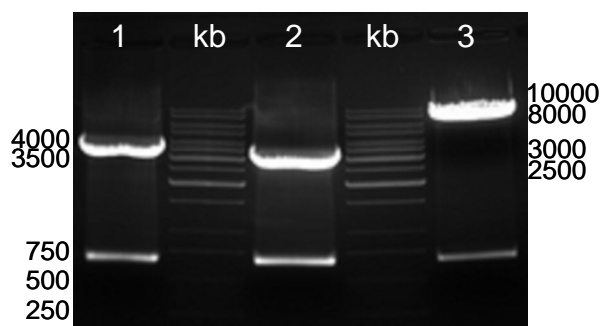


Figure 22 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % de la restriction des plasmides de type pAAV avec *SacII* et *MluI*

1 : plasmide pAAV-CMV-MCS ; **2** : plasmide pAAV-CMV-MCS-Short ; **3** : plasmide pAAV-CMV-Short-Park9

kb : Marqueur 1 kb en pb

Chaque restriction donne deux bandes. La bande inférieure est de la même taille pour les trois plasmides. Cette bande est de 670 pb (taille déterminée à l'aide du marqueur) et correspond à la taille désirée (en théorie : 664 pb) équivalent au promoteur CMV.

Les bandes supérieures pour les plasmides pAAV-CMV-MCS, pAAV-CMV-Short et pAAV-CMV-Short-Park9 ont une taille de respectivement 4200, 3340 et 7460 pb pour respectivement en théorie 3986, 3423 et 6960 pb. La différence s'explique par la diffusion des bandes et le manque de précision de l'échelle aux poids moléculaires élevés.

La photo de l'isolement du fragment par excision du gel n'a pas été prise. L'ADN est extrait du gel à l'aide du kit NucleoSpin[®] Extract II. Les extrémités obtenues sont converties en bouts francs avec la T4 DNA polymérase. Les extrémités sont ensuite déphosphorylées avec une alcaline phosphatase. L'ADN obtenu est utilisé pour la ligation de la cassette A.

2.2.4.2. Ligation cassette A

La cassette A est un fragment d'ADN de 1711 pb qui contient le gène *Cm^R* de résistance au chloramphénicol et le gène *ccdB* codant pour la protéine *ccdB*.

L'insertion de la cassette dans les différents vecteurs se fait par ligation entre des extrémités à bouts francs.

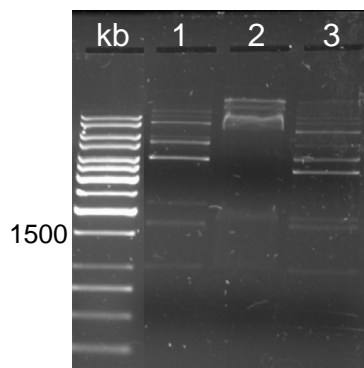


Figure 23 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % de la ligation des plasmides de type pAAV avec la cassette A

1 : plasmide pAAV-MCS+A ; *2* : plasmide pAAV-MCS-Short+A ; *3* : plasmide pAAV-Short-Park9+A
kb : Marqueur 1 kb en pb

Les ligations 1 et 2 montrent plusieurs bandes de tailles variables. La ligation a fonctionné correctement. Par contre, la ligation du vecteur pAAV-Short-Park9 montre moins de bandes.

2.2.4.3. Transformation

La transformation a pour but d'intégrer un plasmide aux cellules One Shot[®] *ccdB* Survival[™] Phage-Resistant. Les plasmides possèdent les gènes accédant à une résistance à l'ampicilline et au chloramphénicol. Les bactéries compétentes sont transformées par heat-shock.

Tableau 8 : Nombre de colonies obtenues sur plaque NA pour chaque transformation testée

Nom du tube	Agent de sélection	Volume étalé sur plaque [μl]	Nombre de colonies [-]
Contrôle négatif (pAAV-MCS + A lin)	Ampicilline et Chloramphénicol	100	0
Contrôle positif pUC19	Ampicilline	100	> 300
		100 (dilué 10 ×)	68
pAAV-MCS + A	Ampicilline et Chloramphénicol	20	0
		100	1
		Concentré	47
pAAV-Short + A	Ampicilline et Chloramphénicol	20	0
		100	5
		Concentré	79
pAAV-Park9 + A	Ampicilline et Chloramphénicol	20	0
		100	1
		Concentré	0

Le contrôle positif sert à contrôler l'efficacité de la transformation par choc thermique. Le nombre important de colonies obtenues montre le bon déroulement des transformations. Un contrôle négatif, uniquement avec de l'eau, n'a pas été réalisé, pour limiter le nombre de bactéries compétentes utilisées. Seul un contrôle négatif est effectué avec l'un des plasmides déphosphorylés (avant la ligation). Aucune colonie n'est détectée, ce qui montre la sensibilité des bactéries compétentes pour les antibiotiques usités. La transformation avec le plasmide pAAV-Short-Park9 se traduit par une seule colonie. Pour les transformations avec les plasmides pAAV-MCS + A et pAAV-Short + A, la plaque concentrée possède plus de colonies que les plaques étalées avec un volume plus faible. Dix colonies pour pAAV-MCS + A et pAAV-Short + A sont sélectionnées afin d'être testées. La seule colonie obtenue avec pAAV-Short-Park9 + A est également contrôlée. Les différents clones sont nommés selon la nomenclature du système Gateway®. Ils portent désormais les noms : pDEST-A-AAV-MCS, pDEST-A-AAV-Short et pDEST-A-AAV-Short-Park9.

2.2.4.4. Restrictions des clones pDEST

Les différents clones sont tous testés par restriction avec les enzymes *MluI* et *NotI*.

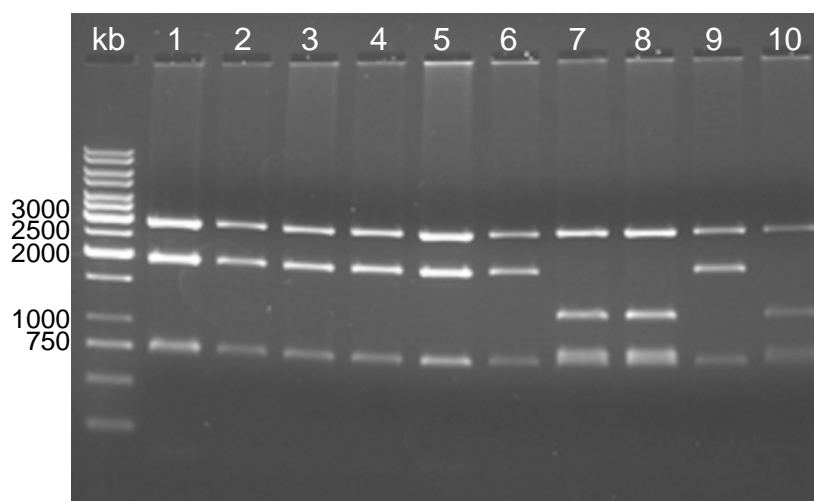


Figure 24 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % des restrictions par *MluI* et *NotI* des ADN plasmidiques extraits des colonies transformées par heat shock avec le plasmide pDEST-A-AAV-MCS, présentes sur des plaques contenant de l'ampicilline et du chloramphénicol

1-10 : ADN plasmidique de différents clones

kb : Marqueur 1 kb en pb

Les clones 7, 8 et 10 présentent quatre bandes de tailles calculées de 2800, 1070, 680 et 610 pb (taille déterminée à l'aide du marqueur). Cette configuration peut se retrouver en présence de la cassette à l'envers (en théorie : 2887, 1225, 821 et 767 pb). La différence des tailles s'explique par la migration incurvée du gel. Les autres clones montrent 4 bandes de tailles 2810, 1890, 720 et 170 pb (taille déterminée à l'aide du marqueur) correspondant aux tailles théoriques de 2887, 1905, 767 et 141 pb.

Ainsi, sept clones correspondent à ce qui est souhaité. Le clone 1 est utilisé pour la suite des expériences.

Un clone pDEST-A-AAV-Short mis en culture en présence d'ampicilline et de chloramphénicol n'a pas poussé. Ce clone ne peut donc pas être testé.

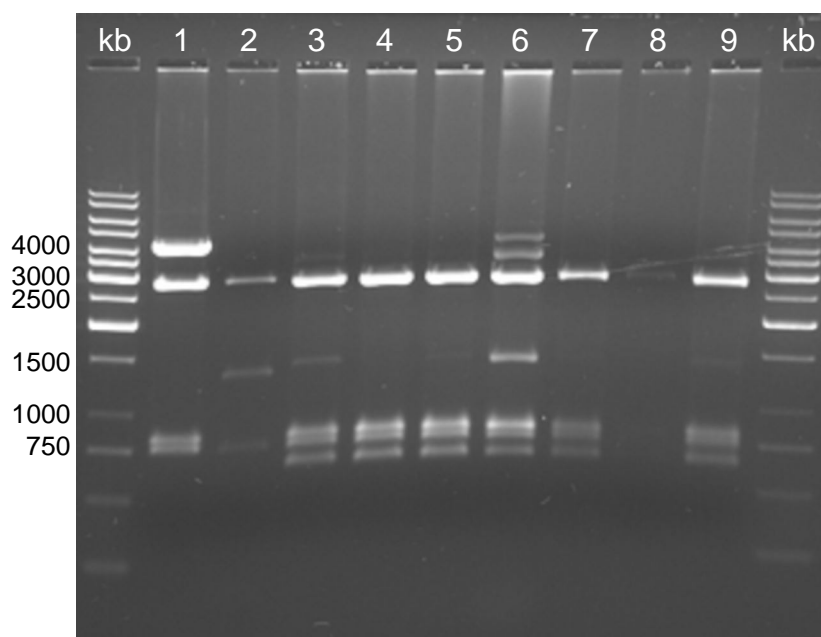


Figure 25 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % des restrictions par MluI et NotI des ADN plasmidiques extraits des colonies transformées par heat shock, présentes sur des plaques contenant de l'ampicilline et du chloramphénicol

1 : ADN plasmidique d'un clone transformé avec le plasmide pDEST-A-AAV-Short-Park9

2-9 : ADN plasmidique de différents clones transformés avec le plasmide pDEST-A-AAV-Short

kb : Marqueur 1 kb en pb

Le clone pDEST-A-AAV-Short-Park9 possède 4 bandes de tailles 4270, 3010, 850 et 780 pb (taille déterminée à l'aide du marqueur) correspondant aux tailles de la cassette à l'envers (4195, 2887, 821 et 767 pb). Les tailles des bandes désirées sont de 4875, 2887, 767 et 141 pb en théorie.

Les clones 3 et 7 possèdent 4 bandes de tailles calculées 3010, 810, 750 et 650 pb correspondant à la cassette à l'envers soit en théorie : 2887, 821, 767 et 658 pb. Les clones 2, 4, 5, 6 et 8 présentent des bandes supplémentaires non expliquées.

Le clone 1 possède 3 bandes calculées de tailles 3010, 1430 et 780 pb. Ces trois bandes correspondent à trois des quatre bandes théoriques (2887, 1338, 767) excepté la bande de 141 bp. Ce clone est employé pour la suite des expériences.

2.2.4.5. Deuxième et troisième essai de transformation avec pAAV-MCS-Park9 + A

Le plasmide pAAV-MCS-Park9 possède une taille supérieure aux deux autres plasmides étudiés, soit 6960 pb par rapport à 3990 et 3423 pb pour respectivement pAAV-MCS et pAAV-MCS-Short. De ce fait, la ligation d'un fragment de 1711 pb est plus délicate. Pour améliorer la ligation, la quantité de plasmide est augmentée de 2.5 fois.

La transformation s'effectue de la même façon que précédemment avec cette nouvelle ligation.

Tableau 9 : Nombre de colonies obtenues sur plaque NA pour la transformation avec la deuxième ligation pAAV-Park9+A

Nom du tube	Agent de sélection	Volume étalé sur plaque [μl]	Nombre de colonies [-]
Contrôle négatif (pAAV-Park9 + A lin)	Ampicilline et Chloramphénicol	100	0
Contrôle positif pUC19	Ampicilline	100	> 300
		100 (dilué 10 ×)	46
pAAV-Park9 + A	Ampicilline et Chloramphénicol	100	0
		Concentré	0

Aucune colonie n'est observée pour le contrôle négatif et avec pAAV-Park9 + A. La transformation a correctement fonctionné comme le témoigne le nombre de colonies observées avec le contrôle positif.

Une nouvelle ligation est effectuée. Cette fois, la quantité d'insert est doublée (de 10 à 20 ng) par rapport aux conditions initiales.

Tableau 10 : Nombre de colonies obtenues sur plaque NA pour la transformation avec la troisième ligation pAAV-Park9+A

Nom du tube	Agent de sélection	Volume étalé sur plaque [μl]	Nombre de colonies [-]
Contrôle négatif (pAAV-Park9 + A lin)	Ampicilline et Chloramphénicol	100	0
Contrôle positif pUC19	Ampicilline	100	> 300
pAAV-Park9 + A	Ampicilline et Chloramphénicol	100	0
		150	4

Ces nouvelles conditions semblent mieux adaptées pour cette ligation car le nombre de colonies observées après transformation est supérieur aux observations précédentes.

Les quatre colonies obtenues sont mises en culture. L'ADN extrait est testé par restriction.

2.2.4.6. Restrictions des clones pDEST-A-AAV-Short-Park9

Les différents clones sont testés par restriction avec l'enzyme *NotI*. Celle-ci permet d'obtenir des fragments plus facilement comparables par rapport à la restriction précédente avec les enzymes *MluI* et *NotI* qui donnaient un doublé de bandes difficilement observable.

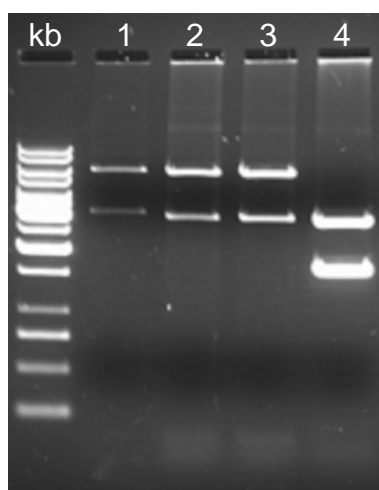


Figure 26 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % des restrictions par *NotI* des ADN plasmidiques extraits des colonies transformées par heat shock, présentes sur des plaques contenant de l'ampicilline et du chloramphénicol

1-4 : ADN plasmidique de différents clones transformés avec le plasmide pDEST-A-AAV-Short-Park9

kb : Marqueur 1 kb en pb

La détermination de la taille des fragments s'opère à partir d'une photo du gel avec une migration plus longue. Celle-ci n'est pas utilisée ici en illustration car la bande inférieure n'est plus observable. Les bandes supérieures ont une taille calculée de 5680 et 3200 pb correspondant à la théorie (5642, 2887 et 141 pb).

Le clone 2 est utilisé pour la suite des expériences.

2.2.4.7. Amplification des vecteurs pDEST-A-AAV

L'ADN plasmidique est extrait à partir des maxicultures avec le kit NucleoBond® Plasmid. La concentration en ADN est mesurée à l'aide du NanoDrop.

Tableau 11 : Mesures de l'absorbance pour la détermination de la concentration en ADN des maxipreps

Plasmide	Absorbance 260 nm [-]	Absorbance $\frac{260}{230}$ [-]	Absorbance $\frac{260}{280}$ [-]	Concentration [ng/μl]
pDEST-A-AAV-MCS	12.811	2.26	1.95	640.54
pDEST-A-AAV-MCS-Short	3.583	2.15	1.92	179.14
pDEST-A-AAV-Park9	34.263	2.14	1.92	1713.1

Les rapports d'absorbance ne montrent pas de contamination importante.

L'ADN est contrôlé par restriction avec l'enzyme *NotI*.

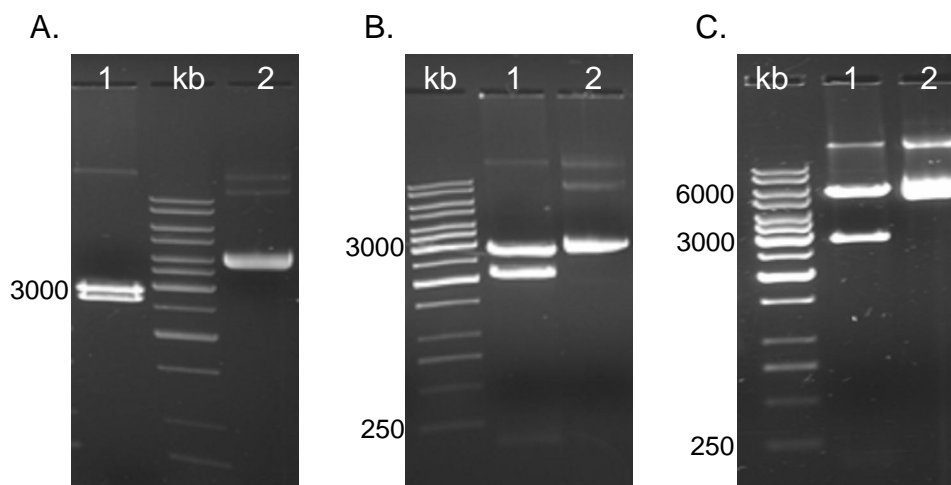


Figure 27 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % des restrictions par *NotI* des maxipreps

kb : Marqueur 1 kb en bp

A. pDES-A-AAV-MCS : 1 : digéré, 2 : non digéré

B. pDES-A-AAV-MCS-Short : 1 : digéré, 2 : non digéré

C. pDES-A-AAV-Short-Park9 : 1 : digéré, 2 : non digéré

Les trois plasmides non digérés présentent plusieurs bandes correspondant à différentes formes d'enroulement.

Sur la figure 27 A, piste 1, 3 bandes sont observées. Une quatrième bande de très faible intensité en dessous de 250 pb était visible sur le gel. Les bandes ont des tailles calculées de 2940 et 2760 pb correspondant aux bandes théoriques de 2887, 2672 et 141 pb.

Pour pDES-A-AAV-MCS-Short quatre bandes sont présentes dont une bande supérieure observable également dans le plasmide non digéré. Les trois autres bandes ont des tailles calculées de 2700, 2170 et 210 pb pour théoriquement 2887, 2105 et 141 pb.

Pour pDES-A-AAV-Short-Park9, trois bandes peuvent être observées dont une qui se retrouve dans le plasmide non digéré. Les deux bandes différentes ont une taille de 5690, 2990 et 210 pb contre théoriquement 5642, 2887 et 141 pb.

2.2.5. LR réaction

La réaction LR a pour but d'échanger par recombinaison les séquences contenues entre les *att* des deux vecteurs (vecteur d'entrée et de destination) mis en contact.

Elle permet d'interchanger la cassette A (située sur un plasmide possédant le gène de résistance à l'ampicilline) avec un promoteur neurospécifique (situé sur un plasmide possédant le gène de résistance à la kanamycine). Cette étape de recombinaison s'effectue à l'aide d'un mélange d'enzymes. Les plasmides qui ont opéré la recombinaison possèdent le gène de résistance à l'ampicilline et ont perdu le gène *ccdB* toxique pour les bactéries (Figure 10).

2.2.5.1. Transformation

Les vecteurs recombinés sont ensuite transformés par électroporation afin d'intégrer ces nouveaux plasmides aux cellules *E.coli* DH10B. Le plasmide recombiné d'intérêt possède le gène de résistance à l'ampicilline et le gène *ccdB* est remplacé par la séquence d'intérêt. Ainsi, les vecteurs qui n'ont pas réagi et les vecteurs secondaires de type donneur portent le gène *ccdB* qui inhibe la croissance des cellules DH10B.

Tableau 12 : Paramètres d'électroporation et nombre de colonies obtenues sur plaque NA + Amp pour chaque électroporation testée

Nom du tube	Paramètres d'électroporation			Volume étalé sur plaque [μl]	Nombre de colonies [-]
	Voltage [kV]	Capacité [μF]	Temps [ms]		
Contrôle négatif	1.70	25	4.54	100	0
Contrôle positif pENTR-gus	1.70	25	4.22	100	> 300
Contrôle négatif LR Synapsin	1.70	25	4.48	100	6
pENTR-Syn + pDEST-A-AAV	1.70	25	4.26	100	> 300
				100	> 300
				Concentré	> 300
Contrôle négatif LR Prion Short	1.70	25	4.56	100	6
pENTR-Prion Short + pDEST-A-AAV	1.70	25	4.14	100	> 300
				100	> 300
				Concentré	> 300
Contrôle négatif LR NSE	1.70	25	4.52	100	3
pENTR-NSE + pDEST-A-AAV	1.70	25	4.12	100	> 300
				100	> 300
				Concentré	> 300

Les temps d'impulsion mesurés sont compris entre 4 et 5 ms. Ainsi, les électroporations se sont normalement effectuées dans les conditions requises.

Le contrôle négatif ne permet pas le développement de colonies sur plaques contenant de l'ampicilline car les bactéries *E.coli* DH10B ne sont naturellement pas résistantes à ces antibiotiques. Les contrôles négatifs LR possèdent tous moins de sept colonies. Ceux-ci sont effectués en omettant le mix d'enzyme LR clonaseTM.

Les réactions avec les différents plasmides sont très efficaces et présentent un nombre supérieur à 300 colonies.

Les plasmides recombinés portent désormais le nom pEXP selon la nomenclature du système Gateway[®].

Dix clones pour chaque réaction sont mis en culture afin d'être testés.

2.2.5.2. Contrôle des clones obtenus

Les différents clones sont contrôlés par restriction enzymatique à partir de l'ADN plasmidique extrait par la deuxième méthode (point 2.1.2.2.).

Les différents clones pEXP-AAV-MCS-Synapsin sont digérés avec l'enzyme *Bam*HI. Le clone 1 n'est pas contrôlé car celui-ci n'a pas poussé dans le milieu LB avec ampicilline.

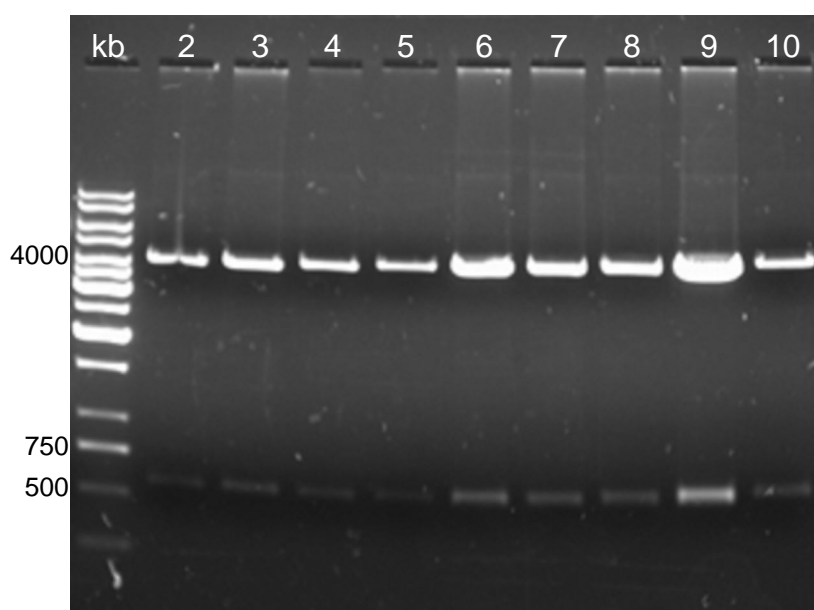


Figure 28 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % des restrictions par *Bam*HI des ADN plasmidiques extraits des colonies transformées par électroporation avec le plasmide pEXP-AAV-MCS-Synapsin, présentes sur des plaques contenant de l'ampicilline

2-10 : ADN plasmidique des différents clones

kb : Marqueur 1 kb en pb

L'ensemble des clones testés montre la présence de 2 bandes de tailles calculées 4030 et 540 pb correspondant aux tailles théoriques de 3989 et 573 pb.

Le clone 3 est utilisé pour l'amplification de ce plasmide.

Les clones pEXP-AAV-MCS-Prion Short sont digérés avec l'enzyme *Bgl*II.

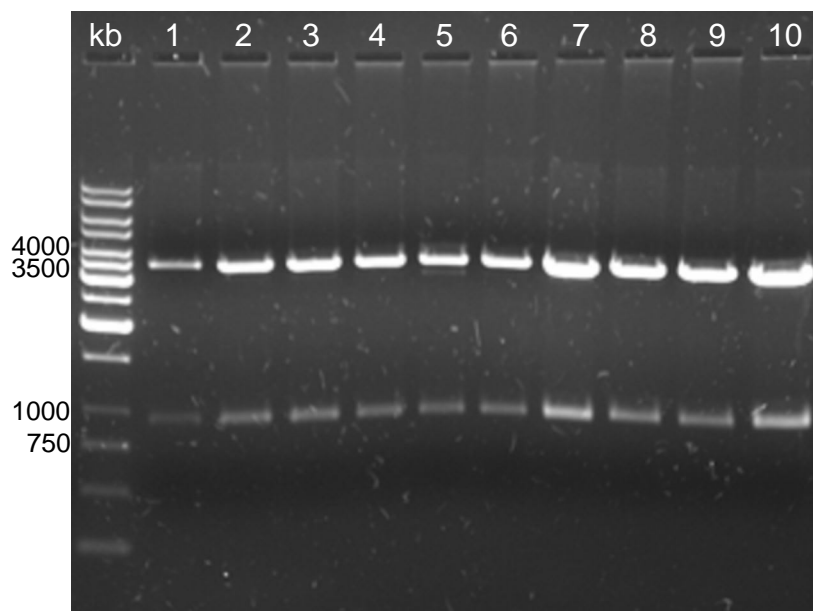


Figure 29 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % des restrictions par BglII des ADN plasmidiques extraits des colonies transformées par électroporation avec le plasmide pEXP-AAV-MCS-Prion Short, présentes sur des plaques contenant de l'ampicilline

1-10 : ADN plasmidique des différents clones

kb : Marqueur 1 kb en pb

L'ensemble des clones donne 2 bandes de tailles calculées de 3480 et 920 pb correspondant aux bandes théoriques de 3460 et 954 pb.

Le clone 2 est utilisé pour l'amplification de ce plasmide.

Les clones pEXP-AAV-MCS-NSE sont digérés avec l'enzyme *ClaI*. Le clone 2 n'est pas contrôlé car celui-ci n'a pas poussé dans le milieu LB avec ampicilline.

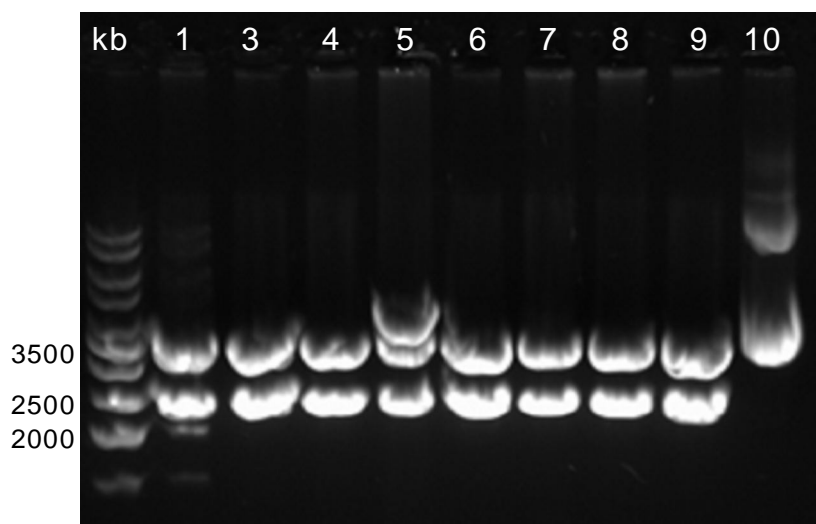


Figure 30 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % des restrictions par *ClaI* des ADN plasmidiques extraits des colonies transformées par électroporation avec le plasmide pEXP-AAV-MCS-NSE, présentes sur des plaques contenant de l'ampicilline

1-10 : ADN plasmidique des différents clones

kb : Marqueur 1 kb en pb

Excepté pour les clones 5 et 10, deux bandes sont remarquables de tailles calculées de 3630 et 2510 pb correspondant aux tailles théoriques de 3534 et 2389 pb. La largeur des bandes ne permet pas de déterminer les tailles des bandes avec une grande précision.

Le clone 4 est utilisé pour l'amplification du plasmide.

2.2.5.3. Amplification des vecteurs de type pEXP

L'ADN plasmidique est extrait à partir des maxicultures avec le kit NucleoBond® Plasmid et la concentration en ADN est mesurée à l'aide du NanoDrop.

Tableau 13 : Mesures de l'absorbance pour la détermination de la concentration en ADN des maxipreps

Plasmide	Absorbance 260 nm [-]	Absorbance $\frac{260}{230}$ [-]	Absorbance $\frac{260}{280}$ [-]	Concentration [ng/μl]
pEXP-AAV-MCS-Syn	27.685	2.23	1.93	1384.2
pEXP-AAV-MCS-Prion Short	22.588	2.26	1.94	1129.4
pEXP-AAV-MCS-NSE	113.928	1.85	1.63	5696.4

Les rapports d'absorbance pour les vecteurs pEXP-AAV-MCS Syn et Prion Short ne montrent pas de contamination importante. Pour pEXP-AAV-MCS-NSE, le rapport d'absorbance 260/280 est inférieur à 1.8. Cet échantillon est contaminé par des protéines. L'échantillon est toutefois utilisé pour la suite des expériences sachant que la concentration réelle en ADN a été surestimée.

Les plasmides sont contrôlés avec les mêmes enzymes que celles utilisées pour le contrôle des clones.

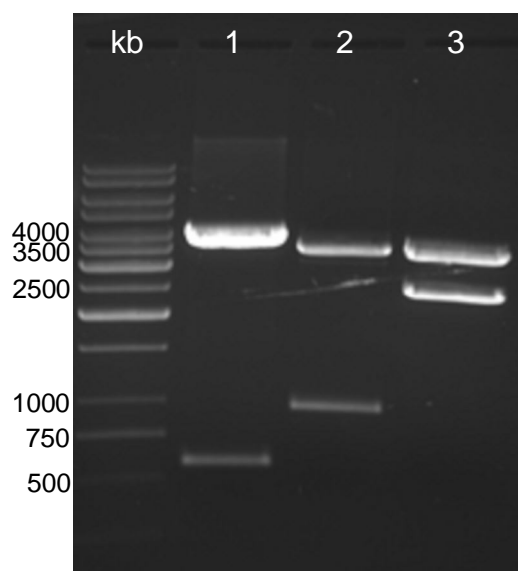


Figure 31 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % des restrictions des plasmides de type pEXP-AAV.

1 : pEXP-AAV-MCS-Syn digéré avec *Bam*HI ; **2 :** pEXP-AAV-MCS-Prion Short digéré avec *Bgl*II ;
3 : pEXP-AAV-MCS-NSE digéré avec *Cla*I
kb : Marqueur 1 kb en pb

Les différents plasmides présentent les mêmes bandes que celles obtenues au point 2.2.5.1. Deux bandes de tailles calculées de 4130 et 580 pb (correspondant aux tailles théoriques 3989 et 573 pb), sont observées sur la piste 1 de la figure 31, pour le plasmide contenant le promoteur synapsine. Le plasmide contenant le promoteur prion short (piste 2) possède des bandes de tailles calculées de 3810 et 950 pb (correspondant à la théorie 3460 et 954 pb). Le plasmide pEXP-AAV-MCS-NSE (piste 3) montre également la présence de deux bandes. Celles-ci ont des tailles de 3510 et 2340 pb (correspondant à la théorie 3534 et 2389 pb).

2.2.6. Séquençage des promoteurs de vecteurs de type pEXP

Afin de s'assurer que la construction soit correcte avant d'insérer le gène d'intérêt, un séquençage des différents plasmides est effectué par la société Microsynth.

Le « design » des amorces est réalisé par Bernard Schneider à l'aide du programme informatique MacVector. Les amorces nommées « betaglobin intron rev » et « rev2 » se situent sur l'intron β -globin et permettent de redescendre le plasmide en 5' en direction du promoteur.

Les séquences obtenues sont analysées avec le programme informatique Finch TV (version 1.4.0, Geopiza Inc.) puis comparées aux séquences théoriques à l'aide du programme informatique BLAST (bl2seq, National Center for Biotechnology Information).

2.2.6.1. pEXP-AAV-MCS-Syn

Le séquençage effectué à partir de l'amorce betaglobin intron rev par la société Microsynth n'a pas fonctionné avec cette amorce pour une raison inconnue. De ce fait, le séquençage de ce plasmide s'effectue avec l'amorce betaglobin intron rev 2.

GCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCATCAC
AAGTTTGTACAAAAAGCAGGGTCCGCGGCCGCCCTTCACCATCGATAGGGCCCTGCGT
ATGAGTGAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGGGTGCCTACCTGACG
ACCGACCCCGACCCACTGGACAAGCACCCAACCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCCT
ATCAGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCCAGCTTCA
GCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGCGCGCGCCACCGCCGCCTCAGCAC
TGAAGGCGCGCTGACGTCCTCGCCGGTCCCCGCAAACTCCCCTTCGCGGCCACCTTG
GTCGCGTCCGCGCCGCGCCGGCCAGCCGGACCGCACCACGCGAGGCGCGAGATAGG
GGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTG
CGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAGTCGAGGATCCGCAAGGG
TGGGCGCGCCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGTGATGGATTGGAATCCCGGCCGGA
ACGGTGCATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGA
GTCTATAGGCCACAAAAAATGCTTTCTTCTTTAATACTTTTTGTTTATCTTATTTC
TAATACTTTCCC

- TCGAT** : séquence du promoteur
ACAAG : séquence du site *attB*
CGTGC : séquence normalement reconnue par l'amorce betaglobin intron rev
ACGCG et **GG** : site initial d'insertion de la cassette A
G : base supplémentaire par rapport au séquençage

L'alignement de la séquence théorique avec celle obtenue lors du séquençage est de 778 bases sur 779. En effet, une paire de bases (surlignée en jaune) présente dans la séquence théorique ne se retrouve pas lors du séquençage.

La séquence complémentaire à l'amorce qui n'a pas fonctionné est bien présente.

2.2.6.2. pEXP-AAV-MCS-Prion Short

Le séquençage est effectué avec l'amorce betaglobin intron rev.

AGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGGCCGCAC
GCGATCACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCCCTTCACCTCGAGATCTT
TACAGTCAAATGAGCCACGTCAGGGAGCGATGGCACCCGCAGGCGGTATCAACTGATG
CAAGTGTTCAGCGAATCTCAACTCGTTTTTTCCGGTGACTCATTCCCGGCCCTGGTTGG
CAGCGCTGCACCCTTTAACTTAAACCTCGGCCGGCCGCCCGGGGGGCACAGAGTGTG
CGCCGGGCCGCGCGGCAATTGGTCCCCGCGCCGACCTCCGCCCCGCGAGCGCCGCGCTT
CCCTTCCCCGCCCCGCGTCCCTCCCCCTCGGCCCGCGCGTTCGCTGTCTTCCGAGCCAG
TCGCTGACAGCCGCGGCGATACCCGTCGACCTCGAGAAGGGTGGGCGCGCCGACCAGC
TTTCTTGTACAAAGTGGTGATGGATTTCGAATCCCGGCCGGGAACGGTG

ATCTT : séquence du promoteur

ACAAG : séquence du site *attB*

ACGCG et **GG** : site initial d'insertion de la cassette A

G et **T** : bases supplémentaires par rapport au séquençage

L'alignement de la séquence théorique avec celle obtenue lors du séquençage est de 518 bases sur 520. En effet, deux paires de bases (surlignées en jaune) présentes dans la séquence théorique ne se retrouvent pas lors du séquençage.

Une anomalie se retrouve sur les 2 séquences contenant les promoteurs synapsine et prion. La délétion se situe au niveau du site de restriction qui a permis la linéarisation du plasmide pAAV-CMV-MCS. En effet, le plasmide pAAV-CMV-MCS est linéarisé par restriction avec les enzymes *MluI* et *SacII*. Les extrémités sont ensuite converties en bout franc à l'aide de l'ADN polymérase T4. L'extrémité coupée avec l'enzyme *MluI* puis convertie en bout franc doit donner la séquence suivante : ACGCG (Figure 13). La cassette A, contenant les sites de recombinaison, est clonée à la suite de cette séquence. Ainsi, lors de la recombinaison, cette séquence en amont de la cassette ne doit pas être modifiée. Cependant, lors du séquençage des plasmides pEXP-AAV-MCS-Syn et pEXP-AAV-MCS-Prion, cette séquence n'est pas entière. En effet, une paire de base est délaissée et dans les deux cas la séquence devient : ACGC.

2.2.6.3. pEXP-AAV-MCS-NSE

Le séquençage est effectué avec l'amorce betaglobin intron rev.

AACAGGACACGGGGTGGAGAGGGCGAAAGGAGGGCAGAGTGAAGCAGAGAGACTGAGA
GCCTGGGGATGTGGGCATTCCGGTAGGGCACACAGTTCACCTGTCTTCTCTTTTCCAG
GAGGCCAAAGATGCTGACGTCGAAGAACTCATAATACCCAGTGGGGACCACCGCATTC
ATAGCCCTGTTACAAGAAGTGGGAGATGTTCTTTTTGTCCCAGACTGGAAATCCATTA
CATCCCGAGGCTCAGGTTCTGTGGTGGTCATCTCTGTGTGGCTTGTTCTGTGGGGCCTACC
TAAAGTCCTAAGCACAGCTCTCAAGCAGATCCGAGGCGACTAAGATGCTAGTAGGGGTT
GTCTGGAGAGAAGAGCCGAGGAGGTGGGCTGTGATGGATCAGTTCAGCTTTCAAATAA
AAAGGCGTTTTTATATTCTGTGTGTCGAGTTCGTGAACCCCTGTGGTGGGCTTCTCCATCTG
TCTGGGTTAGTACCTGCCACTATACTGGAATAAGGGGACGCCTGCTTCCCTCGAGTTGG
CTGGACAAGGTTATGAGCATCCGTGTACTTATGGGGTTGCCAGCTTGGTCCTGGATCGC
CCGGGCCCTTCCCCACCCGTTTCGGTTCGCCACCACCCGCGCTCGTACGTGCGTCTC
CGCCTGCAGCTCTTGACTCATCGGGGGCCCCCGGGTCACATGCGCTCGCTCGGCTCTATA
GGC

GCCGCCCCCTGCCCACCCCCCGCCGCGCTGGGAGCCGCAGCCGCCGCCACTCCTGCTC
TCTCTGCGCCGCGCCGTCACCACCGCCACCGCCACCGGCTGAGTCTGCAGTCCTCGAG
ATCCACCGGTCGCCACCATGGATCCGCAAGGGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTCTTGTA
CAAGTGGTGATGGATTTCGAATCCCGGCCGGGAACGG

AACAG : séquence du promoteur

ACCCA : séquence du site *attB*

GG : site initial d'insertion de la cassette A

G et **A** : bases supplémentaires par rapport au séquençage

G et **A** : bases supplémentaires par rapport à la théorie

L'alignement de la séquence théorique avec celle obtenue lors du séquençage est de 919 bases sur 925. En effet, trois paires de bases (surlignées en jaune) présentes dans la séquence théorique ne se retrouvent pas lors du séquençage. De plus, trois paires de bases (soulignées et surlignées en jaune) ne sont pas présentes théoriquement. Ces anomalies s'expliquent par leurs positions en fin de séquençage.

2.2.7. Clonage du gène FPmax

Le gène FPmax est cloné dans les trois plasmides contenant les trois promoteurs neurospécifiques.

2.2.7.1. Préparation du gène FPmax

Le gène FPmax est extrait du plasmide pAAV-CMV-FPmax par restriction avec les enzymes *EcoRI* et *HindIII*.

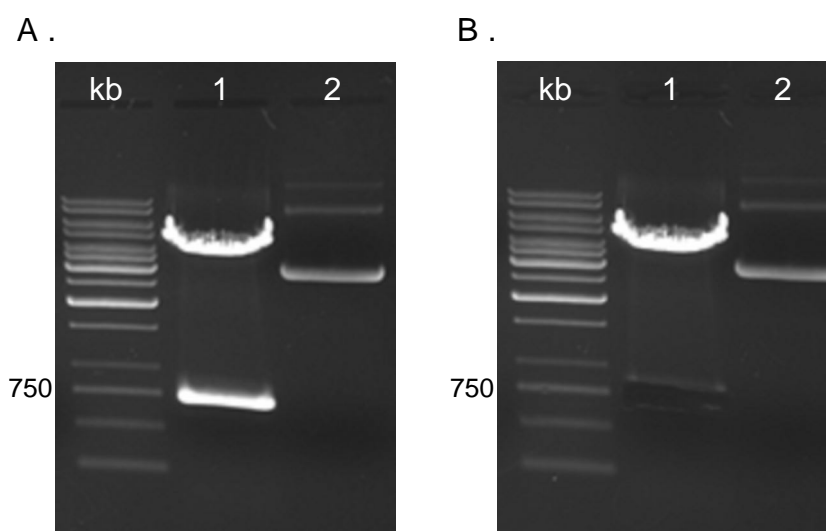


Figure 32 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % du plasmide pAAV-CMV-FPmax après restriction avec *EcoRI* et *HindIII*

A. Gel avant l'isolation du fragment

1 : pAAV-CMV-FPmax digéré ; **2** : pAAV-CMV-FPmax non digéré

B. Gel après l'isolation du fragment

1 : pAAV-CMV-FPmax digéré ; **2** : pAAV-CMV-FPmax non digéré

kb : Marqueur 1 kb en pb

Deux bandes sont présentes sur le gel après restriction du plasmide. Les tailles calculées sont de 4480 et 720 pb avec en théorie des tailles de 4615 et 716 pb.

La bande inférieure correspond au gène de FPmax. Cette bande est excisée du gel comme le montre la figure 32 B. L'ADN est ensuite extrait du gel.

2.2.7.2. Restriction des plasmides pEXP-AAV-MCS

Le gène FPmax est cloné dans trois vecteurs différents. Ceux-ci, sont tout d'abord digérés avec les mêmes enzymes que celles qui ont permis d'extraire FPmax de son vecteur d'origine soit *EcoRI* et *HindIII*.

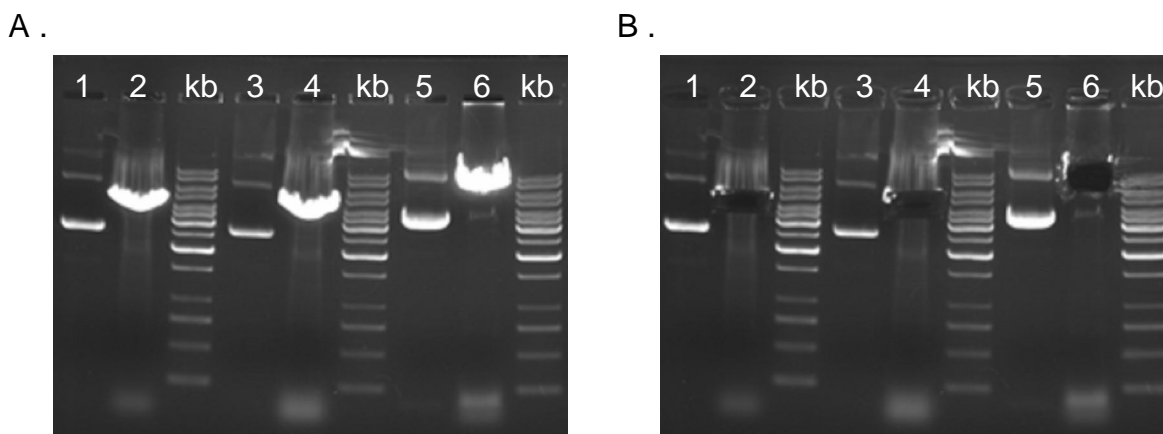


Figure 33 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % des plasmide pEXP-AAV-MCS après restriction avec *EcoRI* et *HindIII*

A. Gel avant l'isolation du fragment

1 : pEXP-AAV-Syn non digéré ; 2 : pEXP-AAV-Syn digéré ; 3 : pEXP-AAV-Prion Short non digéré ; 4 : pEXP-AAV-Prion Short digéré ; 5 : pEXP-AAV-NSE non digéré ; 6 : pEXP-AAV-NSE digéré

B. Gel après l'isolation du fragment

1 : pEXP-AAV-Syn non digéré ; 2 : pEXP-AAV-Syn digéré ; 3 : pEXP-AAV-Prion Short non digéré ; 4 : pEXP-AAV-Prion Short digéré ; 5 : pEXP-AAV-NSE non digéré ; 6 : pEXP-AAV-NSE digéré
kb : Marqueur 1 kb en pb

Afin d'obtenir assez de matériel pour la suite des expériences, 10 µg d'ADN sont digérés puis chargés sur gel. De ce fait, les bandes observées sont très intenses et les tailles ne sont pas calculées. En théorie, celles-ci devraient être de 4527 et 35 bp pour pEXP-AAV-Syn, 4379 et 35 bp pour pEXP-AAV-Prion Short et 5888 et 35 bp pour pEXP-AAV-NSE.

La figure 33 B permet de contrôler que les bonnes bandes ont été extraites entièrement du gel.

2.2.7.3. Ligation

Le gène FPmax et les vecteurs sont digérés avec les mêmes enzymes. Une simple ligation entre eux permet d'insérer le gène dans les différents plasmides.

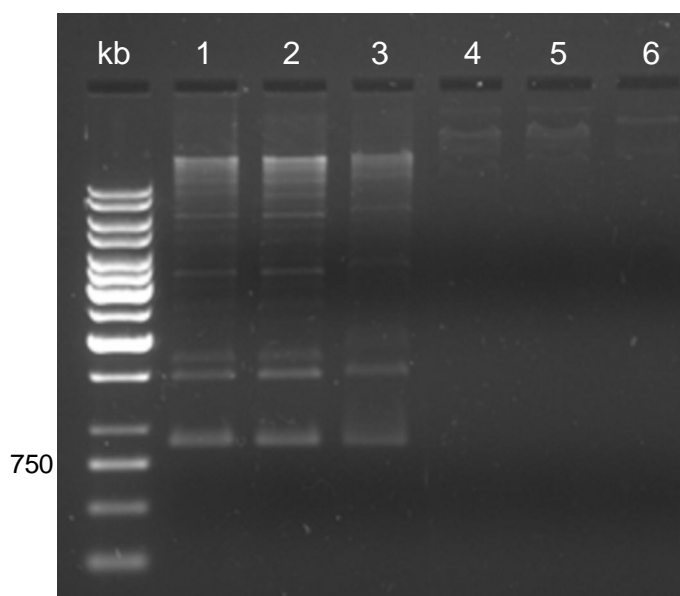


Figure 34 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % des différents produits de ligation des plasmides de type pEXP-AAV avec le gène FPmax

1 : pEXP-AAV-Syn + FPmax ; **2** : pEXP-AAV-Prion Short + FPmax ; **3** : pEXP-AAV-NSE + FPmax
4 : pEXP-AAV-Syn contrôle ligation ; **5** : pEXP-AAV-Prion Short contrôle ligation ; **6** : pEXP-AAV-NSE contrôle ligation

kb : Marqueur 1 kb en pb

Les différents produits de ligation montrent la présence d'une multitude de bandes. Seules des bandes de faibles intensités et de haut poids moléculaires sont visibles pour les contrôles des ligations.

Cette différence montre l'efficacité des différentes ligations.

2.2.7.4. Transformation

La transformation a pour but d'intégrer le produit de ligation aux cellules *E.coli* DH10B. Les vecteurs désirés possèdent une résistance à l'ampicilline, ce qui permet la sélection des cellules transformées. Les bactéries électrocompétentes sont transformées par électroporation.

Tableau 14 : Paramètres d'électroporation et nombre de colonies obtenues sur plaque NA + Amp pour chaque électroporation testée

Nom du tube	Paramètres d'électroporation			Volume étalé sur plaque [μl]	Nombre de colonies [-]
	Voltage [kV]	Capacité [μF]	Temps [ms]		
Contrôle négatif	1.70	25	3.92	100	0
Contrôle positif (pEXP-AAV-MCS-SYN)	1.70	25	4.56	100	> 300
Contrôle pEXP-AAV-MCS-Synapsin lin	1.70	25	4.12	100	2
pAAV-SYN-FPmax	1.70	25	4.06	100	279
				200	> 300
Contrôle pEXP-AAV-MCS-Prion Short lin	1.70	25	4.02	100	2
pAAV-Prion Short- FPmax	1.70	25	4.30	100	51
				200	74
Contrôle pEXP-AAV-MCS-NSE-FPmax	1.70	25	3.88	100	0
pAAV-NSE-FPmax	1.70	25	3.76	100	279
				200	> 300

Le temps d'impulsion pour un transfert idéal d'ADN et pour la survie des cellules doit être proche de 5 ms. Les différentes transformations présentent un temps inférieur à celui-ci. Les conditions restent cependant acceptables.

Le nom des différents clones obtenus suit la nomenclature : pAAV-nom du promoteur- nom du gène.

2.2.7.5. Contrôle des clones par restriction

L'ADN est extrait des minicultures selon la deuxième méthode d'extraction de plasmide (point 2.1.2.2.). L'ADN est ensuite contrôlé par restriction avec l'enzyme *PstI* pour pAAV-Syn-FPmax et pAAV-Prion-FPmax et avec *EcoRI* et *HindIII* pour pAAV-NSE-FPmax.

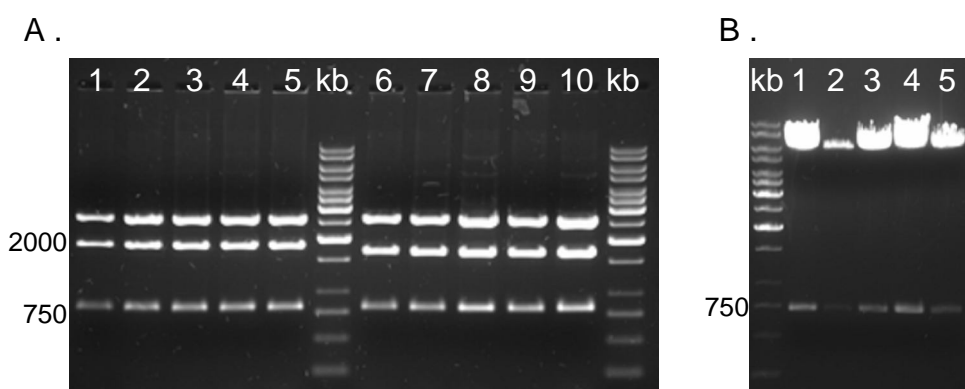


Figure 35 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % des clones obtenus après restriction

A. pAAV-Syn-FPmax et pAAV-Prion-FPmax digérés avec *PstI*

1-5 : pAAV-Syn-FPmax, clone 1 à 5 ; **6-10 :** pAAV-Prion-FPmax, clone 1 à 5

B. pAAV-NSE-FPmax digéré avec *EcoRI* et *HindIII*

1-5 : clone 1 à 5

kb : Marqueur 1 kb en pb

Aucune différence n'est observée entre les différents clones d'un même groupe. Trois bandes sont observées pour les clones pAAV-Syn-FPmax de tailles calculées 2660, 1880 et 790 pb correspondant aux tailles théoriques 2605, 1827 et 812 pb.

Trois bandes sont également visibles pour les clones pAAV-Prion-FPmax de tailles calculées 2660, 1680 et 790 pb correspondant aux tailles théoriques 2605, 1688 et 812 pb.

Deux bandes sont détectées pour pAAV-NSE-FPmax de tailles calculées 6080 et 710 pb correspondant aux tailles théoriques de 5889 et 716 pb.

Le clone 1 pour pAAV-Syn-FPmax et pAAV-Prion-FPmax et le clone 2 pour pAAV-NSE-FPmax sont utilisés lors de l'amplification pour la production virale (point 2.2.10.)

2.2.8. Clonage du gène Synucléine

Les deux formes du gène codant pour la synucléine, non muté (WT) et muté (A30P), sont clonés uniquement dans le vecteur pEXP-AAV-Syn.

2.2.8.1. Préparation des gènes Synucléine WT et A30P

Les gènes synucléine WT et A30P sont extraits respectivement, par restriction avec les enzymes *HindIII* et *BglII*, des plasmides pAAV-PGK-asynWT et pAAV-PGK-A30P.

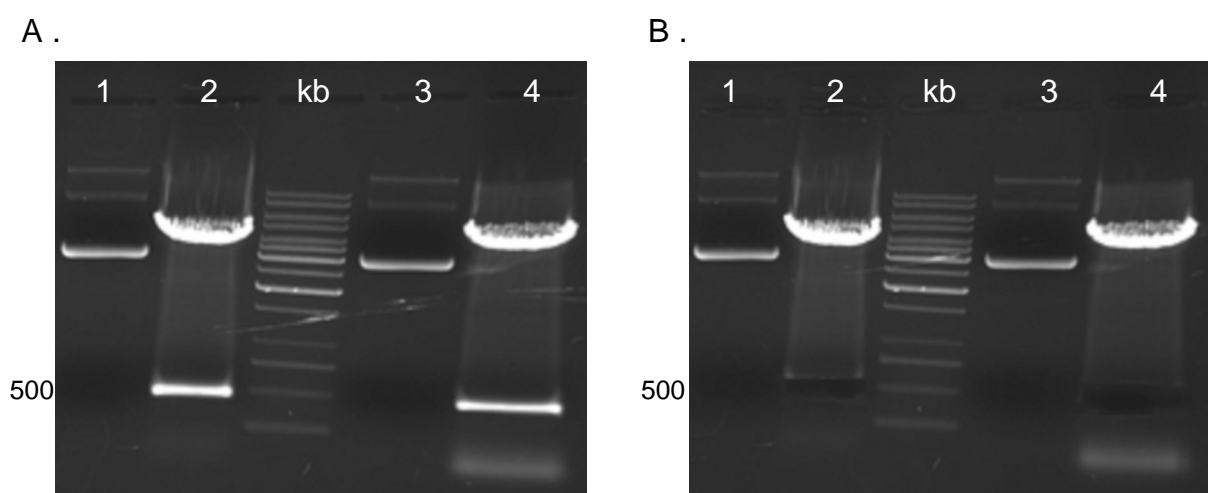


Figure 36 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % des plasmides pAAV-PGK après restriction avec *HindIII* et *BglII*

A. Gel avant l'isolation du fragment

1 : pAAV-PGK-asynWT non digéré ; **2 :** pAAV-PGK-asynWT digéré

B. Gel après l'isolation du fragment

1 : pAAV-PGK-A30P non digéré ; **2 :** pAAV-PGK-A30P digéré

kb : Marqueur 1 kb en pb

Le vecteur pAAV-PGK-asynWT digéré montre la présence de deux bandes de tailles calculées 4460 et 470 pb correspondant aux tailles théoriques 4513 et 457 pb.

Le vecteur pAAV-PGK-A30P digéré montre trois bandes. Les deux bandes supérieures possèdent des tailles calculées de 4460 et 440 pb correspondant aux tailles théoriques 4510 et 459 bp. L'autre bande correspond aux trois fragments de tailles théoriques 54, 28 et 25 pb. Cette bande ne correspond pas à de l'ARN car celle-ci n'est pas présente dans le vecteur non digéré.

Les bandes d'intérêt sont excisées du gel et l'ADN en est extrait pour la suite des expériences.

2.2.8.2. Restriction des vecteurs pEXP-AAV-MCS-Synapsin

La restriction du vecteur pEXP-AAV-MCS-Synapsin avec les mêmes enzymes que celles utilisées pour extraire le gène synucléine permet d'insérer le gène d'intérêt.

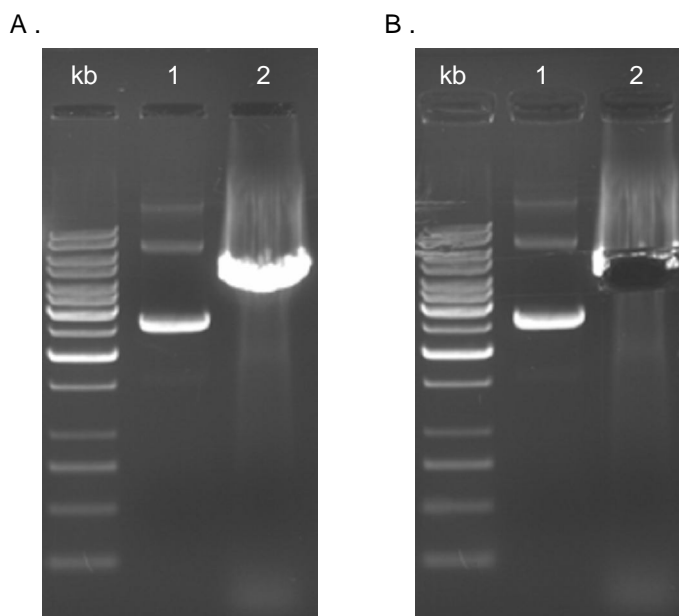


Figure 37 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % du plasmide pEXP-AAV-MCS-Synapsin après restriction avec HindIII et BglII

A. Gel avant l'isolation du fragment

1 : pEXP-AAV-MCS-Synapsin non digéré; **2 :** pEXP-AAV-MCS-Synapsin digéré

B. Gel après l'isolation du fragment

1 : pEXP-AAV-MCS-Synapsin non digéré; **2 :** pEXP-AAV-MCS-Synapsin digéré

kb : Marqueur 1 kb en pb

La forte intensité de la bande est due au chargement de 10 µg d'ADN. La taille de la bande n'est pas calculée. Elle est comprise entre 4000 et 5000 pb. En théorie, deux fragments de tailles 4534 et 28 pb sont obtenus après restriction avec ces enzymes.

La figure 37 B, piste2, permet de contrôler l'excision de la bande d'intérêt.

2.2.8.3. Ligation

Les gènes synucléine WT et synucléine A30P sont insérés dans les vecteurs pEXP-AAV-MCS-Synapsin par ligation pour former les vecteurs pAAV-Synapsin-synucléinWT et pAAV-Synapsin-synucléinA30P.

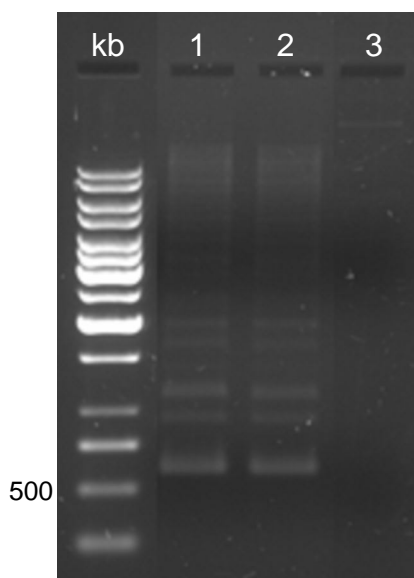


Figure 38 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % des différents produits de ligation du plasmide pEXP-AAV-MCS-Synapsin avec le gène synucléine WT et A30P

1 : pEXP-AAV-Synapsin + Synucléine WT ; **2** : pEXP-AAV-Synapsin + Synucléine A30P ; **3** : pEXP-AAV-Synapsin contrôle ligation

kb : Marqueur 1 kb en pb

Les différents produits de ligation montrent la présence d'une multitude de bandes. Seule une bande de faible intensité et de haut poids moléculaire est visible pour le contrôle de la ligation.

Cette différence montre l'efficacité des deux ligations.

2.2.8.4. Transformation

La transformation a pour but d'intégrer le produit de ligation aux cellules *E.coli* DH10B. Les vecteurs désirés possèdent une résistance à l'ampicilline, entraînant la sélection des cellules transformées. Les bactéries électrocompétentes sont transformées par électroporation.

Tableau 15 : Paramètres d'électroporation et nombre de colonies obtenues sur plaque NA + Amp pour chaque électroporation testée

Nom du tube	Paramètres d'électroporation			Volume étalé sur plaque [μl]	Nombre de colonies [-]
	Voltage [kV]	Capacité [μF]	Temps [ms]		
Contrôle négatif	1.70	25	3.92	100	0
Contrôle positif (pEXP-AAV-MCS-Synapsin)	1.70	25	4.56	100	> 300
Contrôle pEXP-AAV-MCS-Synapsin lin (HindIII/BglII)	1.70	25	4.34	100	0
pAAV-Synapsin-Synucléine WT	1.70	25	3.84	100	> 300
				200	> 300
pAAV-Synapsin-Synucléine A30P	1.70	25	3.84	100	> 300
				200	> 300

Le temps d'impulsion pour un transfert idéal d'ADN et pour la survie des cellules doit être proche de 5 ms. Les différentes transformations présentent un temps inférieur à celui-ci. Les conditions restent cependant acceptables.

Le nom des différents clones obtenus respecte la nomenclature qui suit : pAAV-nom du promoteur-nom du gène.

Cinq clones pour chaque condition sont mis en miniculture.

2.2.8.5. Contrôle des clones par restriction

L'ADN est extrait des minicultures selon la deuxième méthode d'extraction de plasmide (point 2.1.2.2.). L'ADN des différents clones est ensuite contrôlé par restriction avec l'enzyme *Bam*HI.

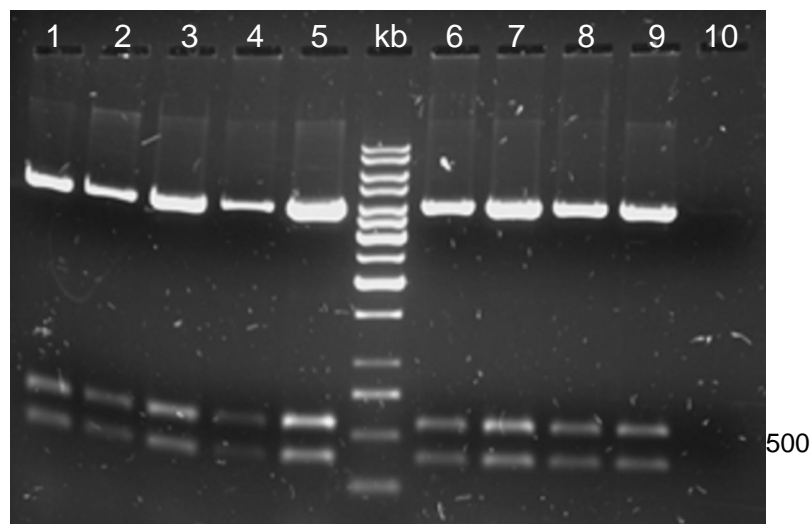


Figure 39 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % des clones obtenus après restriction avec *Bam*HI

1-5 : pAAV-Synapsin-Synuclein A30P, clone 1 à 5 ; **6-10** : pAAV-Synapsin-Synuclein WT, clone 1 à 5

kb : Marqueur 1 kb en pb

Trois bandes sont observées pour chacun des clones étudiés. Les bandes ont une taille calculée de 4070, 550 et 380 pb correspondant aux tailles théoriques de 4033, 574 et 387 pb.

Le clone 1 de chaque plasmide est utilisé pour l'amplification des plasmides pour la production virale (paragraphe 2.2.9.).

2.2.9. Clonage du mir-133b

2.2.9.1. Restriction du plasmide pAAV-CMV-FPmax

Le plasmide pAAV-CMV-FPmax est digéré avec les enzymes *Hind*III et *Bgl*II afin de le linéariser à la suite du gène FPmax.

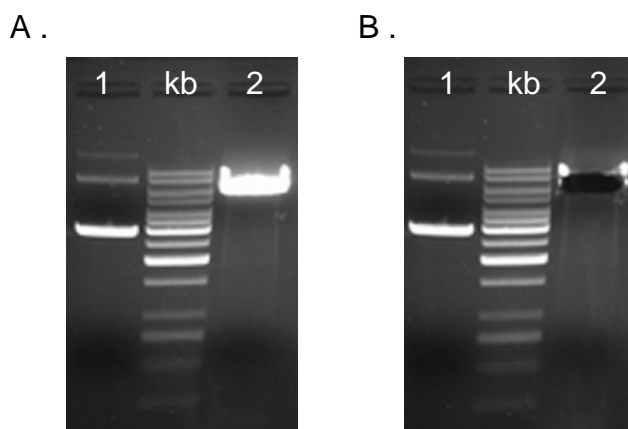


Figure 40 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % du plasmide pAAV-CMV-FPmax après restriction avec *Hind*III et *Bgl*II

A. Gel avant l'isolation du fragment

1 : pAAV-CMV-FPmax non digéré ; **2** : pAAV-CMV-FPmax digéré

B. Gel après l'isolation du fragment

1 : pAAV-CMV-FPmax non digéré ; **2** : pAAV-CMV-FPmax digéré

kb : Marqueur 1 kb en pb

Une seule bande est visible après la restriction du plasmide. La digestion a permis de linéariser le plasmide, par comparaison avec le plasmide non digéré qui présente trois bandes correspondant aux différentes formes enroulées du plasmide. La deuxième partie de la figure montre la bande extraite du gel correspondant au plasmide linéaire.

2.2.9.2. Ligation

Deux méthodes sont employées pour la ligation du mir-133b dans le plasmide pAAV-CMV-FPmax. Pour la ligation en deux étapes : le produit de la première ligation, permettant de lier les deux copies double brin du mir-133b ensemble (Fig. 15), est contrôlé par migration sur gel d'électrophorèse.

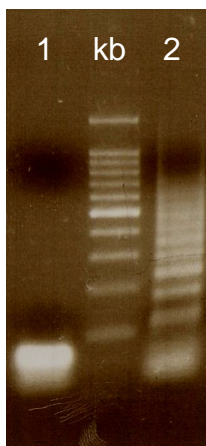


Figure 41 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % du produit de ligation du 4 × mir-133b

1 : contrôle négatif ; *2* : ligation mir 133b

kb : Marqueur 1 kb en pb

Le contrôle négatif (mélange de réaction mais sans l'enzyme) donne une seule bande inférieure à 100 pb correspondant aux oligos. La ligation entre les oligos (Fig. 41. 2) donne une multitude de bande. Ce modèle de bande montre l'efficacité de la ligation.

Les différentes ligations (en 1 ou 2 étapes) sont ensuite utilisées pour transformer des bactéries DH10B.

2.2.9.3. Transformation

La transformation a pour but d'intégrer les différents produits de ligation aux cellules *E.coli* DH10B. Les vecteurs désirés possèdent une résistance à l'ampicilline, induisant la sélection des cellules transformées. Les bactéries électrocompétentes sont transformées par électroporation.

Tableau 17 : Paramètres d'électroporation et nombre de colonies obtenues sur plaque NA + Amp pour chaque électroporation testée

Nom du tube	Paramètres d'électroporation			Volume étalé sur plaque [μl]	Nombre de colonies
	Voltage [kV]	Capacité [μF]	Temps [ms]		
Contrôle négatif	1.70	25	4.48	100	0
Ligation 1 étape	1.70	25	4.08	100	24
				100	23
				concentré	118
Ligation 2 étapes	1.70	25	3.86	100	35
				100	43
				concentré	128
Ligation 2 étapes (1 : 3)	1.70	25	3.90	100	49
				100	58
				concentré	251

Chaque essai possède un temps d'impulsion convenable par rapport au temps idéal de 5 ms.

Le contrôle négatif ne présente pas de colonies sur les plaques contenant de l'ampicilline car les bactéries utilisées ne sont naturellement pas résistantes à cet antibiotique.

Pour chaque essai, 3 volumes de bactéries transformées sont étalés. Les deux étalements avec le même volume, pour un échantillon, présente un nombre proche de colonies (maximum 9 colonies de différence). Le nombre de colonies est supérieur lors de l'étalement d'une plus grande quantité de bactéries.

Quatre clones de chaque essai sont contrôlés par restriction afin de vérifier si les clones possèdent ou non le mir-133b.

2.2.9.4. Contrôle des clones par restriction

L'ADN des différents clones est extrait des minicultures selon la deuxième méthode d'extraction de plasmide (point 2.1.2.2.). L'ADN est ensuite digéré avec les enzymes *EcoRI* et *NotI*.

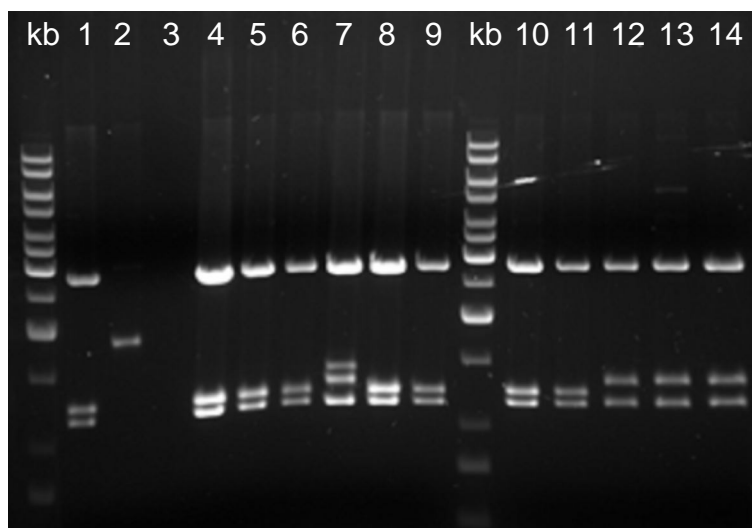


Figure 42 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % des clones pAAV-CMV-FPmax-mir-133b obtenus après restriction avec *EcoRI* et *NotI*

1-4 : clone 1 à 4 obtenu à partir de la ligation en 2 étape (1 :1) ; **5** : pAAV-CMV-FPmax ; **6-9** : clone 1 à 4 obtenu à partir de la ligation en 2 étape (1 :3) ; **10** : pAAV-CMV-FPmax ; **11-14** : clone 1 à 4 obtenu à partir de la ligation en 1 étape

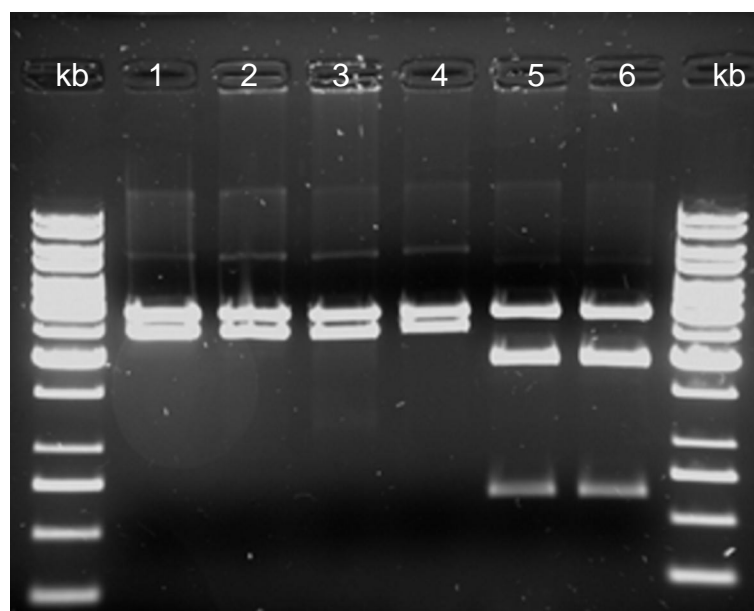
kb : Marqueur 1 kb en pb

La piste 3 de la figure 42 ne montre pas de bande. L'ADN de ce clone n'a pas pu être correctement extrait car les cellules n'ont pas poussées lors de la mise en culture pour la miniprep. Les pistes 2 et 7 montrent des bandes différentes des autres pistes.

Les pistes 1, 4, 6, 8, 9 et 11 montrent 3 bandes, de tailles 2870, 1250 et 1180 pb (calculées), identiques à celles du pAAV-CMV-FPmax ne contenant pas le mir (2887, 1261 et 1183 pb en théorie).

Les clones des pistes 12, 13 et 14 présentent 3 bandes de tailles 2870, 1360 et 1180 pb (calculées) correspondant à l'insertion du mir soit en théorie 2887, 1347 et 1183 pb.

Une deuxième restriction est effectuée afin de confirmer le résultat précédent. Ainsi, les 4 clones obtenus avec la ligation en 1 étape, ainsi que le deuxième clone obtenu à partir de la ligation en 2 étapes (1 :3) sont digérés avec les enzymes *SalI* et *NotI*.



*Figure 43 : Gel d'électrophorèse d'agarose 1 % des clones pAAV-CMV-FPmax-mir-133b obtenus après restriction avec *Sall* et *NotI**

1 : pAAV-CMV-FPmax ; 2 : clone 2 obtenu à partir de la ligation en 2 étape (1 :3) ; 3-6 : clone 1 à 4 obtenu à partir de la ligation en 1 étape

kb : Marqueur 1 kb en pb

Le plasmide pAAV-CMV-FPmax ne possède pas le site de restriction pour *SaII* à l'inverse de l'insert mir-133b. Ainsi, les clones ayant l'insert doivent montrer la présence de trois bandes sur gel d'agarose.

Seul les clones situés sur les pistes 5 et 6 de la figure 43 présentent 3 bandes de tailles 2900, 2050 et 690 pb (calculées) correspondant à la théorie (2887, 1905 et 625 pb). Les autres clones possèdent 2 bandes de tailles 2900 et 255 pb (calculées) correspondant au plasmide sans l'insert (2887 et 2444 pb en théorie).

Le deuxième clone issu de la ligation en 1 étape (piste 12 figure 42 et piste 4 figure 43) ne possède pas l'insert.

Le clone 3 est utilisé pour l'amplification du plasmide.

2.2.10. Amplification des vecteurs pour la production virale

Le clone 1 pour les plasmides pAAV-Synapsin-FPmax, pAAV-Prion-FPmax, pAAV-Synapsin-Synuclein A30P et pAAV-Synapsin-Synuclein WT, le clone 2 pour pAAV-NSE-FPmax et le clone 3 pour pAAV-CMV-FPmax-mir-133b sont mis en culture dans du milieu TB pour la maxiculture. La concentration en ADN obtenue après extraction de l'ADN plasmidique est déterminée par mesure de l'absorbance à l'aide du NanoDrop.

Tableau 16 : Mesures de l'absorbance pour la détermination de la concentration en ADN des différentes maxipreps. L'ADN est extrait à partir de culture avec 100 µg/ml d'ampicilline ou 100 µg/ml de carbenicilline (valeur soulignée)

Plasmide	Absorbance 260 nm [-]	Absorbance $\frac{260}{230}$ [-]	Absorbance $\frac{260}{280}$ [-]	Concentration [ng/µl]
pAAV-Synapsin-FPmax	21.447	2.24	1.91	1072.4
	11.307	2.23	1.94	565.35
	12.723	2.25	1.95	304.83
	18.975	2.02	1.86	948.74
	24.509	1.89	1.89	<u>1225.43</u>
pAAV-Prion-FPmax	13.363	2.20	1.89	668.1
	26.980	2.27	1.97	1348.9
	50.591	2.26	1.94	2529.57
pAAV –NSE-FPmax	64.003	2.19	1.95	3200.1
	72.584	2.21	1.94	3629.2
pAAV-Synapsin-Synuclein A30P	13.003	2.19	1.89	650.2
	10.240	2.28	1.96	512.01
	12.723	2.01	1.89	636.13
pAAV – Synapsin-Synuclein WT	19.713	2.27	1.91	985.7
pAAV-CMV-FPmax-mir-133b	31.888	2.31	1.91	1594.4
	37.374	2.30	1.89	1868.7

Les résultats des rapports d'absorbance ne montrent pas de contamination dans les échantillons d'ADN.

Les différents plasmides sont contrôlés par restriction comme lors du contrôle de l'ADN issu des minipreps. Les gels obtenus présentent les bonnes bandes de bonnes tailles pour chacun des plasmides.

2.2.11. Séquençage des gènes insérés dans les plasmides de type pAAV

Les séquences des gènes insérés, FPmax, mir-133b, synucléine ou synucléine A30P, sont contrôlées par séquençage (Microsynth). Le laboratoire possède déjà des amorces permettant d'effectuer le séquençage d'un gène inséré au niveau du MCS. L'amorce « Betaglob fw » se situe sur l'intron globine et se dirige en 3' vers le MCS.

Le séquençage du mir-133b se fait avec l'amorce « hGH_rev » qui se situe au niveau du polyA et qui descend en 5' en direction du MCS.

Les séquences obtenues sont analysées avec le programme informatique Finch TV (version 1.4.0, Geopiza Inc.) puis comparées aux séquences théoriques à l'aide du programme informatique BLAST (bl2seq, National Center for Biotechnology Information).

Les alignements entre les séquences théoriques des inserts des plasmides pAAV-Synapsin-FPmax, pAAV-Prion-FPmax, pAAV-NSE-FPmax et pAAV-CMV-FPmax-mir-133b et celles obtenues lors des séquençages donnent tous un alignement de 100 % des paires de base.

3. EXPRESSION ET SPECIFICITE DES VIRUS

3.1. Matériel et méthodes

3.1.1. Matériel

Cellules

HEK-293T
AAV293

numéro ATCC : CRL-1573™
Stratagene, La Jolla (USA), N° # 240073

Animaux

24 Rats Wistar

Charles River, l'Arbresle (France)

Milieux et compléments de cultures

DMEM + GlutaMAX™-I	Invitrogen, Bâle (Suisse), Gibco® N° 32430-027
Neurobasal	Invitrogen, Bâle (Suisse), Gibco® N° 21103-049
B-27 Supplement	Invitrogen, Bâle (Suisse), Gibco® N° 17504-044
L-Glutamine 200 mM	Invitrogen, Bâle (Suisse), Gibco® N° 25030-024
Pénicilline / Streptomycine	Invitrogen, Bâle (Suisse), Gibco® N° 15140-122
Poly-D-lysine 1mg/ml	Chemicon International, Temecula (USA), # A003E
Sérum de cheval (HS), Amimed®	Bioconcept, Allschwil (Suisse), N°2-05F00-I
Sérum bovin foetal (FBS)	Invitrogen, Bâle (Suisse), Gibco® N° 10101-145
Système de filtration sous-vide, 0.22 µm	Techno Plastic Products AG, Trasadingen (Suisse), N° 99500

Kit extraction

Kit NucleoSpin® Tissue

Macherey-Nagel, Oensingen (Suisse), N° 740609.50

PCR quantitative

Amorces :

β-globin intron forward
β-globin intron reverse
albumin forward
albumin reverse

Solutions :

FullVelocity™ SYBR Green
QPCR Master Mix

Stratagene, La Jolla (USA), N° 600581

Matériel :

Tube optical

Immunologie

Anticorps primaire :

Polyclonal Rabbit	DakoCytomation, Glostrup (Danemark), N° Z0334
Anti Glial Fibrillary Acidic	
MAB378 Ms × MAP2 a & b	Chemicon International, Temecula (USA), N° CA 92590
Anti-turboGFP	Evrogen, Moscou (Russie), N° # AB511
Ms X Tyrosine hydroxylase	Chemicon International, Temecula (USA), N° MAB318

Anticorps secondaire :

Conjugated Affinity Donkey (Cy3)	Jackson ImmunoResearch, West Grove (USA),
anti-mouse IgG (H+L)	N° 715.165.151
Alexa Fluor® 488 Donkey (AF488)	Invitrogen, Molecular Probes, Oregon (USA)
anti-rabbit IgG (H+L)	N° A21206

Solutions :

Acétone	Merck, Darmstadt (Allemagne), N° 1.00014.2500
Albumine de sérum bovin (BSA)	Fluka Chemie GmbH, Buchs (Suisse), N° 05484
Buffer Substance Dulbecco's (PBS)	Serva Electrophoresis, Heidelberg (Allemagne), N° 47302
DAPI	Sigma-Aldrich, Steinheim (Allemagne), N° D9542-5
Méthanol	Merck, Darmstadt (Allemagne), N° 1.06009.2500
Sérum normal d'âne	Jackson Immuno Research, Baltimore (USA),
	N° 017-000-021
Triton X-100	Fluka Chemie GmbH, Buchs (Suisse), N° 93420
Solutions de montage :	
Vectashield®	Vector Laboratories, Burlingame (USA), N° H-1200
Mowiol®	EMD Chemicals, Gibbstown (USA), Calbiochem N° 475904

Matériel & Appareils

Agitateur :	
IKA® KS 130 basic	IKA-Werke GmbH&Co.KG, Staufen (Allemagne)
Microtome :	
Leica SM2400	Leica microsystems, Nussloch (Allemagne)
Centrifugeuse :	
Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau (Allemagne)
Incubateurs :	
Hera Cell	Heraeus Instruments GmbH, Hanau (Allemagne)
Thermocycleur :	
Real Time Cycler	
Rotor Gene 2000	Corbett research, Mortlake (Australie)

3.1.2. Méthodes

3.1.2.1. Transfection par précipitation au phosphate de calcium

Les cellules HEK 293T sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté de 10 % FBS et 1 % Pen/Strep

- Diviser une culture de cellules 293T en phase exponentielle afin d'obtenir ~ 300000 cellules par puits pour une plaque de 6 puits
- 24 heures après, préparer le précipité
 - Préparer une solution contenant :
25 µl CaCl₂
3 µg ADN
 - Compléter avec d.H₂O stérile pour obtenir un volume de 100 µl
 - Ajouter goutte à goutte en vortexant 50 µl de HBS 2 ×
 - Incuber 10 min à température ambiante
- Distribuer 100 µl de précipité par puits
- Incuber 6 h
- Changer le milieu
- Observer les cellules au microscope

3.1.2.2. Production virale

La production des virus à partir des plasmides pAAV construits dans la première partie de ce travail est exécutée par Vivianne Padrun et Fabienne Pidoux.

3.1.2.3. Titration des virus

Les cellules HEK 293T sont cultivées dans du milieu DMEM supplémenté de 10 % FBS et 5 % Pen/Strep

Jour 0 : Préparation des cultures

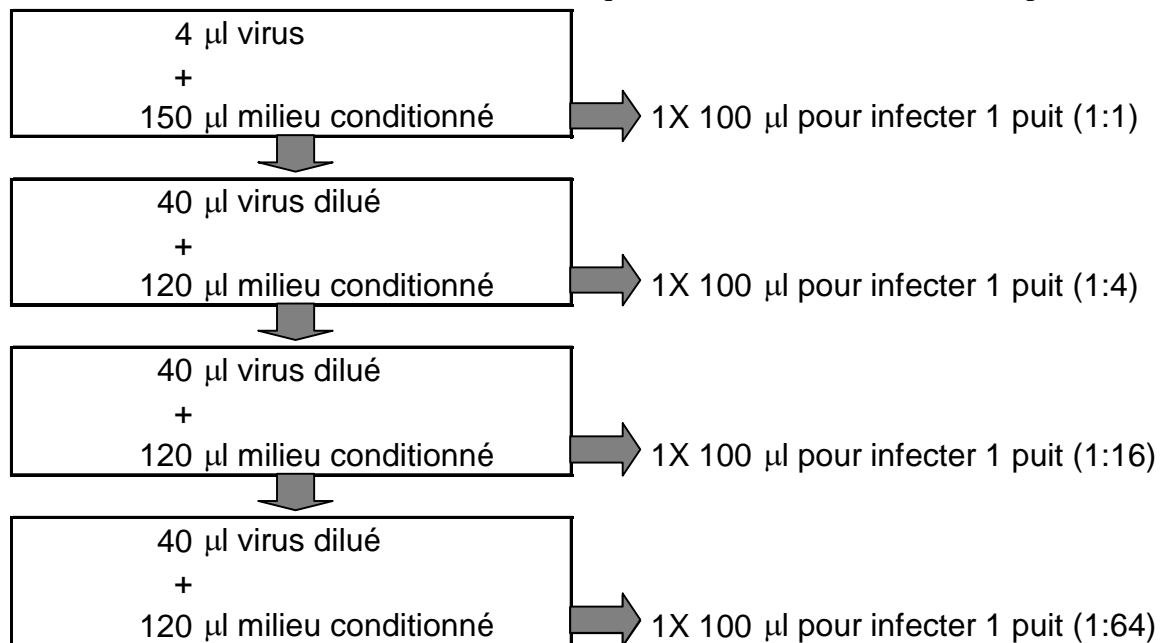
- Préparer les cultures de 293T pour l'infection
 - Préparer des plaques de 6 puits avec 300 000 cellules/puits
- ☞ Quatre puits par virus à titrer, 1 puits pour le contrôle négatif et 4 puits pour le virus de référence (virus titré par cytométrie de flux)

Jour 1 : Infection des cultures

- Infecter les cultures avec les virus AAV produits
 - Diminuer le volume de milieu de culture à 1 ml pour chaque puits

- ☞ Garder le surplus de milieu conditionné pour la dilution des virus

- ☞ Réaliser les 4 dilutions suivantes de chaque virus (virus de référence compris):



- ☞ Infester les cellules

- ☞ Garder un puits non infecté comme contrôle négatif

Jour 2 : 24 heures après l'infection

- ☞ Ajouter 1 ml de milieu de culture frais à chaque puits

Jour 3 : 48 heures après l'infection

- ☞ Récolte des cellules

Pour chaque puits :

- ☞ Aspirer le milieu
- ☞ Ajouter 1 ml de PBS froid sans Ca&Mg
- ☞ Les cellules se détachent facilement
- ☞ Récupérer les cellules dans un tube Eppendorf
- ☞ Centrifuger 5 min à 2500 g
- ☞ Resuspendre les cellules dans 50 µl de PBS
- ☞ Vortexer pour bien dissocier le culot
- ☞ Ajouter 10 µl de RNase A 20 mg/ml

- ☞ Lyse des cellules, d'après le protocole du Kit Nucleospin tissue DNA extraction (Macherey-Nagel)

Pour chaque microtube :

- ☞ Ajouter 150 µl de tampon T1
- ☞ Ajouter 25 µl de Proteinase K

- Ajouter 200 µl de tampon de lyse B3
- Vortexer
- Préchauffer de l'eau distillée à 70 °C pour l'élution
- Ajouter 210 µl d'EtOH 100 %
- Vortexer
- Charger la totalité du volume sur colonne (environ 640 µl)
- Centrifuger 1 min à 11000 g
- Vider le tube collecteur
- Ajouter 500 µl de tampon BW
- Centrifuger 1 min à 11000 g
- Vider le tube collecteur
- Ajouter 600 µl de tampon B5
- Centrifuger 1 min à 11000 g
- Vider le tube collecteur
- Centrifuger 1 min à 11000 g
- Eluer l'ADN dans un nouveau microtube avec 100 µl d.H₂O préchauffé à 70 °C
- Contrôler la concentration en ADN, à l'aide du NanoDrop, de quelques échantillons
- La concentration en ADN est en général comprise entre 50 et 100 ng/ml
- Stocker à 4 °C

Jour 3 : Digestion à la nucléase S1

- Diluer la solution stock de Nucléase S1 [95 U/µl] 10 fois à l'aide du tampon 10 × de la Nucléase
- Pour chaque échantillon :
 - 50 µl ADN
 - 5.50 µl Tampon 10 ×
 - 0.32 µl Nucléase S1 dilué 10 × (soit 2.7 U/50µl)
- Préparer 1 contrôle sans S1 nucléase soit les 4 dilutions d'un virus
 - 30 µl ADN
 - 3.30 µl Tampon 10 ×
- Incuber 30 min à 37 °C
- Inactiver 15 min à 97 °C
- Centrifuger et stocker à -20 °C

Purification

La purification s'effectue à l'aide du Kit Nucleospin tissue DNA extraction (Macherey-Nagel)

- Ajouter 150 µl de tampon T1
- Ajouter 200 µl de tampon de lyse B3
- Préchauffer du tampon BE à 70 °C pour l'élution
- Ajouter 210 µl d'EtOH 100 %

- Vortexer
- Charger la totalité du volume sur colonne (environ 640 µl)
- Centrifuger 1 min à 11000 g
- Vider le tube collecteur
- Ajouter 500 µl de tampon BW
- Centrifuger 1 min à 11000 g
- Vider le tube collecteur
- Ajouter 600 µl de tampon B5
- Centrifuger 1 min à 11000 g
- Vider le tube collecteur
- Centrifuger 1 min à 11000 g
- Eluer l'ADN dans un nouveau microtube avec 100 µl de tampon BE préchauffé à 70 °C
- Mesurer la concentration en ADN, à l'aide du NanoDrop
- ☞ La concentration en ADN est en général comprise entre 20 et 40 ng/ml
- Stocker à 4 °C

PCR quantitative

- Diluer les échantillons afin d'obtenir une concentration comprise entre 5 et 10 ng/µl
- Préparer les masters mixés (MM) suivants (chaque échantillon est préparé à double + marge) :

Volume par échantillon pour la PCR β-globin :

0.24 µl Primer β-globin FW [10 µM]	
0.24 µl Primer β-globin RV [10 µM]	
12 µl SyBr	
9.52 µl d.H ₂ O	
<hr/>	
22 µl	

Volume par échantillon pour la PCR albumin :

2.4 µl Primer β-globin FW [10 µM]	
2.4 µl Primer β-globin RV [10 µM]	
12 µl SyBr	
5.2 µl d.H ₂ O	
<hr/>	
22 µl	

- Mélanger chaque échantillon et le MM :

4.4 µl échantillon
 48.4µl MM

 52.8 µl
- Mettre 2 × 2 µl du mélange dans 2 tube optical (duplicat)
- Faire amplifier les réactions séparément sur le thermocycleur avec les paramètres suivants :

<i>Préchauffage :</i>		Temps 600 s	Température 95 °C
<i>Cycles 1-40 :</i>	Dénaturation	20 s	95 °C
	Annealing	30 s	59 °C

Mesure de la fluorescence : de 55 °C à 90 °C
15 s au début, et 11 s pour chaque étape avec une augmentation de 0.5 °C par étape

3.1.2.4. Co-culture primaire de neurones et de cellules gliales

1. Préparation des plaques de cultures

La veille préparer les plaques de 24 puits :

- Ajouter 300 µl de Poly-D-lysine 50 µg/ml (stocké à -20 °C)
- Laisser incuber o/n dans l'incubateur à 37 °C, 5 % CO₂

Le jour de la mise en culture :

- Récupérer la Poly-D-lysine dans un tube Falcon de 50 ml (peut-être réutilisé 3 fois)
- Laver 3 fois les puits avec de l'eau stérile
- Rincer les puits avec 300 µl de milieu de culture (le milieu est laissé dans les puits jusqu'à la mise en culture des cellules)

2. Microdissection

- Sacrifier les souris gestantes par dislocation cervicale
- Récupérer les embryons (E16) et les déposer sur une plaque de culture de 10 cm de Ø sur glace contenant du milieu de culture
- Disposer un embryon sur une plaque de culture de 6 cm de Ø contenant du milieu de culture
- Sous la loupe binoculaire, extraire le cerveau de l'embryon
- Transférer le cerveau dans une plaque de culture de 3.5 cm de Ø contenant du milieu de culture
- Disséquer la structure d'intérêt et la transférer dans une plaque de culture de 3.5 cm de Ø sur glace contenant du milieu de culture

3. Isolation des cellules

- Transférer les fragments disséqués dans un tube Falcon de 15 ml et ajuster à 4 ml avec du milieu de culture
- Isoler les cellules par trituration à l'aide d'une pipette de 1000 µl

!! Éviter toute formation de bulles !

- Incuber sur glace pendant 3 min
- Prélever 2 ml de surnageant et les transférer dans un nouveau tube Falcon sur glace
- Ajouter 2 ml de milieu au tube contenant le culot de cellules et triturer de nouveau
- Procéder comme précédemment jusqu'à ce que le culot ne soit plus visible
- Rassembler les deux tubes
- Centrifuger à 1500 g pendant 2 min, à 4 °C
- Jeter le surnageant et re-suspendre dans un volume adéquat de milieu de culture

(~ 20 µl de milieu par embryon pour le striatum et 100 µl de milieu pour le cortex)

4. Comptage des cellules

- Diluer 4 fois la suspension de cellules
 - 3 µl de cellules
 - 3 µl de milieu
 - 6 µl de Bleu de Trypan 0.4 %
- Compter les cellules vivantes et les cellules mortes sur chaque grand carré à l'aide d'une chambre à compter de type Neubauer
- Effectuer la moyenne par carré

[Cellules] = nombre de cellules × dilution × 10 000 = [Cellules / ml]

5. Mise en culture

- Enlever le milieu de culture utilisé pour rincer les plaques
- Ajouter 400 µl de milieu de culture par puits avec le nombre de cellules désirées pour les plaques de 24 puits (2 cm²)

Tableau 17 : Concentration et nombre de cellules correspondant par puits, pour une plaque de 24 puits

Concentration en cellules [cellules / mm ²]	Nombre de cellules par puits (plaque de 24 puits)
100	20000
250	50000
300	60000
500	100000

6. Milieu de culture

Les milieux de culture sont complétés avec les solutions suivantes :

Tableau 18 : Compléments pour les milieux de culture

Solutions	Concentration stock	Concentration finale	Pour 500 ml de milieu
Glutamine	200 mM	500 µM	1.25 ml
Pen/Strep	10 000 U/ml	10 U/ml	500 µl

3.1.2.5. Immunologie sur les cultures

- Fixation des cultures
 - Aspirer le milieu de culture
 - Ajouter 400 µl de PAF 2 % par puits
 - Incuber 40 min à température ambiante
 - Aspirer le PAF
 - Ajouter 400 µl de solution à 4 °C de méthanol/acétone (1:1) par puits
- ☞ Perméabilise et fixer le cytosquelette
 - Incuber 10 min à 4 °C
 - Aspirer la solution
 - Laver les puits 3 × avec du PBS
- Marquage des cellules
- ☞ Effectuer l'ensemble des étapes en recouvrant la plaque de papier aluminium lors de la détection de la fluorescence directe de FPmax.
 - Ajouter 400 µl de solution PBS contenant 10 % de NDS et 0.1 % de triton par puits
 - Incuber 1 h à température ambiante
 - Aspirer la solution
 - Ajouter 300 µl d'anticorps primaires dilués dans du PBS contenant 1 % de BSA
 - Incuber o/n à 4 °C
 - Laver les puits 2 × 15 min avec du PBS
 - Ajouter 300 µl d'anticorps secondaires dilués dans du PBS contenant 1 % de NDS
 - Incuber 2 h à température ambiante à l'abri de la lumière
- ☞ L'ensemble des étapes suivantes s'effectue en recouvrant la plaque de papier aluminium
 - Laver les puits 3 × 5 min avec du PBS
 - Ajouter 250 µl de DAPI par puits
 - Incuber 5 min à température ambiante
 - Aspirer la solution
 - Laver les puits 3 × 5 min avec du PBS
 - Aspirer le PBS
 - Ajouter ~ 15 µl de Vectashield au centre de chaque puits
 - Déposer une lamelle

Anticorps primaire :

Polyclonal Rabbit Anti Glial Fibrillary Acidic, dilution 1 / 1000

MAB378 Ms × MAP2 a & b, dilution 1 / 500

Anti-turboGFP, dilution 1 / 25000

Anticorps secondaire :

Conjugated Affinity Donkey (Cy3) anti-mouse IgG (H+L), dilution 1 / 1000

Alexa Fluor® 488 Donkey (AF488) anti-rabbit IgG (H+L), dilution 1 / 500

3.1.2.6. Injection stéréotaxique et perfusion

Les injections stéréotaxiques dans la substance noire chez le rat ainsi que les perfusions sont effectuées par Philippe Colin.

Tableau 19 : Récapitulatif des injections effectuées chez le rat

Nombre d'animaux	Virus injecté	Type d'injection	Durée de l'infection
3	pAAV-CMV-FPmax	bilatérale	3 semaines
4	pAAV-Prion-FPmax	bilatérale	3 semaines
3	pAAV-NSE-FPmax	bilatérale	3 semaines
5	pAAV-Synapsin-FPmax	bilatérale	2 semaines
2	pAAV-CMV-FPmax	bilatérale	2 semaines
2	pAAV-CMV-FPmax	unilatérale	2 semaines
5	pAAV-CMV-FPmax-mir-133b	unilatérale	2 semaines















Les protocoles du laboratoire sont ajoutés en annexes.

3.1.2.7. Coupe des cerveaux de rat

Les différents cerveaux sont coupés en tranche au microtome à 40 µm d'épaisseur. Les coupes sont récupérées dans l'ordre dans des plaques de 96 puits contenant du PBS / Azide et stocké à 4 °C.

3.1.2.8. Immunologie sur les coupes flottantes des cerveaux de rat

Une colonne par plaque, soit 1 cerveau, soit 8 coupes espacées chacune de 480 μm , sont mises ensemble dans un puits d'une plaque de 12 puits contenant du PBS.

-  Ajouter 1 ml de solution PBS + 10 % NDS + 0.1 % Triton
-  Incuber 2 à 4 h à température ambiante
-  Aspirer la solution
-  Ajouter 1 ml d'anticorps primaires dilués dans du PBS
-  Incuber o/n à 4 °C
-  Laver les puits 3 \times 10 min avec 2 ml de PBS
-  Ajouter 1 ml d'anticorps secondaires dilués dans du PBS contenant 1 % de NDS + 0.1 % Triton
-  Incuber 2 h à température ambiante à l'abri de la lumière
-  L'ensemble des étapes suivantes s'effectue en recouvrant la plaque de papier aluminium
 -  Laver les puits 3 \times 10 min avec 2 ml de PBS
 -  Monter les coupes sur une lamelle
 -  Laisser sécher à température ambiante
 -  Ajouter ~ 150 μl de Mowiol
 -  Déposer une lamelle

Anticorps primaire :

Polyclonal Rabbit Anti Glial Fibrillary Acidic (GFAP), dilution 1 / 1000

Tyrosine hydroxylase (TH), dilution 1 / 400

Anti-turboGFP, dilution 1 / 12000

Anticorps secondaire :

Conjugated Affinity Donkey (Cy3) anti-mouse IgG (H+L), dilution 1 / 1000

Alexa Fluor[®] 488 Donkey (AF488) anti-rabbit IgG (H+L), dilution 1 / 500

3.2. Résultats

3.2.1. Expression du FPmax dans les cellules HEK 293T

La transfection au phosphate de calcium a pour but d'intégrer un plasmide aux cellules HEK 293T (cellules cancéreuses d'embryon de reins). Les cellules sont transfectées avec différents plasmides. Un contrôle positif de la transfection est réalisé à l'aide du vecteur pAAV-CMV-FPmax. Les cellules transfectées sont observées au microscope inversé.

Une excitation de la protéine FPmax à 482 nm permet une observation de celle-ci à sa longueur d'onde d'émission de 502 nm.

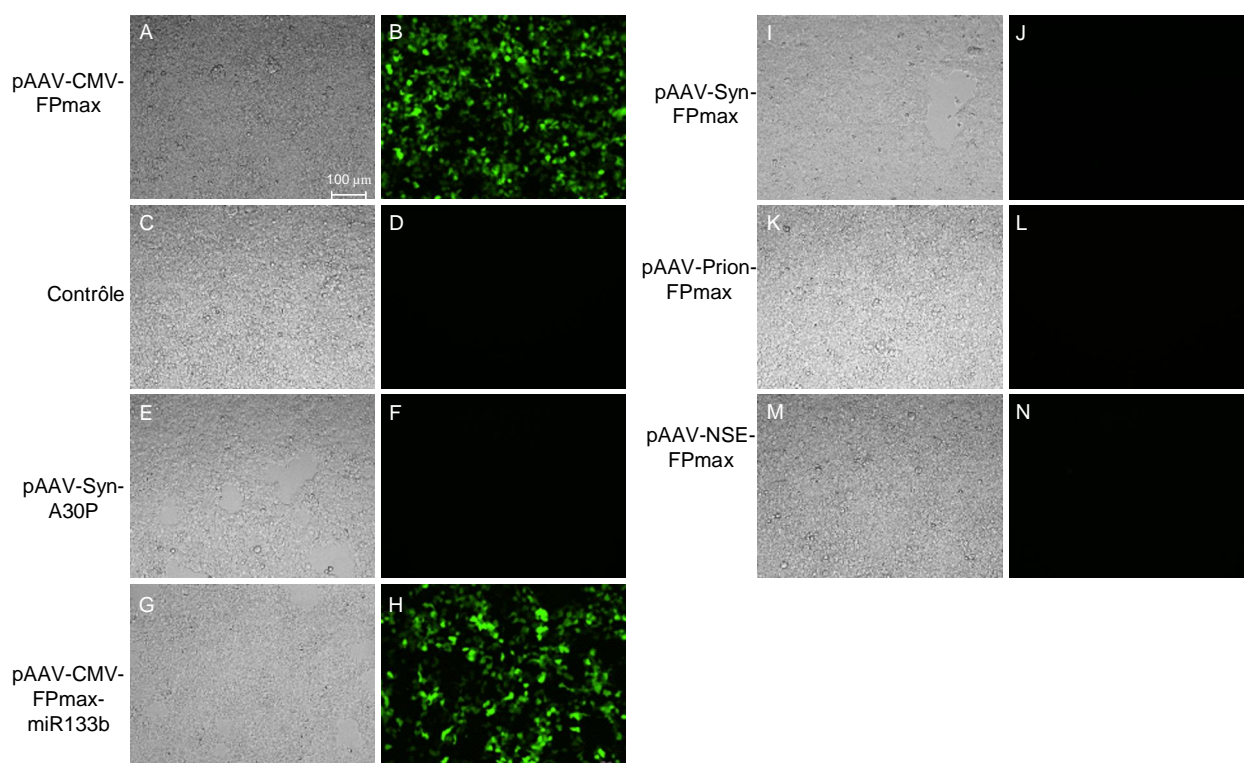


Figure 44 : Expression de la protéine FPmax, 24 h après la transfection au phosphate de calcium des cellules HEK 293T, avec les différents plasmides

A, C, E, G, I, K et M : contraste de phase

B, D, F, H, J, L et N : fluorescence directe du FPmax

Echelle : 100 μm (identique pour l'ensemble des figures)

Les cellules fluorescentes montrent les cellules qui expriment le FPmax. Les cellules HEK 293T transfectées avec le plasmide pAAV-CMV-FPmax et avec pAAV-CMV-FPmax-mir-133b sont les seules cellules à exprimer le FPmax. Ce contrôle permet de vérifier le bon fonctionnement de la transfection. Le nombre de cellules transfectées est d'environ 30 %.

Les autres transfections ne présentent pas de fluorescence soulignant l'absence d'expression de FPmax. Les promoteurs neurospécifiques ne permettent pas l'expression dans ce type cellulaire. Par contre, cette expérience ne permet pas de contrôler l'efficacité des constructions. Ainsi, l'étape de production virale est obligatoire afin de vérifier l'expression de ces plasmides.

3.2.2. Production et titration des virus

Les virus AAV-Syn-FPmax, AAV-Prion-FPmax, AAV-NSE-FPmax et AAV-CMV-FPmax-mir-133b sont produits à partir des différents plasmides construits dans la première partie de cette étude. La production virale est réalisée, dans une salle de type P2, par les techniciennes du laboratoire : Vivianne Padrun et Fabienne Pidoux.

Les premières étapes de la titration des virus jusqu'à l'étape d'extraction de l'ADN (salle P2) ainsi que l'analyse des résultats de la PCR quantitative sont réalisées par Bernard Schneider.

La titration des virus est une titration relative par rapport à un virus de référence de titre connu (déterminé par FACS). Le titre de chaque virus a pour unité des unités de transduction par millilitre (Tus/ml).

Tableau 19 : Résultats obtenus pour les différentes titrations des virus par titration relative par PCR quantitative

Nom du virus	Titre du virus [TUs/ml]
AAV-Synapsin-FPmax	4.79×10^{10}
AAV-prion-FPmax	4.67×10^{10}
AAV-NSE-FPmax	3.59×10^{10}
AAV-CMV-FPmax-mir-133b	2.45×10^{10}

Le virus AAV-CMV-FPmax a déjà été produit par le laboratoire, son titre est de 4.83×10^{10} .

3.2.3. Optimisation des co-cultures primaires de cellules neuronales et gliales

Le modèle *in vitro* utilisé pour tester l'expression et la spécificité cellulaire des différents virus est mis au point avec l'aide de Delphine Charvin.

Le laboratoire développe des cultures primaires de neurones à partir d'hippocampe d'embryon de souris avec le milieu neurobasal complétement de B27. Pour ce projet, des co-cultures neurones et cellules gliales sont nécessaires. Plusieurs facteurs doivent être testés pour la réalisation de ces cultures : choix de la structure cérébrale disséquée, test de différents milieux de culture et optimisation de la densité cellulaire.

Les cultures sont réalisées à partir du cortex ou du striatum d'embryon de souris (stade E16) avec 2 concentrations de cellules (500 ou 100 cellules / mm²) et 6 milieux de culture (① DMEM, 10 % FBS, 10 % HS ; ② Neurobasal, 10 % FBS, 10 % HS ; ③ DMEM, 10 % FBS ; ④ Neurobasal ; 10 % HS ; ⑤ Neurobasal, 10 % FBS, 1 × B27 ; ⑥ Neurobasal, 10 % FBS, 0.5 × B27)

Les milieux de culture ②, ④ et ⑥ ne sont pas adaptés aux cultures. Afin de mieux comparer les trois milieux restants, un double marquage neuronal (anti-MAP2) et glial (anti-GFAP) est réalisé 5 jours après la mise en culture.

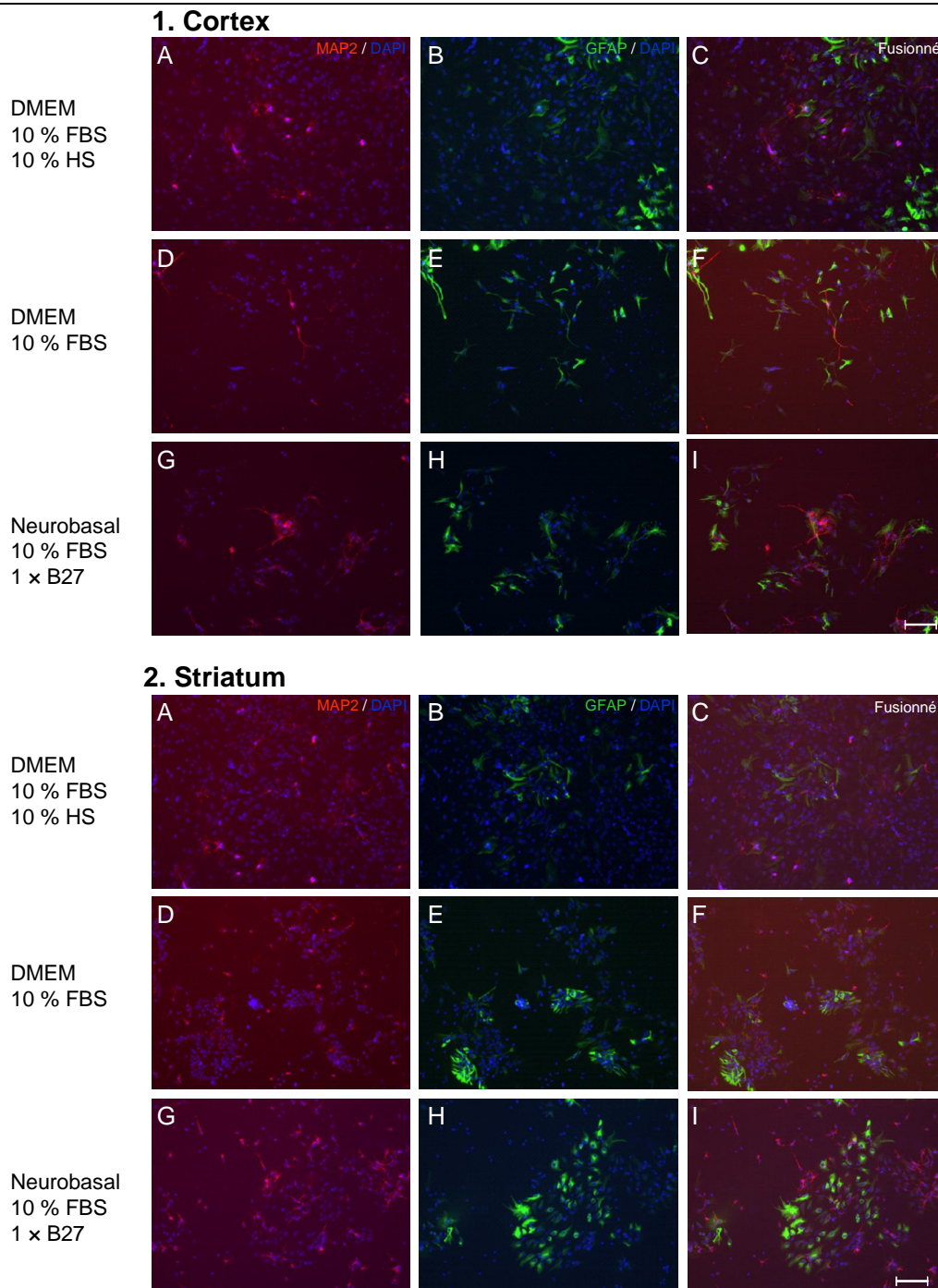


Figure 45 : Influence de différents milieux sur la croissance des co-cultures gliales et neuronales primaires au stade DIV5. Les co-cultures sont préparées à partir d'embryons de souris au stade E16. Elles sont ensuite fixées, marquées puis observées au microscope inversé

A, D et G : Marquage immunofluorescent pour les protéines II associées aux microtubules MAP2 et marquage nucléaire DAPI

B, E et H : Marquage immunofluorescent pour l'acide protéique fibrillaire glial GFAP et marquage nucléaire DAPI

C, F et I : Superposition des trois marquages

Echelle : 100 μ m (identique pour l'ensemble des figures)

Les cultures effectuées à partir du striatum présentent plus de neurones qu'à partir du cortex. Le milieu DMEM 10 % FBS et 10 % HS est le moins adapté à ce type de culture. Les deux milieux restants présentent les 2 types cellulaires dans une bonne proportion. Ceux-ci semblent adéquats pour les co-cultures désirées. Le milieu optimal utilisé pour la suite des cultures est composé de DMEM supplémenté de 10 % FBS, 500 μ M de glutamine et 10 U/ml d'antibiotiques (pen/strep).

Les images fusionnées montrent des noyaux cellulaires supplémentaires qui ne co-localisent pas avec les deux marquages effectués.

3.2.4. Essai d'infection des co-cultures primaires avec les différents virus

Un premier essai d'infection sur des co-cultures avec du milieu DMEM 10 % FBS, obtenues à partir du striatum d'embryon de souris (E16), est réalisée après 6 jours de culture.

L'infection est réalisée sans tenir compte des titres des virus. En effet, le même volume de virus soit 0.4 μ l ($\sim 1.7 \times 10^7$ TUs) sont ajoutés dans les 400 μ l de milieu de culture (puits de 2 cm^2).

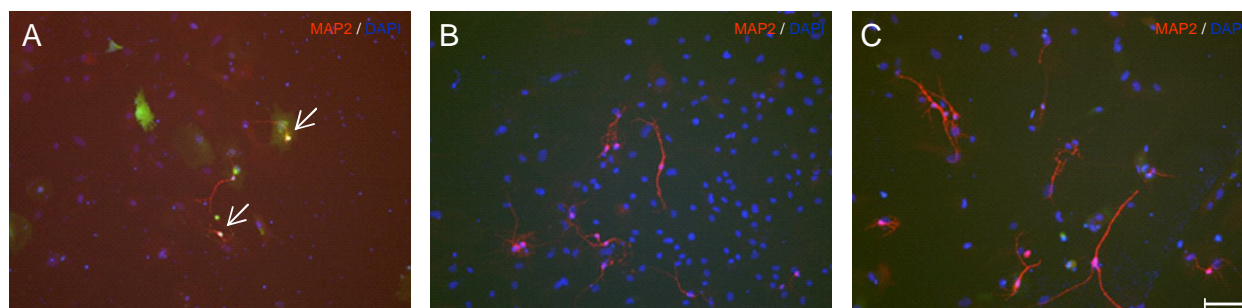


Figure 46 : Infection des co-culture gliales et neuronales primaires au stade DIV 6 avec différents virus. Les co-cultures sont préparées à partir d'embryon de souris au stade E16. Elles sont ensuite fixées au stade DIV 12, marquées par immunofluorescence pour les protéines 2 associées aux microtubules MAP2 et pour les noyaux DAPI puis observées au microscope inversé

A : Infection par le virus AAV-CMV-FPmax ; B : Infection par le virus AAV-Prion-FPmax ; C : Infection par le virus AAV-NSE-FPmax

Echelle : 100 μ m (identique pour l'ensemble des figures)

Le double marquage par immunofluorescence marque les neurones ainsi que les noyaux. L'expression de la protéine FPmax est, elle, observée en fluorescence directe. Suite à l'infection des co-cultures par les différents virus testés, seul le virus AAV-CMV-FPmax induit l'expression de la protéine FPmax au niveau des neurones (indiqué par des flèches au niveau de la Figure 46, A). L'infection par ce virus montre également un marquage des cellules gliales.

Afin d'améliorer l'observation de l'expression de la protéine FPmax, un marquage fluorescent à l'aide de l'anticorps anti-Turbo GFP dirigé contre la protéine FPmax est ensuite utilisé. Les co-cultures sont mises en culture sur des lamelles afin de pouvoir les observer à un plus fort grossissement. En effet, les cultures effectuées précédemment sont réalisées sur des plaques en plastique qui ne permettent pas l'observation avec l'objectif 20 × du microscope inversé. De plus, la quantité de virus ajoutée pour l'infection est augmentée.

3.2.5. Expression neuronale du FPmax *in vitro*

Afin d'observer l'expression de la protéine FPmax par les neurones, des cultures à 2 stades de maturation différents sont infectés par les différents virus.

3.2.5.1. Co-culture primaire non mature de cellules gliales et neuronales

Les co-cultures sont réalisées à partir du striatum d'embryon de souris (E16) dans du milieu DMEM 10 % FBS. Dix jours après la mise en culture, les cellules sont infectées avec les différents virus. L'infection est réalisée sans tenir compte des titres des virus. En effet, le même volume de virus soit 1 µl ($\sim 4.4 \times 10^{10}$ TUs) sont ajoutés dans les 400 µl de milieu de culture (puits de 2 cm²). Les cellules sont fixées, 8 jours après l'infection, et marquées par immunofluorescence.

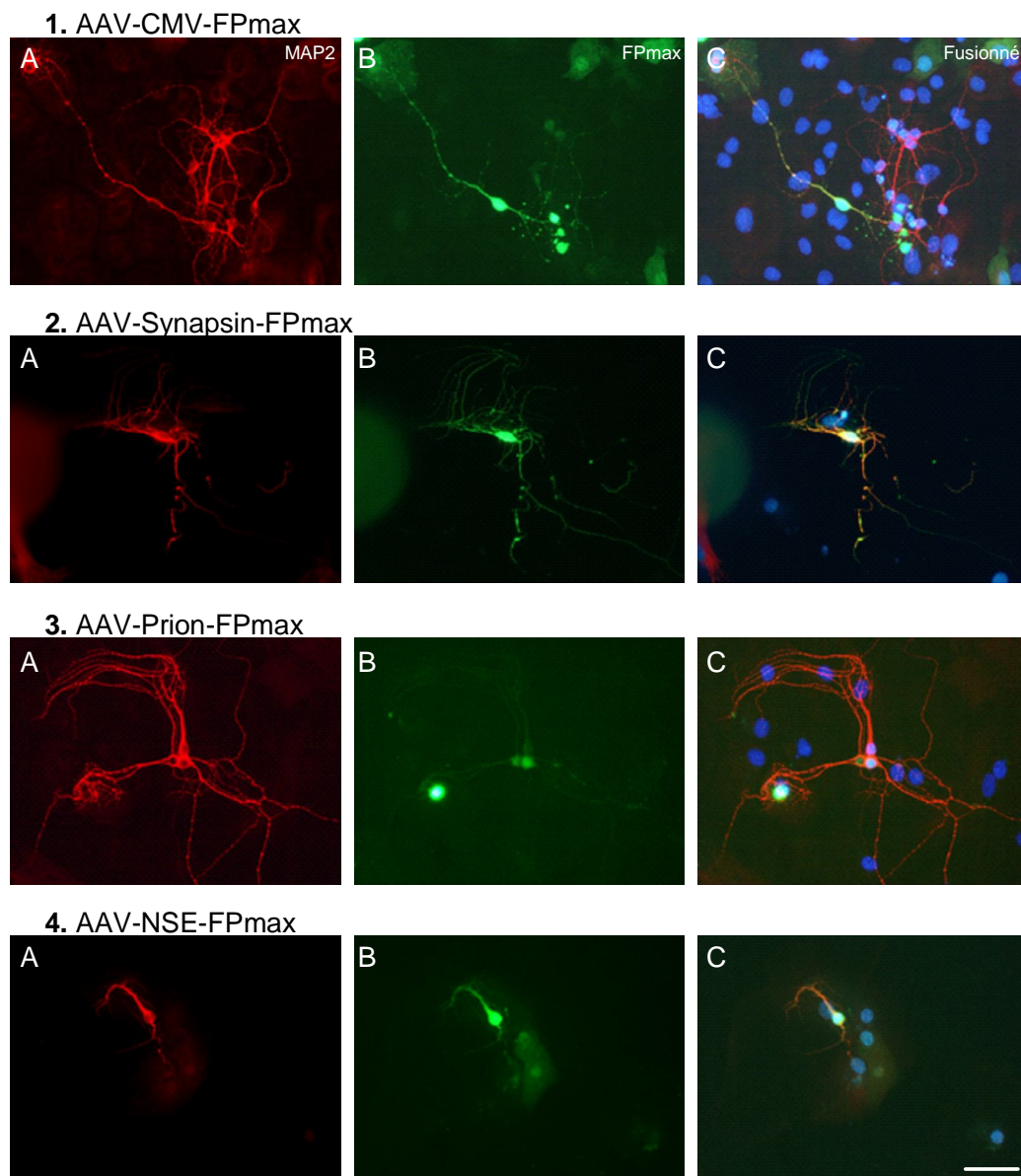


Figure 47 : Infection des co-cultures gliales et neuronales primaires au stade DIV 10 avec différents virus. Les co-cultures sont préparées à partir d'embryons de souris au stade E16. Elles sont ensuite fixées au stade DIV 18, marquées par immunofluorescence puis observées au microscope inversé

1 : Infection par le virus AAV-CMV-FPmax ; 2 : Infection par le virus AAV-Synapsin-FPmax ; 3 : Infection par le virus AAV-Prion-FPmax ; 4 : Infection par le virus AAV-NSE-FPmax

A : Marquage immunofluorescent pour les protéines II associées aux microtubules MAP2 ; B : Marquage immunofluorescent pour le FPmax ; C : Superposition des marquages MAP2, FPmax et nucléaire DAPI

Echelle : 50 μ m (identique pour l'ensemble des figures)

Le triple marquage fluorescent effectué permet de marquer les neurones en rouge (Figure 47, A), l'expression de la protéine FPmax en vert (Figure 47, B) et les noyaux en bleu (Figure 47, C). En augmentant la quantité de virus et le temps d'infection par rapport à l'essai précédent, les neurones expriment la protéine FPmax suite à l'infection par les virus contenant les promoteurs neurospécifiques comme le montre la fluorescence observée au niveau des cellules neuronales (Figure 47, B). Néanmoins, l'expression n'est pas observable sur l'ensemble des neurones comme le montrent certains neurones sur la figure 47, 1. De plus, certaines cellules MAP2 négatives expriment la protéine FPmax lors de l'infection avec les virus AAV-CMV-FPmax et AAV-NSE-FPmax.

3.2.5.2. Co-culture primaire mature de cellules gliales et neuronales

Un nouvel essai d'infection est réalisé sur des co-cultures de neurones matures. Ces co-cultures sont réalisées par Liliane Glauser à partir de l'hippocampe de rats nouveaux-nés. Vingt-neuf jours après la mise en culture, les cellules sont infectées avec les différents virus.

L'infection est réalisée sans tenir compte des titres des virus. En effet, le même volume de virus, soit 4 μl ($\sim 17.6 \times 10^{10}$ TUs), sont ajoutés dans les 1500 μl de milieu de culture (de 35 mm diamètre). Les cellules sont fixées, 8 jours après l'infection, et marquées par immunofluorescence.

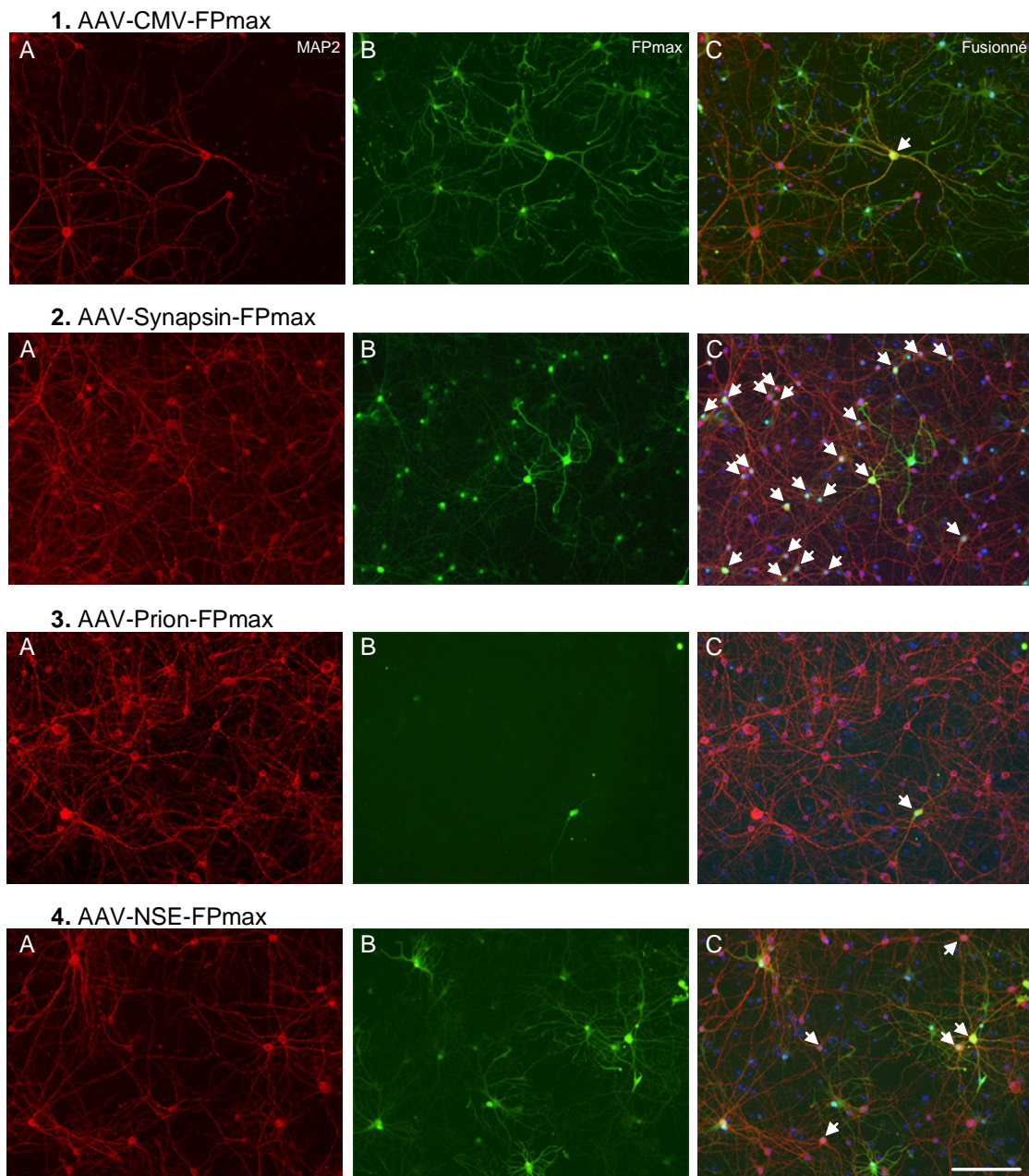


Figure 48 : Infection des co-culture gliales et neuronales primaires au stade DIV 29 avec différents virus. Les co-cultures sont préparées à partir de rats nouveaux-nés (P1). Elles sont ensuite fixées au stade DIV 37, marquées par immunofluorescence puis observées au microscope inversé

*1 : Infection par le virus AAV-CMV-FPmax ; 2 : Infection par le virus AAV-Synapsin-FPmax ; 3 : Infection par le virus AAV-Prion-FPmax ; 4 : Infection par le virus AAV-NSE-FPmax
A : Marquage immunofluorescent pour les protéines II associées aux microtubules MAP2 ; B : Marquage immunofluorescent pour le FPmax ; C : Superposition des marquages MAP2, FPmax et nucléaire DAPI*

Les flèches soulignent les neurones qui expriment la protéine FPmax

Echelle : 20 μ m (identique pour l'ensemble des figures)

Les cellules neuronales sont marquées avec l'anticorps MAP2. Au stade DIV 37, les neurones sont clairement différenciés. La protéine FPmax est fortement exprimée dans les cellules gliales lors de l'infection avec le virus AAV-CMV-FPmax (Figure 48, 1). Sur la figure 48, 1C, il est possible d'observer les cellules gliales qui se fixent aux corps cellulaires des neurones. Le virus AAV-Prion-FPmax est strictement spécifique aux neurones sans aucune cellule gliale marquée. Cependant ce promoteur est également celui qui possède la plus faible expression. Le virus contenant le promoteur éno­lase infecte également les cellules gliales mais plus faiblement que le promoteur CMV. Le virus avec le promoteur synapsine montre le plus grand nombre de neurone marqué avec peu de cellules gliales.

3.2.6. Spécificité des différents virus *in vitro*

Afin d'étudier la spécificité des différents virus, des co-cultures primaires sont infectées au stade DIV 10 puis fixées 8 jours après (DIV 18) avec 1 µl ($\sim 4.4 \times 10^{10}$ TUs) de virus (puits 2 cm²). Les cellules gliales sont marquées par immunofluorescence à l'aide de l'anticorps GFAP qui permet de marquer les cellules gliales activées.

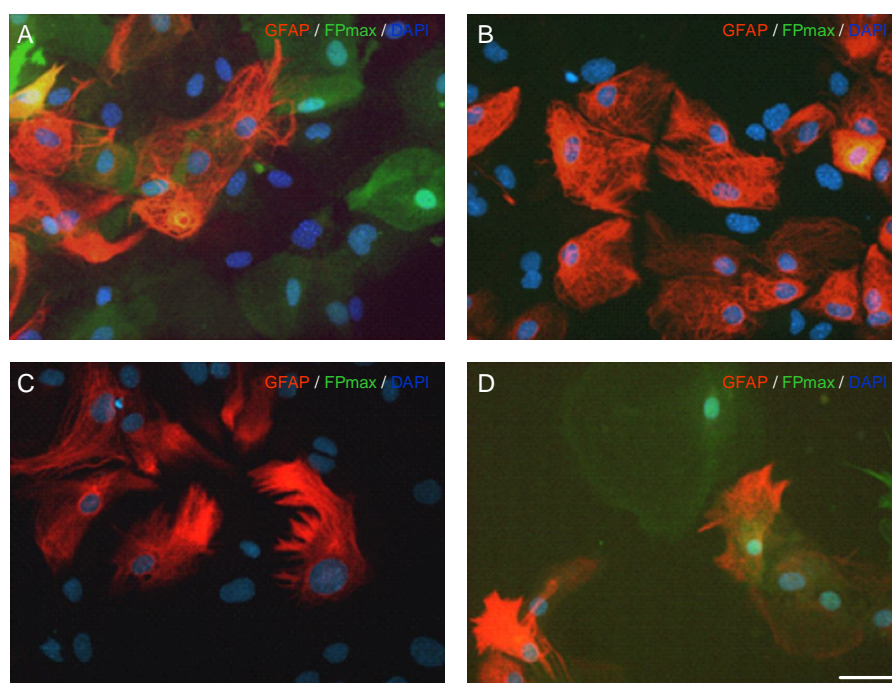


Figure 49 : Infection des co-cultures gliales et neuronales primaires au stade DIV 10 avec différents virus. Les co-cultures sont préparées à partir d'embryons de souris au stade E16. Elles sont ensuite fixées au stade DIV 18, triple marquées par immunofluorescence, acide protéique fibrillaire glial (GFAP), FPmax et marquage nucléaire (DAPI), puis observées au microscope inversé

A : Infection par le virus AAV-CMV-FPmax ; B : Infection par le virus AAV-Synapsin-FPmax ; C : Infection par le virus AAV-Prion-FPmax ; D : Infection par le virus AAV-NSE-FPmax

Echelle : 20 µm (identique pour l'ensemble des figures)

Le promoteur CMV induit la plus forte expression au niveau des cellules gliales. Quelques cellules gliales expriment la protéine FPmax avec le promoteur énalase et aucune cellule avec les promoteurs synapsine et prion.

Les cellules gliales qui expriment la protéine FPmax sont préférentiellement les cellules négatives pour le GFAP.

L'anticorps anti-MAP2 met en évidence les cellules neuronales. Cependant, cet anticorps a tendance à marquer également certaines cellules gliales.

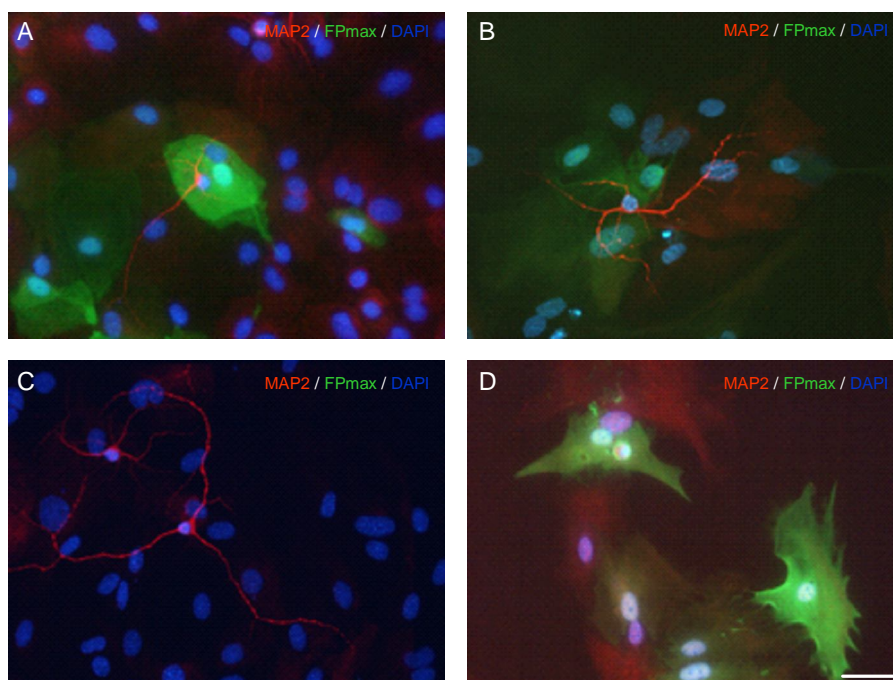


Figure 50 : Infection des co-cultures gliales et neuronales primaires au stade DIV 10 avec différents virus. Les co-cultures sont préparées à partir d'embryons de souris au stade E16. Elles sont ensuite fixées au stade DIV 18, triple marquées par immunofluorescence, protéines II associées aux microtubules (MAP2), FPmax et marquage nucléaire (DAPI), puis observées au microscope inversé

A : Infection par le virus AAV-CMV-FPmax ; **B :** Infection par le virus AAV-Synapsin-FPmax ; **C :** Infection par le virus AAV-Prion-FPmax ; **D :** Infection par le virus AAV-NSE-FPmax

Echelle : 20 μ m (identique pour l'ensemble des figures)

Comme précédemment, le promoteur CMV induit la plus forte expression de la protéine FPmax au niveau des cellules gliales. Ce nouveau marquage met en évidence également quelques cellules gliales qui expriment faiblement la protéine FPmax avec le promoteur synapsine. Aucune expression n'est détectée avec le promoteur prion. Le promoteur énalase exprime dans les cellules gliales mais moins fortement qu'avec le promoteur CMV.

3.2.7. Expression neuronale du FPmax *in vivo*

Afin d'étudier l'expression de la protéine FPmax, *in vivo*, chez le rongeur, des injections stéréotaxiques sont réalisées chez le rat. Les injections, pour l'étude de promoteurs neuospécifiques, s'effectuent bilatéralement au niveau de la substance noire dans l'hémisphère droit et au niveau de la substance noire réticulée pour l'hémisphère gauche. L'étude de l'expression avec le virus contenant le microARN mir-133b est réalisée avec une injection unilatéralement au niveau de la substance noire dans l'hémisphère droit.

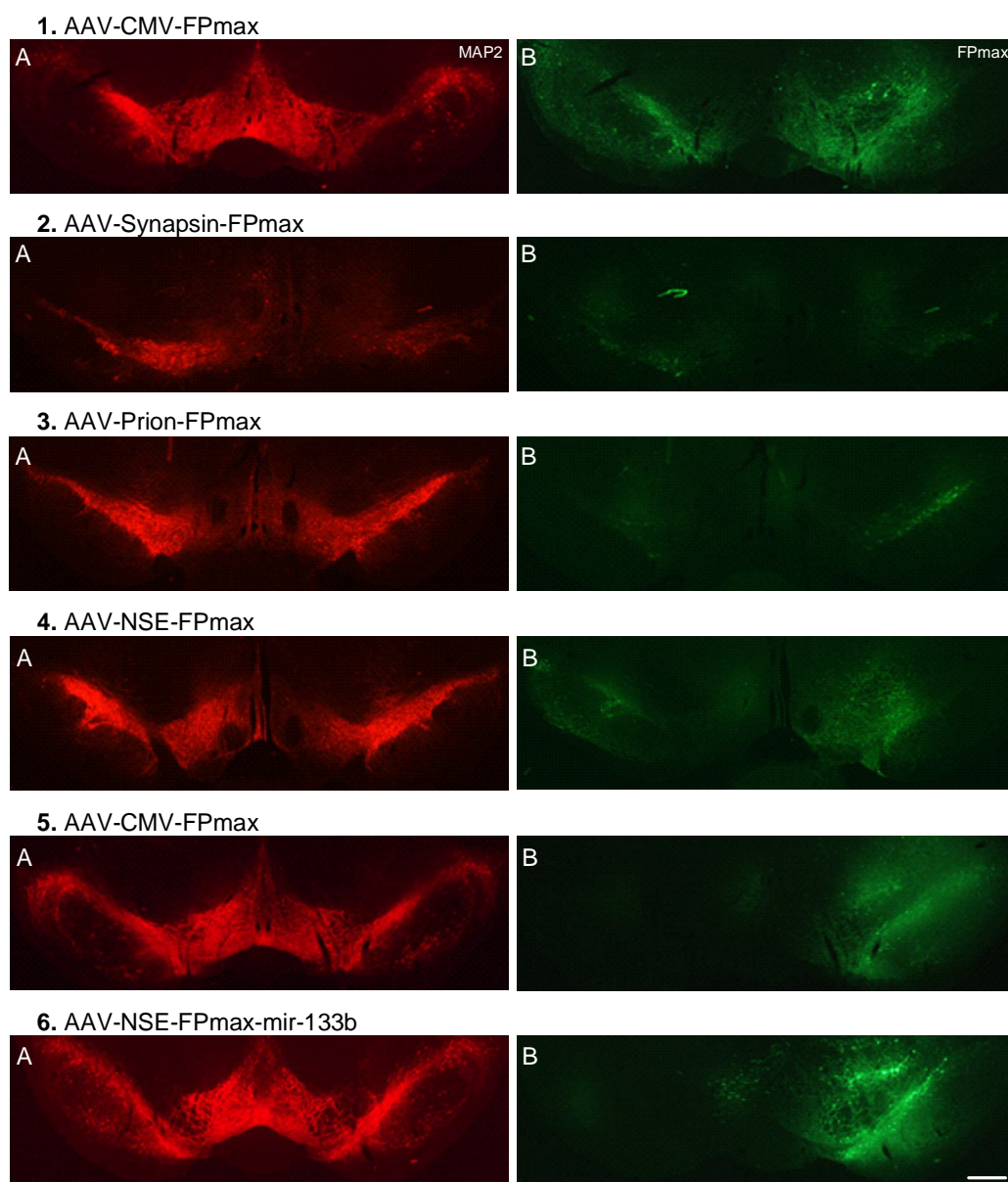


Figure 51 : Expression de la protéine FPmax, au niveau de la substance noire chez le rat, 2 ou 3 semaine après l'injection stéréotaxique des différents virus.

1 : injection bilatérale du virus AAV-CMV-FPmax ; **2** : injection bilatérale du virus AAV-Synapsin-FPmax ; **3** : injection bilatérale du virus AAV-Prion-FPmax ; **4** : injection bilatérale du virus AAV-NSE-FPmax ; **5** : injection unilatérale du virus AAV-NSE-FPmax; **6** : injection unilatérale du virus AAV-NSE-FPmax

2, 5 et 6 : Expression de FPmax 2 semaines après l'infection **1, 3 et 4** : Expression de FPmax 3 semaines après l'infection

A : Marquage par immunofluorescent de la tyrosine hydroxylase (TH) ; **B** : Marquage immunofluorescent de la protéine FPmax

Echelle : 500 μ m (identique pour l'ensemble des figures)

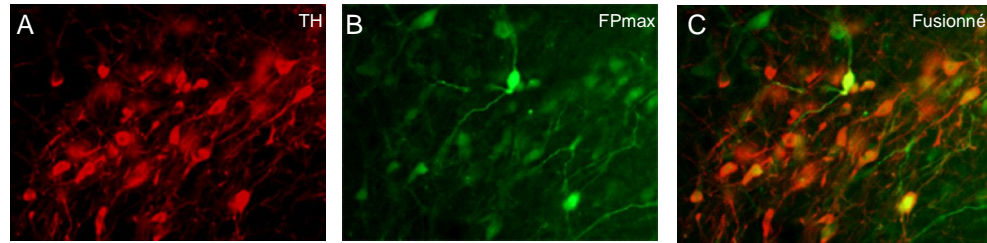
Les neurones dopaminergiques sont spécifiquement marqués par l'anticorps anti-TH. Le marquage des neurones dopaminergiques montre la structure de la substance noire en forme de moustache. La figure 51, 2A, permet d'illustrer une zone où aucun marquage n'est observé. Ce patron est présent au niveau de 5 cerveaux dont 2 cerveaux lors de l'infection avec le virus AAV-NSE-FPmax, 2 cerveaux avec le virus AAV-Synapsin-FPmax et 1 cerveau avec le virus AAV-CMV-FPmax.

L'expression globale de la protéine FPmax est plus importante avec le promoteur CMV suivi pas le promoteur NSE. Le promoteur prion présente une expression plus faible. Le promoteur synapsine n'a pas pu être comparé aux autres promoteurs car l'expression est constatée seulement 2 semaines après l'infection.

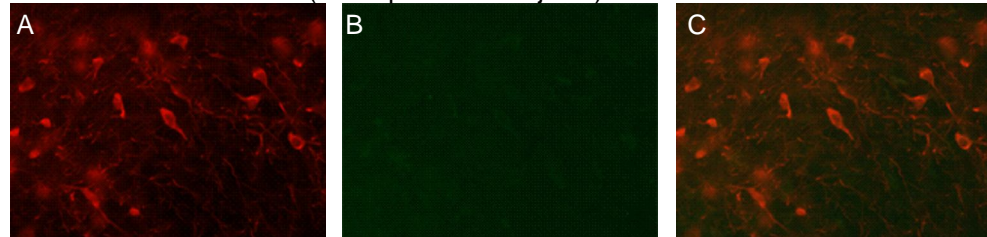
L'expression avec le virus contenant le mir-133b n'est pas plus faible que le virus sans le mir.

Ces observations au niveau de l'ensemble de la structure de la substance noire sont générales. Une observation plus en détail est réalisée au niveau des neurones dopaminergiques.

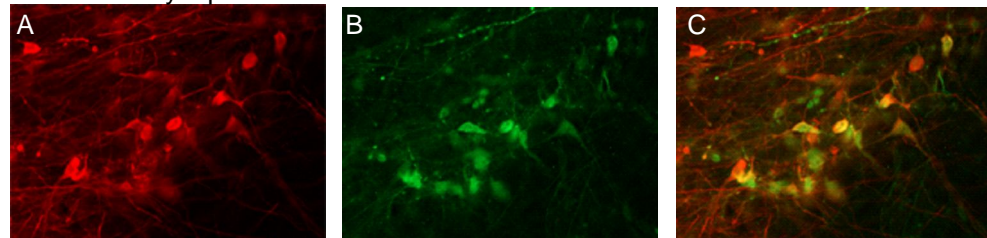
1. AAV-CMV-FPmax



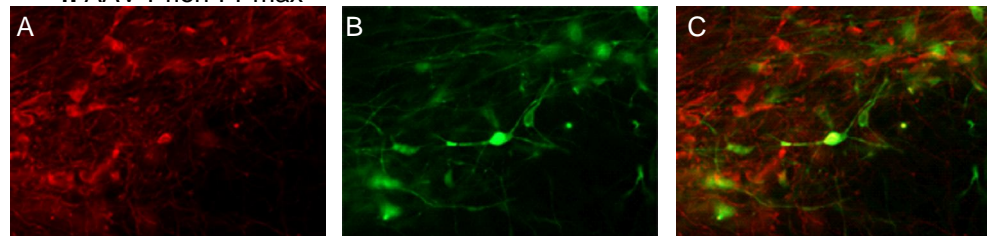
2. AAV-CMV-FPmax (hémisphère non-injecté)



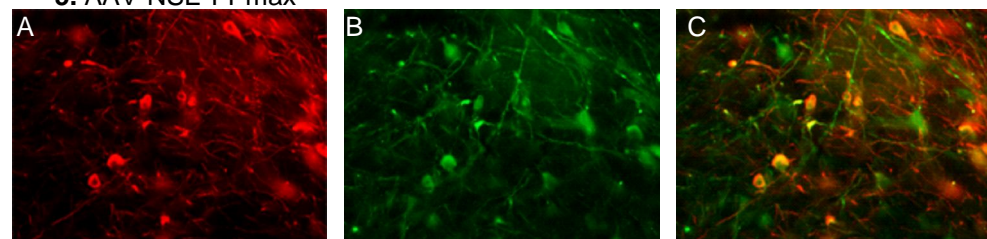
3. AAV-Synapsin-FPmax



4. AAV-Prion-FPmax



5. AAV-NSE-FPmax



6. AAV-CMV-FPmax-mir-133b

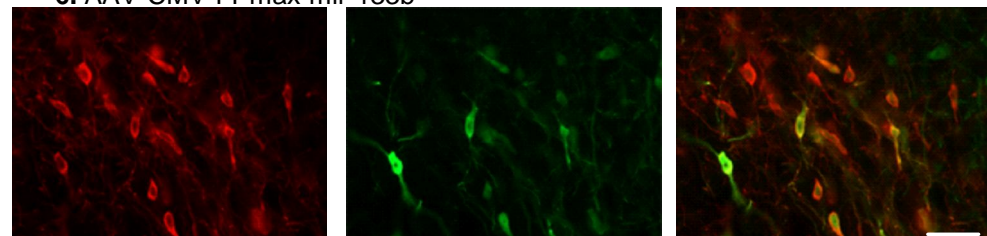


Figure 52 : Expression de la protéine FPmax, au niveau des neurones de la substance noire chez le rat, 2 ou 3 semaines après l'infection

1, 2 : 3 semaines après l'infection avec le virus AAV-CMV-FPmax ; 3 : 2 semaines après l'infection avec le virus AAV-Synapsin-FPmax ; 4 : 3 semaines après l'infection avec le virus AAV-Prion-FPmax ; 5 : 3 semaines après l'infection avec le virus AAV-NSE-FPmax ; 6 : 2 semaines après l'infection avec le virus AAV-NSE-FPmax

A : Marquage par immunofluorescent de la tyrosine hydroxylase (TH) ; B : Marquage immunofluorescent de la protéine FPmax ; C : superposition des marquages TH et FPmax

Echelle : 50 µm (identique pour l'ensemble des figures)

La protéine FPmax est détectée au niveau de certains neurones dopaminergique positifs pour la TH. En effet, certains neurones négatifs pour la TH expriment la protéine FPmax et d'autres positifs pas. L'hémisphère contrelatéral à l'injection, suite à une injection unilatérale, ne montre pas d'expression de la protéine FPmax. De plus, l'anticorps anti-TH ne marque pas les noyaux des neurones tandis que les neurones exprimant la protéine FPmax sont marqués nucléairement. Ainsi, le marquage de la protéine FPmax n'est pas dû à un artefact.

L'expression de la protéine FPmax apparaît un peu plus forte dans les neurones dopaminergiques de la substance noire avec le promoteur CMV. L'expression avec le promoteur éolase est légèrement plus forte qu'avec les deux autres promoteurs neurospécifiques. Aucune, différence n'est observée entre l'infection avec le virus contenant le mir-133b ou pas.

3.2.8. Spécificité des différents virus *in vivo*

Pour étudier la spécificité des différents promoteurs *in vivo*, les cellules gliales activées sont marquées avec l'anticorps anti-GFAP afin d'observer si ces cellules expriment ou non la protéine FPmax.

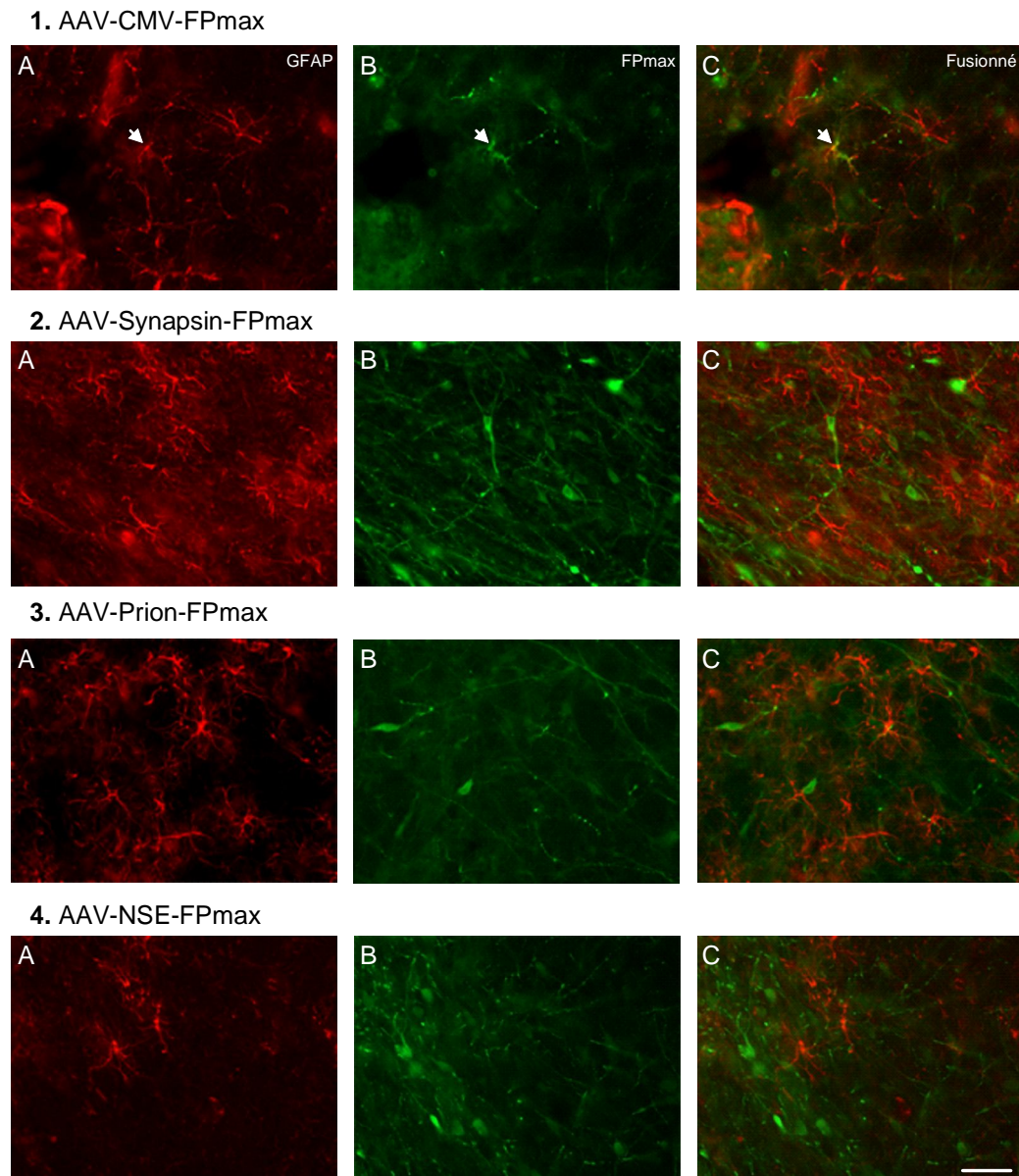


Figure 53 : Localisation de l'expression de la protéine FPmax dans la substance noire chez le rat, 2 ou 3 semaines après l'infection

1 : 3 semaines après l'infection avec le virus AAV-CMV-FPmax ; 2 : 2 semaines après l'infection avec le virus AAV-Synapsin-FPmax ; 3 : 3 semaines après l'infection avec le virus AAV-Prion-FPmax ; 4 : 3 semaines après l'infection avec le virus AAV-NSE-FPmax ; 5 : 2 semaines après l'infection avec le virus AAV-NSE-FPmax

A : Marquage par immunofluorescent de l'acide protéique fibrillaire glial (GFAP) ; B : Marquage immunofluorescent de la protéine FPmax ; C : superposition des marquages TH et FPmax

Echelle : 50 μ m (identique pour l'ensemble des figures)

L'expression de la protéine FPmax n'est pas localisée au niveau des cellules gliales. En effet, suite à l'infection avec les différents virus, aucune expression n'est observée au niveau des cellules gliales. L'infection avec le virus AAV-CMV-FPmax montre très peu de cellules gliales exprimant la protéine FPmax. Ainsi, le virus AAV de sérotype 6 utilisé pour cette étude ne présente pas un tropisme pour les cellules gliales.

4. DISCUSSION

Pour obtenir une expression spécifique du transgène dans les neurones, différents plasmides de type pAAV contenant les promoteurs neurospécifiques synapsine, prion ou éolase, sont générés en utilisant le système de recombinaison Gateway[®] d'Invitrogen.

La fonctionnalité des promoteurs dans les cellules neuronales est vérifiée dans deux modèles différents soit, *in vitro* au niveau des co-cultures primaires de cellules neuronales et *in vivo* chez le rat par injection stéréotaxique dans la substance noire.

L'infection des cultures, par les différents virus, induit une synthèse neuronale de la protéine FPmax. La différence de fluorescence observée entre les promoteurs indique une différence d'expression qui est la plus faible avec le promoteur prion et la plus forte avec le promoteur CMV. L'expression avec le promoteur viral est également plus précoce (fluorescence détectée après 3 jours d'infection) par rapport à l'expression des promoteurs neurospécifique (fluorescence après 8 jours d'infection). Les différents promoteurs neurospécifiques peuvent être classés par ordre croissant d'expression soit prion, synapsine et éolase.

In vivo, le niveau d'expression obtenu dans les neurones de la substance noire confirme les résultats *in vitro*. Le promoteur CMV s'avère être celui qui possède la plus forte expression.

Contrairement aux résultats décrits dans ce travail, une étude utilisant un virus herpétique ne montre aucune expression avec le promoteur éolase au niveau du cerveau chez le rat et une faible expression dans des co-cultures primaires de cellules corticales de rat (infection au stade DIV 7)^[40]. Une seconde étude utilisant de l'adénovirus montre une faible expression du transgène avec le promoteur éolase sur des co-cultures primaires d'hippocampe de rat au stade DIV 6^[41]. Une autre étude démontre que l'expression avec le promoteur synapsine est meilleure qu'avec le promoteur éolase en utilisant un adénovirus^[42] et un lentivirus^[43].

Néanmoins, une autre étude avec de l'adénovirus décrit le promoteur éolase comme neurospécifique avec une forte expression dans plusieurs régions du cerveau chez le rat ainsi que sur des cellules PC12 différenciées (cellules tumorales de glande médullo-surrénale de rat)^[44].

L'ensemble de ces études montre une hétérogénéité sur le profil d'expression du promoteur éolase. La maturation des cellules dans les différents modèles *in vitro* semble moduler l'expression avec les promoteurs neurospécifiques. En effet, aucune expression n'a été observée lors de l'infection des co-cultures au stade DIV 6 alors qu'une expression neuronale est détectée après infection au stade DIV 10. Les neurones non matures ne doivent pas exprimer les éléments de transcriptions nécessaires à l'expression du transgène avec les promoteurs neurospécifiques. Ces éléments semblent être activés entre les stades DIV 6 et 10. Ce temps semble nécessaire à la différenciation complète des neurones, comme par exemple la formation des synapses.

La spécificité des promoteurs est analysée par l'expression ou non du gène marqueur dans les différents types cellulaires.

Dans un premier temps, la spécificité des promoteurs est testée par transfection, par précipitation au phosphate de calcium, des cellules HEK 293T. Le promoteur CMV est utilisé comme promoteur ubiquitaire de référence. Les constructions possédant le promoteur CMV (pAAV-CMV-FPmax et pAAV-CMV-FPmax-mir-133b) expriment la protéine fluorescente FPmax au niveau des cellules cancéreuses embryonnaires de rein, HEK 293T, tandis que les promoteurs neurospécifiques n'induisent pas d'expression dans ce type cellulaire. Ce résultat est important car la production des virus s'effectue dans le même type cellulaire. En effet, il est primordial de pouvoir éviter l'expression du transgène pendant la production des virus surtout si le transgène est toxique pour les cellules.

Dans des cultures primaires mixtes de neurones et de cellules gliales, le classement suivant par ordre croissant de spécificité est établi d'après les résultats obtenus *in vitro*, soit CMV, éolase, synapsine et prion. Le promoteur prion est strictement neuronal. Par contre, le promoteur synapsine n'est pas strictement neurospécifique avec le virus AAV comme le montre l'expression de la protéine FPmax au niveau des cellules gliales (Figure 48, 2 et 50, B). Ce résultat est contraire à ce qui a été précédemment décrit en utilisant de l'adénovirus ^[41].

L'expression de la protéine FPmax dans les cellules gliales est observée préférentiellement sur les cellules gliales négatives pour GFAP. Cette population de cellules peut correspondre à des cellules précurseurs. Elles possèdent un phénotype prédominant de fibroblastoïde et poussent en plaque. Cette expression dans un type cellulaire similaire a également été décrite par Kügler S. lors de l'étude de différents promoteurs neurospécifiques dans des adénovirus ^[41]. Par ailleurs, aucune étude basée sur l'AAV ne regroupe la comparaison des trois promoteurs neurospécifiques étudiés ici.

In vivo, très peu de cellules gliales expriment le transgène lors de l'infection avec le virus possédant le promoteur CMV. Il n'est donc pas possible de démontrer une spécificité cellulaire des promoteurs.

Le fait que les cellules gliales puissent être infectées par du virus AAV prouve que le tropisme de l'AAV utilisé n'est pas uniquement neuronal *in vitro*. Le tropisme de l'AAV dépend des interactions entre la capside du virus et les cellules. Les virus concernés sont produits à partir du génome de l'AAV de sérotype 2 et la capside de sérotype 6. Ce tropisme glial, *in vitro*, avec le sérotype 6 de l'AAV a précédemment été décrit par Howard D. B. et al. ^[42].

Les cellules gliales en cultures semblent posséder des glycoprotéines de surface qui permettent d'interagir avec le virus. Cette hypothèse est confortée par une morphologie étalée des cellules gliales en cultures qui est différente de la forme étoilée observée *in vivo*.

In vivo, le virus AAV utilisé possède un tropisme neuronal. Ce tropisme différent s'explique peut être par la différence de structure des glycoprotéines de surfaces entre les cellules gliales *in vitro* et *in vivo*. Une autre hypothèse serait la quantité de virus en contact avec les cellules qui influencerait certainement la spécificité cellulaire du virus. *In vivo*, deux fois moins de virus sont injecté pour un nombre beaucoup plus important de cellules par rapport aux expériences *in vitro*. Ainsi, à partir d'une quantité seuil de particules virales, le tropisme du virus peut perdre de sa spécificité.

Lors de l'injection bilatérale du virus, 5 cerveaux présentent une zone sans marquage des neurones dopaminergiques positifs pour la TH. Cette zone peut être due à une mort des neurones ou alors à un phénomène transitoire. Le stress mécanique dû à l'injection ou une réponse inflammatoire et/ou immunitaire liée à la présence de particules virales peuvent expliquer ce phénomène.

Grâce à sa forte spécificité neuronale, sa petite taille (480 pb), son taux moyen d'expression ainsi que sur la base des précédents résultats obtenus par Kügler S. ^[41, 45, 46], le promoteur synapsine a été sélectionné pour le clonage de l' α -synucléine mais le virus produit n'a pas été testé dans ce travail. Des études montrent que la surexpression virale de la synucléine sauvage ou la synucléine mutée A30P donne des modèles de la maladie de Parkinson, aussi bien chez les rongeurs que chez les primates, en utilisant le lentivirus ou l'AAV avec des promoteurs ubiquitaires ^[47 – 52]. Ces modèles surexpriment très fortement la synucléine dans le but de réduire le temps de développement des symptômes de la maladie de Parkinson. La plus faible expression du promoteur synapsine devra être prise en compte pour établir le modèle de la maladie de Parkinson. En effet, la durée de l'expression devra être prolongée ou le niveau de l'expression du promoteur amplifié pour recréer un modèle de la maladie. Pour augmenter son taux d'expression, il serait intéressant de cloner des éléments de régulation. L'élément de régulation « woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element (WPRE) » d'une taille de 800 pb ajouté en 3' au niveau du promoteur synapsine, dans un vecteur de type adénovirus, permet d'augmenter l'expression sans perdre la spécificité du promoteur ^[53].

Suite à cette étude, il a été observé que les promoteurs neurospécifiques procurent une spécificité plus ou moins importante sans pour autant accéder à une expression strictement réservée à un type cellulaire. Afin de tester une approche complémentaire pour améliorer la spécificité cellulaire de l'expression du transgène, l'utilisation d'une séquence cible du microARN mir-133b, exprimé spécifiquement dans les neurones dopaminergiques de la substance noire ^[54], est testée *in vivo*.

Cependant, aucune différence d'expression n'est observée entre le virus AAV-CMV-FPmax et le virus contenant quatre copies de la séquence cible du mir-133b.

L'expression identique entre les virus peut provenir d'une quantité insuffisante de mir-133b au niveau des neurones dopaminergiques de la substance noire. En effet, il a été découvert que la répression dépendait d'un seuil de concentration du microARN dans la cellule ^[55]. Pour compléter cette étude, d'autres séquences cibles de microARN exprimés dans les neurones peuvent être testées comme par exemple le mir-124 ^[56, 57].

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis de développer des constructions virales exprimant le transgène à différents degrés d'expression et de neurospécificité sans pour autant obtenir une expression strictement neuronale. La neurospécificité des promoteurs semble dépendre du stade de maturation des cellules cibles et de la quantité de particules virales servant à infecter les cellules.

Ces promoteurs restent très utiles car ils résolvent un problème majeur lors de la production des virus en réprimant l'expression du transgène pendant cette étape. En effet, le laboratoire travaille sur des protéines toxiques de grands intérêts pour la création de modèle de la maladie de Parkinson qui peuvent interférer avec la production des virus.

Ces promoteurs n'étant pas d'origine virales, ils possèdent certainement un autre avantage au niveau de la stabilité et de la durée de l'expression du transgène dans les cellules qu'il serait intéressant d'étudier.

Pour renforcer la spécificité de l'expression du transgène, les microARN ouvrent des perspectives très encourageantes. Leurs présences spécifiques dans chaque type cellulaire peut être utilisées pour réprimer spécifiquement la traduction du transcrits portant la séquence cible du microARN.

Ainsi, des constructions composées de promoteurs neurospécifiques et de multiples séquences cibles de microARN semblent être l'avenir de l'expression spécifique.

6. BIBLIOGRAPHIE

- [1] Dauer W. & Przedborski S., Parkinson's Disease: Mechanisms and Models, *Neuron*, Vol.39, p.889-909 (2003)
- [2] Ulmer T.S., Structure and dynamics of micelle-bound human α -synuclein, *The Journal of biological chemistry*, Vol.280, p.9595-9603 (2005)
- [3] Atchison R.W. et al., Adenovirus-Associated Defective Virus Particles, *Science*, Vol. 149, No. 3685, p. 754-756 (1965)
- [4] Hoggan M.D. et al., Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations : physical, biological and immunological characteristics, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 55, No. 6, p. 1467-1474 (1966)
- [5] Berns K.I. & Rose J.A., Evidence for a Single-Stranded Adenovirus-Associated Virus Genome : Isolation and Separation of Complementary Single Strands, *Journal of Virology*, Vol. 5, No. 6, p. 693-699 (1970)
- [6] Buller R.M. et al., Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 Completely Help Adenovirus-Associated Virus Replication, *Journal of Virology*, Vol. 40, No. 1, p. 241-247 (1981)
- [7] McPherson R.A. et al., Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication, *Virology*, Vol. 174, No. 1, p. 217-222 (1985)
- [8] Berns K.I. et al., Detection of adeno-associated virus (AAV) specific nucleotide sequences in DNA isolated from latent infected Detroit 6 cells, *Virology*, Vol. 68, p. 556-560 (1975)
- [9] Kotin R.M. et al., Site Specific Integration by Adeno-Associated Virus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 87, p. 2211-2215 (1990)
- [10] Erles K. et al., Update on the Prevalence of Serum Antibodies (IgG and IgM) to Adeno-Associated Virus (AAV), *Journal of Medical Virology*, Vol. 59, p. 406-411 (1999)
- [11] Sprecher G.S. et al., Complement-fixation antibodies to adenovirus-associated viruses, cytomegaloviruses and herpes simplex viruses in patients with tumors and in control individuals, *American journal epidemiology*, Vol. 94, No. 4, p. 351-358 (1971)

- [12] Mayor H.D. et al., Antibodies to adeno-associated satellite virus and herpes simplex in sera from cancer patients and normal adults, *American journal of obstetrics and gynecology*, Vol. 126, No. 1, p. 100-104 (1976)
- [13] Shevtsova Z. et al., Promoters and serotypes : targeting of adeno-associated virus vectors for gene transfer in the rat central nervous system *in vitro* and *in vivo*, *Experimental Physiology*, Vol. 90, p. 53-59 (2004)
- [14] Robbins P.D. et al., Viral Vectors for Gene Therapy, *Trends in biotechnology*, Vol. 16, No. 1, p. 35-40 (1998)
- [15] Exceptionally Safe AAV Helper-Free Gene Delivery and Expression System, Technical Articles, Stratagene, La Jolla USA
<http://www.biocompare.com/technicalarticle/215/Exceptionally-Safe-AAV-Helper-Free-Gene-Delivery-And-Expression-System-from-Stratagene.html>
- [16] Schmid S., Biologie moléculaire : chap 2 : Transcription, traduction et code génétique, support de cours (2005/006), Hes.so Valais Wallis
- [17] Fickett J.W. & Hatzigeorgiou A.G., Eukaryotic Promoter Recognition, *Genome Research*, Vol. 7, p. 861-878 (1997)
- [18] Baldelli P. et al., The synapsin and the control of neuroexocytosis, *Eurekah Bioscience Collection*, Landes Bioscience (2003)
- [19] Sauerwald A., et al., The 5'-flanking region of the synapsin I gene, *The journal of biological chemistry*, Vol. 265, No. 25 (1990)
- [20] Mahal S.P. et al., Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene, *Gene*, Vol. 268, p. 105-114 (2001)
- [21] Lee I.Y. et al., Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species, *Genome Research*, Vol.8, p. 1022-1037 (1998)
- [22] Sakimura K. et al., Upstream and intron regulatory regions for expression of the rat neuron-specific enolase gene, *Molecular Brain Research*, Vol. 28, p. 19-28 (1995)
- [23] Sakimura K., et al., The structure and expression of neuron-specific enolase gene, *Gene*, Vol. 60, p. 103-113 (1987)

- [24] Tsien R.Y., The green fluorescent protein, Annual review of biochemistry, Vol. 67, p. 509-544 (1998)
- [25] Shagin D.A., et al., GFP-like Proteins as Ubiquitous Metazoan Superfamily : Evolution of Functional Features and Structural Complexity, Molecular Biology and Evolution, Vol. 21, No. 5, p. 841-850 (2004)
- [26] Evrogen, Moscou (Russie)
<http://www.evrogen.com/CopGFP.shtml>
- [27] Amaxa AG, max FP-Green description, Cologne (Allemagne) 2007
www.amaxa.com
- [28] Gateway® Technology enables rapid gene expression and analysis, Invitrogen, Carlsbad (USA), 710-033149, 2003
- [29] Landy Arthur, Dynamic, structural, and regulatory aspects of λ site-specific recombination, Annual review of biochemistry, Vol. 58, p. 913-949 (1989)
- [30] Hartley J. L. et al., DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination, Genome Research, Vol. 10, p. 1788-1795 (2000)
- [31] He L. & Hannon G.J., MicroRNAs : Small RNAs with a big role in gene regulation, Nature reviews genetics, Vol. 5, p.522-531 (2004)
- [32] Schmid S., Electrophorèse sur gel d'agarose, TP clonage B4 – SE 2006, Hes-so, Sion (2006)
- [33] Gateway® Vector conversion system with one shot® *ccdB* survival™ competent cells, Version A, Invitrogen, Carlsbad (USA), N° 11828-029 (2004)
- [34] Ausubel F. M., et al. Current Protocols in Molecular Biology, Wiley
- [35] Alkaline Phosphatase shrimp, Roche, Mannheim (Allemagne), N° 11 758 250 001 (2005)
- [36] Gateway® LR clonase™ II enzyme mix, Invitrogen, Carlsbad (USA), N° 11791-020 (2004)
- [37] Mahal,S.P., et al., Isolation and functional characterisation of the promoter region of the human prion protein gene, Gene, Vol. 268, p. 105-114 (2001)

- [38] Brown B. D., et al., Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer, *Nature medicine*, Vol. 12, N° 5, p. 585-591 (2006)
- [39] ND-1000 Spectrophotometer V3.5, User's Manual NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington (USA) 2007
- [40] Wang Y. et al., Diverse stabilities of expression in the rat brain from different cellular promoters in a helper virus-free herpes simplex virus type 1 vector system, *Human Gene Therapy*, Vol. 10, p. 1763-1771 (1999)
- [41] Howard D. B. et al., Tropism and toxicity of adeno-associated viral vector serotypes 1, 2, 5, 6, 7, 8, and 9 in rat neurons and glial in vitro, *Virology*, In Press (2007)
- [42] Kügler S. et al., Neuron-specific expression of therapeutic proteins: evaluation of different cellular promoters in recombinant adenoviral vectors, *Molecular and Cellular Neuroscience*, Vol. 17, p. 78-96 (2001)
- [43] Hioki H. et al., Efficient gene transduction of neurons by lentivirus with enhanced neuron-specific promoters, *Gene Therapy*, Vol. 14, p. 872-882 (2007)
- [44] Navarro V. et al., Efficient gene transfer and long-term expression in neurons using a recombinant adenovirus with a neuron-specific promoter, *Gene Therapy*, Vol. 6, p. 1884-1892 (1999)
- [45] Shevtsova Z. et al., Promoters and serotypes: targeting of adeno-associated virus vectors for transfer in the rat central nervous system *in vitro* and *in vivo*, *Experimental Physiology*, Vol. 90, N° 1, p. 53-59 (2004)
- [46] Kügler S., et al., Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long-term transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area, *Gene Therapy*, Vol. 10, p. 337-347 (2003)
- [47] Lo Bianco C. et al., α -synucleinopathy and selective dopaminergic neuron loss in a rat lentiviral-based model of Parkinson's disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 99, N° 16, p. 10813-10818 (2002)
- [48] Lauwers E. et al., Neuropathology and neurodegeneration in rodent brain induced by lentiviral vector mediated overexpression of α -synuclein, *Brain Pathology*, Vol. 13, p. 364-372 (2003)

- [49] Kirik D. et al., Nigrostriatal α -synucleinopathy induced by viral vector-mediated overexpression of human α -synuclein: a new primate model of Parkinson's disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 100, N° 5, p. 2884-2889 (2003)
- [50] Klein R. L. et al., Dopaminergic cell loss induced by human A30P α -synuclein gene transfer to the rat substantia nigra, *Human Gene Therapy*, Vol. 13, p. 605-612 (2002)
- [51] Yamada M. et al., Overexpression of α -synuclein in rat substantia nigra results in loss of dopaminergic neurons, phosphorylation of α -synuclein and activation of caspase-9: resemblance to pathogenetic changes in Parkinson's disease, *Journal of Neurochemistry*, Vol. 91, p. 451-461 (2004)
- [52] Kirik D. et al., Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of α -synuclein in the nigrostriatal system, *The Journal of Neuroscience*, Vol. 22, N° 7, p. 2780-2791 (2002)
- [53] Adenoviral-mediated, high-level, cell-specific transgene expression: a SYN1-WPRE cassette mediates increased transgene expression with no loss of neuron specificity, *Molecular Therapy*, Vol. 5, N° 5, p. 509-516 (2002)
- [54] Kim L. et al., A microRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons, *Science*, Vol. 317, p. 1220-1224 (2007)
- [55] Brown B. D., et al., Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state, *Nature biotechnology*, Vol. 25, N° 12, p. 1457-1467 (2007)
- [56] Lagos-Quintana M., et al., Identification of tissue-specific microRNAs from mouse, *Current Biology*, Vol. 12, p. 735-739 (2002)
- [57] Sempere F. et al., Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation, *Genome Biology*, Vol. 5, R13 p. 1-11 (2004)

7. Annexes

I. Séquence des différents plasmides

1. pAAV-Synapsin-FPmax :

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGA
GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGATCAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGG
CTCCCGGCCCGCCCCCTTACCCTCGATAGGGCCCTGCGTATGAGTGAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGGGTGCCCT
ACCTGACGACCGACCCCGACCCACTGGACAAGCACCCCAACCCCATTTCCCAAAATTGCGCATCCCTATCAGAGAGGGGGAGGGGAAACA
GGATGCGGCGAGGCGCGTGGCGACTGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCTGGCGGCGCGGCCACCGCGCCTCA
GCACTGAAGGCGCGTGCAGTCACTCGCCGGTCCCCGCAAACCTCCCTTCCCGGCCACCTTGGTTCGCGTCCGCGCCGCCCGGCCAG
CCGGACCGCACCCACGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGACGGGCGCGACCATCTGCGTTCGGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTG
CGGTGGGACGCGGAGGAGTCTGTCTGCTGAGAGCGCAGTCGAGGATCCGC AAGGGTGGGCGCGCCGACCCAGCTTTCTTGTACAAAG
TGGTGATGGATTGGAATCCCGCCGGGAACGGTGCATTGGAAGCGGATTCCTGCGCAAGAGTACGTAAGTACCGCTATAGAGTCT
ATAGCCCCACAAAAATGCTTTCTTTCTTTAATATACTTTTTTGTATTCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTCAGGGCA
ATAATGATACAATGTATCATGCCCTCTTTGCACCATTTCTAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTAAAGCAATAGCAATATTTCTGCAT
ATAAATATTTCTGCATATAAATTGTAAGTGTGTAAGAGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTTCTGCTTTTATT
TTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCTCCACAGCTC
CTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATTGGGATTGGAACATCGATTGAATTTCCCGGGGATCCATGGA
GAGCGACGAGAGCGGCTGCCGCCCATGGAGATCGAGTGCCTCATCACCGGCAACCTGAACGGCGTGGAGTTCGAGCTGGTGGGCGGCGG
AGAGGCGACCCCGAGCAGGGCCGCATGACCAACAAGATGAAGAGCACCAAGGCGCCCTGACCTTCAGCCCTACCTGCTGAGCCACGT
GATGGGCTACGGCTTCTACCACTTCGCGACCTACCCAGCGGCTACGAGAACCCTTCTGTCACGCCATCAACAACGGCGGTACACCAA
CACCCGCATCGAGAAGTACGAGGACGGCGGCGTGTGCAGTGCAGTTCAGCTACCGCTACGAGGCCGGCCGCGTGATCGGCGACTTCAA
GGTGATGGGCACCGGCTTCCCGAGGACAGCGTGATCTTACCGACAAGATCATCCGACGAACGCCACCGTGGAGCACCTGCACCCCAT
GGGCGATAACGATCTGGATGGCAGCTTCAACCGCACCTTCAGCTGCGCGACGGCGGCTACTACAGCTCCGTGGTGGACAGCCACATGCA
CTTCAAGAGCGCCATCCACCCAGCATCTGCGAGAACGGGGGCCCATGTTTCGCTTCCGCGCGTGGAGGAGGATCAGAGCAACACCGA
CTGGGCATCTGGGAGTACGAGCAGCCTTCAAGACCCCGGATCGAGATGCCGTGAAGAATAAAGCTTGCTTCGAGCAGCGCTGCTCG
AGAGATCTACGGTGCATCCCTGTGACCCCTCCCGAGTGCCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCACACCGCCTTGTCT
AATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGCTCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGAAGT
TGGGAAGACAACCTGTAGGGCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCTC
CTGGGTCAAGCGATTCTCCTGCTCAGCTCCCGAGTTGTTGGGATTCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTGTTTTTTTG
GTAGAGACGGGTTTACCATATTTGGCCAGGCTGGTCTCCAACCTCTAATCTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCTCCCAAATTGCTGGG
ATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGCTCTTCTGATTTTGTAGGTAACACGTGCGGACCGAGCGGCCGAGGAACCCCTAGTG
ATGGATTGTGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAGGTGCGCCGACGCCCGGCTTCCCGGGCG
GCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTTCACACCGC
ATACGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGTTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTG
CCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTCTGCGCACGTTGCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGC
TCCCTTAGGGTTCCGATTAGTGCTTACGGCACCTGACCCCAAAAACTTGATTGGGTGATGGTTACGTAAGTGGGCCATCGCCCT
GATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCTATCT
CGGGCTATTCTTTGATTATAAGGATTTTGCCGATTTCGGCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAAACAAAAATTTAAGCGCAATT
TTAACAAAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGTGCATCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCG
CAACACCCGCTGACGCGCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTC
AGAGGTTTTTACCGTCACTACCGAACGCGGAGACGAAAGGGCTCGTGATACGCCATTTTTTATAGGTTAATGTATGATAATAATGG
TTTTCTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGCGAACCCTATTGTTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGC
TCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATATGATATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCT
TTTTTGGCGCATTTTGCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGG
GTTACATGGAATGGATCTCAACAGCGGTAAGATCTTGAGAGTTTTGCCCCGAAGAACGTTTTTCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTT
TGCTATGTGGCGCGTATTATCCCGTATTGACGCGGGGCAAGAGCACTCGGTGCGCGCATACATATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGT
ACTCACAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAAGCTGCGG
CCAACCTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAACATGGGGGATCATGTAAGTGCCTTGATCGTT
GGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACACGTTGCGCAAACTATTAA
CTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCC
TTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGC
CCTCCGTATCGGTAGTTATCTACACGAGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCTCACTGA
TTAAGCATTTGGTAAGTGTGAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGA
AGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAAGTGAAGTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGTAAGAAAGATCAAGGAT
CTTCTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGAACAAAAAAACCACCGTACCAGCGGTGGTTGTTTTGCGGATCAAG
AGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTACGAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACC

ACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAAGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAA
CGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAA
GCGGCAGGGTTCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGGGTTTCGCCACCTCT
GACTTGAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTACGGTCTCTGGCCT
TTTGTCTGGCCTTTTGTCTACATGT

2. pAAV-Prion-FPmax :

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTGGGCGACCTTTGGTTCGCCCGGCCCTCAGTGA
GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGGCCGACGCGATCA~~CAAGTTTGTACAAAAAGCAGG~~
~~CTCCGCGGCCGCCCTTACCTCGAGATCTTTACAGTCAAATGAGCCACGTCAGGGAGCGATGGCACCCCGCAGGCGGTATCAACTGATG~~
~~CAAGTGTTCAGGCAATCTCAACTCGTTTTCCTGGTACTCATTCCCGGCCCTGGTTGGCAGCGCTGCACCTTTAACTTAAACCTCGG~~
~~CCGGCCGCGCCCGCGGGGACAGAGTGTGCGCCGGGCGCGCGGCAATTGGTTC~~CCCCCGCGGACCTCCGCGCAGCGCGCCGCTTCC
CTTCCCCCGCCCGCTCCCTCCCCCTCGGCCCGCGCGTGCCTGTCTCCGAGCCAGTCGCTGACAGCCGCGCGGATACCCGTCGACCT
CGAGAAGGGTGGGCGCGCG~~ACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGT~~GATGGATTGGAATCCCGGCCGGAACGGTGCATTGGAACGCGGAT
TCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAGGCCACAAAAATGCTTTCTTCTTTAATATACCTTTTGTATTAT
CTTATTTCTAATACCTTCCCTAATCTCTTTCTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTCACCATTTCTAAAGAATAACA
GTGATAAATTTCTGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTAACGTAGTAAGAGGTTTCATATT
GCTAATAGCAGTCAACAATCCAGCTACCATTTCTGCTTTATTTTATGGTTGGGTAAGGCTGGATTATTTGAGTCAAGCTAGGCCCTTTT
TGCTAATCATGTTCTACCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACGTGTGGTCTGTGTGCTGGCCATCACTTTGGCGAAAGAAT
TGGGATTGCAACATCGATTGAATTTCCCGGGGATCC~~ATGGAGAGCGACGAGAGCGGCC~~TGCCCGCCATGGAGATCGAGTGCCGCATCACC
GGCACCTGAACGGCGTGGAGTTTCGAGCTGGTGGGCGCGGAGAGGGCACCCCCGAGCAGGGCCGCATGACCAACAAGATGAAGAGCACC
AAAGGCGCCCTGACCTTCAGCCCCCTACCTGCTGAGCCACGTGATGGGTACGGCTTCTACCACTTCGGCACCTACCCAGCGGCTACGAG
AACCCTTCTGTCACGCCATCAACAACGGCGGCTACACCAACACCCGCGATCGAGAAGTACGAGGACGGCGGCGTGTGACGTGAGCTTC
AGCTACCGCTACGAGGCGCGCGCGTGATCGGCGACTTCAAGGTGATGGGCACCGGCTTCCCCGAGGACAGCGTGATCTTCACCGACAAG
ATCATCCGACAGCAACGCGTGGAGCACCTGCACCCCATGGGCGATAACGATCTGGATGGCAGCTTCAACCCGACCTTCAGCCTGCGC
GACGCGGCTACTACAGCTCCGTGGTGGACAGCCACATGCACCTTCAAGAGCGCCATCCACCCAGCATCTGCGAGAACGGGGGCCCCATG
TTCGCTTCCGCGCGTGGAGGAGGATCAGAGCAACACCGAGCTGGGCATCGTGGAGTACCAGCACGCCCTTCAAGACCCCGGATGCAGAT
GCCGTTGAAGAATAA~~AAAGCTTGCTCGAGCAGCGCTGCTCGAGAGATCTACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCACTGCTCTCTCTG~~
GCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCACCAGCCTTGTCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCTCTCTATAAT
ATTATGGGGTGGAGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGG
AGTGAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTC
CAGGATGTCATGACACAGGCTCAGCTAATTTTGTGTTTGGTATAGACGGGGTTTACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACTCTAA
TCTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCTCCCAAATTTGCTGGGATTACAGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCTCTCTGATTTTGTAG
GTAACACGTGCGGACCGAGCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG
GGCGACCAAAAGTTCGCGGACGCGCGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGAGCTGCTGCAGGGGCGCTGATGC
GGTATTTTCTCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATACGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGC
GGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTCACTTGGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCTCTCTCGC
CAGTTTCGCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTAGGGTTCCGATTAGTCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAA
ACTTGATTTGGGTGATGGTTACGTAAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCAGCTTCTTAAATAG
TGGACTCTTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGGCTATTTCTTTGATTATATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTG
GTTAAAAATGAGCTGATTAAACAAAAATTTAACCGCAATTTTAAACAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGTGCACTCTCAGTACAAT
CTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCGCTGACGCGCCTGACGGGTGTGTCTGCTCCCGGCATCCGC
TTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGTTTTCACCGTATCACCGAAACGCGGAGACGAAAGGGCCTCGT
GATACGCTATTTTATAGGTAAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTGAGTGGCAGCTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAACCCC
TATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAA
GAGTATGAGTATTCACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGGGCGATTTTGCTTCCCTGTTTGTCTCAGCCAGAAACGCTGGT
GAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCTTGAAGTTTTCG
CCCCAAGAAGCTTTTCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACT
CGGTGCGCGCATACATATTCTCAGATGACTTGGTTGAGTACTCACAGTCAAGAAAGCATCTTACCGATGGCATGACAGTAAGAGA
ATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTT
TTTGACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCTTGTATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCAC
GATGCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGAT
GGAGGCGGATAAAGTTGACAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAATCTGGAGCGGCTGAGCGTGG
GTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGA
TGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTTGGTAACGTGTGAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGAT
TGATTTAAAACTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAACGTGAGTTTTC
GTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCACCAAAA
AAAACCCCGCTACACGCGGTGGTTTGTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACGTGCTTACGACGAGCGAGAT
ACCAAACTACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCAACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCT
GTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTGGG
CTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGC
CACGTTCCCGAAGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGAGGGTCGGAACAGGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAA

CGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATG
GAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTACGGTTCCCTGGCCCTTTTGCTGGCCCTTTTGCTCACATGT

3. pAAV-NSE-FPmax :

CTCGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGCCCTCAGTGA
GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGACGCGATCAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGG
CTCCGCGGCCGCCCTTACCATCGATGTACCAGAGTCTCTCTGCTCGCCCAATCTTCCAACCCCTATGGTGGTATGGCTGACAC
AGAAAAATGTCTGCTCTGTATGGGACATTTGCCCTCTTCTCCAAATATAAGACAGGATGAGGCCTAGCTTTTGCTGCTCCAAAGTTTTA
AAAGAACACATTGCACGGCATTAGGGACTCTAAAGGTTGGAGGAGGAATGAGGGAATTGCATCATGCCAAGGCTGGTCTCATCCATCA
CTGCTTCCAGGGGCCAGAGTGGCTTCCAGGAGGTATCTTACAAAGGAAGCCCGATCTGTAGCTAACACTCAGAGCCCATTTTCTGCGT
TAACCCCTCCCGACCTCATATACAGGAGTAACATGATCAGTGACCTGGGGGAGCTGGCCAACTGCGGGACCTGCCAAGCTGAGGGCCT
TGGTGCTGCTGGACAACCCCTGTGCCGATGAGACTGACTACCGCCAGGAGGCCCTGGTGAGATGGCACACCTAGAGCGCCTAGACAAAG
AGTACTATGAGGACGAGGACCGGCGAGAAGCTGAGGAGATCCGACAGAGCTGAAGGAGGAACAGGAGCAAGAATCCAGCCGGACCAAG
ACATGGAACCGTACCTCCCGCCAACTAGTGCTCTCTAGCCTGCAGGGACAGTAAGGTGATGGCAGGAAGGCAGCCCCGGAGGCAA
AGGCTGGGCACGCGGGAGGAGAGGCCAGAGTCAAGAGCTGCGGGTATCTCAGATATGAAGGAAAGATGAGAGAGGCTCAGGAAGAGGTAA
GAAAAGACACAAGAGACCAGAGAAGGAGAAGAATTAGAGAGGGAGGCAGAGGACCGCTGTCTCTACAGACATAGCTGGTAGAGACTGGG
AGGAAGGGATGAACCTGAGCGCATGAAGGAAGGAGGTGGCTGGTGGTATATGGAGGATGTAGCTGGGGCCAGGGAAAAGATCCTGCAC
TGGGGATCTGAAGCTGGGGAGAACAGGACACGGGGTGGAGAGGCGAAAGGAGGGCAGAGTGAAGCAGAGAGACTGAGGCCCTGGGGATGTG
GGCATTCCGGTATGGGCACAGTTCACTTGTCTTCTTTTCCAGGAGGCCAAAGATGCTGACGTCAAGAACTCATAATACCCAGTGG
GGACATCCGCTATTGATCCCTGTTTACAAGAAGTGGGAGTGTCTCTTTTGTCCCAGACTGGAAATCCATTACATCCAGCTCAGGT
TCTGTGGTGGTCTCTGTGTGGCTGTTCTGTGGCCCTACCTAAAGTCTAAGCACAGCTCTCAAGCAGATCCGAGGCGACTAAGATG
CTAGTAGGGGTTGTCTGGAGAGAAGAGCCGAGGAGGTGGGCTGTGATGGATCAGTTTCAAGTCTTCAATAAAAAAGGCGTTTTTATATTCTG
TGTCGAGTTCTGTGAACCCCTGTGGTGGCTTCTCCATCTGTCTGGGTTAGTACCTGCCACTATACTGGAATAAGGGGACCGCTGCTTCCC
TCGAGTTGGCTGGACAAGGTTATGAGCATCCGTGTACTTATGGGGTTGCCAGCTTGGTCTCGGATCGCCCGGGCCCTTCCCCACCCGTT
CGGTTCCCCACCACCCCGCGCTCGTACGTGCGTCTCCGCTGCAGCTCTTGACTCATCGGGGCCCGGGTCACTGCGCTCGCTCGG
CTCTATAGGCGCCGCCCTGCCACCCCGCGCGCTGGGAGCGCAGCCGCCACTCTGCTCTCTGCGCGCGCGCCCTCAC
CACCGCCACCGCCACCGCTGAGTCTGCACTCTCGAGATCCACCGGTGCCACCATGGTCCGCAAGGTTGGGATTCGAACATCGATTGAATTCCCCG
CTTGATACAAAGTGGTATGGATTCCGAATCCCGCGCGGAACCGTGCATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGC
CTATAGAGTCTATAGGCCACAAAAATGCTTTCTTCTTTAATATACTTTTTTGTATTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTT
CTTTTCAAGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCCTTTTGCACCATTTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGCAATAGCAA
TATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTAACCTGATGTAAGAGGTTTCATATTGTCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCAT
CTGCTTTTATTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGTCTAATCATGTTTATACCTCTTATCTTC
TCCCACAGCTCCTGGCAACGCTGCTGTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATTGGGATTCGAACATCGATTGAATTCCCCG
GGATCCATGGAGAGCGACGAGAGCGGCTGCCCGCCATGGAGATCGAGTGCCGCATCACCGGCACCTGAACGGCGTGGAGTTTCGAGCTG
GTGGGCGCGGAGAGGGCACCCCGAGCAGGGCCGATGACCAACAAGATGAAGAGCACCAAAGGCGCCCTGACCTTCAGCCCTACCTG
CTGAGCCACGTGATGGCTACGGCTTCTACCACTTCGCGACCTACCCAGCGGCTACGAGAACCCCTTCTGACAGCCATCAACAACGGC
GGCTACACCAACACCCGCATCGAGAAGTACGAGGACGGCGGCTGTGTCACGTGAGCTTCAGCTACCGCTACGAGGCCGGCGCGTGTATC
GGCGACTTCAAGGTGATGGGCACCGGCTTCCCCGAGGACAGCGTGATCTTACCAGACAAGATCATCCGAGCAACGCCACCGTGGAGCAC
CTGCACCCCATGGGCGATAACGATCTGGATGGCAGCTTCAACCGACCTTCAGCTGCGCGACGGCGGCTACTACAGCTCCGTGGTGGAC
AGCCACATGCATCTCAAGAGCGCCATCCACCCAGCATCTGCGAGAAGCGGGGCCCATGTTGCGCTTCCGCGCGTGGAGGAGTACAC
AGCAACACCGAGCTGGGCATCGTGGAGTACAGCACGCTTCAAGACCCCGGATGCAGATGCCGGTGAAGAATAAAGCTTGCTCGAGC
AGCGTGTCTCGAGAGATCTACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCTCTCTGCGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCACC
AGCCTGTCTAATAAAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGCTCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGC
AAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGCTCACTGCA
ATCTCCGCTCTCTGGGTTCAAGCGATTCTCTGCTGACGCTCCCGAGTTGTTGGGATTCAGGCATGCATGACAGGCTCAGCTAATTT
TTGTTTGTGGTAGAGACGGGTTTACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCAATCTAATCTCAGGTGATCTACCCAGCTTGGCTTGGCTCCC
AAATTGTCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCTCTGTATTTGTAGGTAACACGTGCGGACCGAGCGGCCGAGG
AACCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCCCGACGCCGGGCT
TTGCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGAGTGCCTGCGAGGGGCGCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTA
TTTACACCCGCATACGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCCAGCGTGAC
CGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCT
AAATCGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTGGGTGATGGTTACAGTAGTGG
GCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTGGAGTGCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTTGTCAAAATGGAACAACACT
CAACCCTATCTCGGGCTATTCTTTTGTATTTATAAGGGATTTTGGCGATTTCGGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAAACAAAAAT
TAACGCGAATTTTAAACAAATATTAACGTTTACAATTTATGGTGCATCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCC
CCGACACCCGCCAACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTGTCTGCTCCCGCATCCGTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAG
CTGCATGTGTGAGAGGTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCATTTTTTATAGGTTAATGTCAT
GATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAAGTGGCACTTTTCCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATCAAA
TATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGTTCAATAATTTGAAAAGGAAGAGTATGATTTCAACATTTCCGTGTCGC
CCTTATTCCCTTTTTTGGCGCATTTTGCTTCTGTGTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGG
TGCACGAGTGGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTGCGCCCGAAGAAGCTTTTCAATGATGAGCAC
TTTTAAAGTTCTGTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGA
CTTGGTTGAGTACTACCAAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGA
TAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTG

CCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCG
CAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCT
GCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCC
AGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGG
TGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACGTGCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATGATTTAAACCTTCATTTTAAATTTAAAG
GATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAA
GATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACACCCTACCAGCGGTGGTTTGT
GCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACTGGCTTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTA
GTTAGGCCCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAA
GTCGTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCCAG
CTTGAGCGAAGCAGCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGGAGAAAGGCGGACAG
GTATCCGGTAAGCGCGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTCTGGGT
TCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGTATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTACG
GTTCTTGGCCTTTTGTGTCCTTTTGTCTCACATGT

4. pAAV-CMV-FPmax-mir-133b :

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGCCTCAGTGA
GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACCGCGTGGAGCTAGTTATTAATAGTAATCAA
TTACCGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAATACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACG
CCCGCCCATTTAGCGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGTCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGT
AAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCAT
ATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCACTCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTGGC
AGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGACCA
AAATCAACGGGACTTTCCAAATGTGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAG
CAGAGCTCGTTTAGTGAAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTGGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCT
CCGCGGATTCGAATCCCGGCCCGGAGCGGTGCATTGAAGACGCGGATCCCCGTCGAAGAGTGACGTAAAGTACCGCCATAGAGTCTATA
GGCCCAAAAAATGCTTTCTTCTTTAATATACCTTTTGTGTTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTAGGGCAATA
ATGATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACCATTTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATTTCTGCATATA
AATATTTCTGCATATAAATTGTAAGTGTATGTAAGAGTTTCAATTTGCTAATAGCAGTACAATCCAGTACCATTCTGCTTTTATTTTA
TGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGTCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTG
GGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAAGAATTGGGATTGCAACATCGATTGAATTTCCCGGGGATCCATGGAGAG
CGACGAGAGCGCGCTGCGGCCATGGAGATCGAGTGCCGATCACCGGCACCCCTGAACGGCGTGGAGTTTCAGCTGGTGGGCGGCGGAGA
GGGCAACCCCGAGCAGGGCCGATGACCAACAAGATGAAGAGCACCAAGGCGCCCTGACCTTCAGCCCTTACCTGCTGAGCCACGTGAT
GGGCTACGGCTTCTACCACTTCGGCACCTACCCAGCGGCTACGAGAACCCCTTCTGACGCGCATCAACAACGGCGGCTACACCAACAC
CCGCATCGAGAAGTACGAGGACGGCGGCGTGTGTCAGCTGAGCTTACGTACCGCTACGAGGCGGCGCGGTGATCGGCGACTTCAAGGT
GATGGGCAACCGGCTTCCCGAGGACAGCGTGATCTTCAACGACAAGATCATCCGCAGCAACGCCACCGTGGAGCACCTGCACCCCATGGG
CGATAACGATCTGGATGGCAGCTTCAACCCGACCTTTCAGCCTGCGCGACGGCGGCTACTACAGCTCCGTGGTGGACAGCCACATGCATTT
CAAGAGCGCATCCACCCAGCATCTTGCAGAACGGGGGCCCATGTTTCGCCTTCCCGCGCGTGGAGGAGGATCACAGCAACACCGAGCT
GGGCGCTGTGGATACACGACGCTTCAAGACCCCGGATGAGATGCGGTTGAAGAATAAAGCTTGTGCTGACTAGCTGGTTGAAGGGGA
CCAAACGATTAGCTGTTGAAGGGGACCAAAACCGTTAGCTGGTTGAAGGGGACCAATCACTAGCTGGTTGAAGGGGACCAAAAGAT
TACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCAAGTGCCCTCTCTGCGCTTGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCAACGACCTTGTCTAATAAAA
TTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCTTCTATAATATTATGGGTGGAGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAG
ACAACCTGTAGGGCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCCTCTGGGTT
CAAGCGATTCTCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTGGTAGAGA
CGGGGTTTACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCAACTCCTAATCTCAGGTGATCTACCCACTTGGCCTCCCAATTTGCTGGGATTAGAG
GCGTGAACCACTGCTCCTTCCCTGTCTCTGATTGTTAGTTAACCACCTGCGGACCGGCGGACCGGACCCCTGAGTATGAGT
TGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCGGGCGACCAAGGTGCGCCGACGCGCGGCTTTGCGCGGCGGCTCAG
TGAGCGAGCGAGCGCGAGCTGCCGTCAGGGGCGCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCGCATACGTC
AAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGCTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGC
CCTAGCGCGCGCTCCTTTCTGCTTTCTTCCCTTCTTCTGCGCACGTTTCCCGGCTTTCCTCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCTTT
AGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTACAGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGAC
GTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCAGCTTCTTTAATAGTGGACTTGTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGGCTA
TTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGGCGATTTCCGCCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAATAAATTAACGCGAATTTAACA
AATATTAACGTTTACAATTTTATGGTGCATCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACC
CGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGCTTCCGGGAGCTGCATGTGTACAGGTT
TTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCTCGTGATACGCTATTTTTATAGGTTAATGTATGATAATAATGGTTTCTTA
GACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAG
ACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGATGAGTATTCACATTTCCGTGTGCGCTTATTTCCCTTTTTTGC
GGCATTTTGCTTCTGCTTTTGTCTACCCGAAACGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATGCTGAAGTGGGTGACAGTGGGTGAGTTAC
CGAAGTGGATCTCAACGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAAGAGCTTTTCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATG
TGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACC
AGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTT
ACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAATCGCCTTGATCCTTGGGAACC
GGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCA

ACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGC
TGGCTGGTTTATTGCTGATAAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCG
TATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCA
TTGGTAAGTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACCTTCATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCT
TTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTG
AGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTGCCGGATCAAGAGCTACC
AACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAA
GAAGTCTGTAGCACCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTT
GGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTA
CACCGAAGTGTAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAG
GGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGA
GCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAACGCGCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGCTG
GCCTTTTGCTCACATGT

II. Protocole interne du laboratoire pour l'injection, l'anesthésie et la perfusion des rats

PROTOCOLE D'INJECTION

Nom de l'étude : BC-07-01

Titre de l'étude : Test des virus promoteurs neuro-spécifiques

Date de début de l'étude : 14.12.07

Fin prévue de l'étude : 04.01.08

N° Autorisation : 1653.3

Expiration de l'Autorisation : 31.10.09

Expérimentateur(s) : Jonathan Thevenet / Bernard Schneider/ Philippe Colin

1. Groupes d'animaux :

Espèce : ☒ rat ☐ souris

Nom	Nb animaux/groupe	Numéro des animaux
1. CMV-FPmax	3	1-3
2. Prion-FPmax	3	4-6
3. NSE-FPmax	4	7-10

2. Injection de virus

Type	Concentration Stock (TUs/ml)	Date de production	Dilution	Titre final (TUs/ml)
1. AAV-CMV-FPmax	4.8×10^{10}		2	2.4×10^{10}
2. AAV-Prion-FPmax	4.67×10^{10}	23.11.07	1.9	2.4×10^{10}
3. AAV-NSE-FPmax	3.59×10^{10}	23.11.07	1.5	2.4×10^{10}

Type d'injection : ☐ Unilatérale ☒ 1 site/ hémisphère
☒ Bilatérale ☐ 2 sites/ hémisphère
☐ 3 sites/ hémisphère

☐ 4 sites/ hémisphère

Coordonnées d'injection : ☒ Par rapport au Bregma

☐ Par rapport au Lambda

Site 1

Site 2

Antéro-postérieur : -5.2

Antéro-postérieur : -5.2

Latéral : -2

Latéral : +2

Ventral : -7.8

Ventral : -8.2

Tooth bar : 0.0

Tooth bar : 0.0

Site d'injection :

☐ Striatum

☒ Substance noire

☐ Cortex

☐ Moelle épinière

☐ Autre (à préciser) ...

Vitesse d'injection : 0.2 µl/min

Volume d'injection : 2 µl/site

3. Suture

☒ Fil

☐ Agrafes

☐ Autres : ...

4. Soins des animaux

Pré chirurgie : Raser la zone à opérer et désinfecter avec de la Bétadine[®]

Pendant chirurgie :

1. L'animal opéré est placé sur une couverture chauffante, la queue repliée sous lui, enveloppé dans du papier aluminium.
2. Contrôler la température en milieu d'expérience pour détecter une éventuelle hypothermie.
3. Appliquer du gel "larmes artificielles" sur la cornée dès que l'animal est anesthésié.

Post chirurgie :

1. Contrôle du réveil des animaux avant sortie de la zone.
2. Paracétamol effervescent directement dans le biberon : 1 g/biberon pour cage de **rats** et 500 mg/biberon pour cage de **souris**.

PROTOCOLE D'INJECTION

Nom de l'étude : BC-07-02

Titre de l'étude : Test des virus promoteurs neuro-spécifiques

Date de début de l'étude : 27.12.07

Fin prévue de l'étude : 10.01.08

N° Autorisation : 1653.3

Expiration de l'Autorisation : 31.10.09

Expérimentateur(s) : Jonathan Thevenet / Bernard Schneider/ Philippe Colin

1. Groupes d'animaux :

Espèce : ☒ rat ☐ souris

Nom	Nb animaux/groupe	Numéro des animaux
1. CMV-FPmax	4	1-4
2. Syn-FPmax	5	5-9
3. CMV-FPmax-miR133b	5	10-14

2. Injection de virus

Type	Concentration Stock (TUs/ml)	Date de production	Dilution	Titre final (TUs/ml)
1. AAV-CMV-FPmax	4.8×10^{10}		2	2.4×10^{10}
2. AAV-Synapsin-FPmax		14.11.07		2.4×10^{10}
3. AAV-CMV-FPmax-133b		14.11.07		2.4×10^{10}

PROTOCOLE D'ANESTHESIE

Nom de l'étude : BC-07-01 et BC-07-02

Titre de l'étude : Test des virus promoteurs neuro-spécifiques

Date de début de l'étude : 14.12.07

Fin prévue de l'étude : 10.01.08

N° Autorisation : 1653.3

Expiration de l'Autorisation : 31.10.09

Expérimentateur(s) : Jonathan Thevenet / Bernard Schneider/ Philippe Colin

Anesthésie de courte durée des rongeurs (rats) :

Anesthésiques utilisés (concentrations à écrire pour demande d'autorisation animale) :

Narcoxyl® 2 (xylazine) : Solution à 2g/100ml ; utilisée à 10mg/kg i.p.

Ketaminol® 10 (ketamine) : Solution à 10g/100ml ; utilisée à 75mg/kg i.p.

Préparation de la solution pour l'anesthésie du rat :

Narcoxyl® 2 1x 10mg/kg

Ketaminol® 10 1.5x 75mg/kg

Préparer le mélange ci-dessus : poids de l'animal en grammes (x 1.25) = nombre de microlitres à injecter

PROTOCOLE DE PERFUSION

Nom de l'étude : BC-07-01

Titre de l'étude : Test des virus promoteurs neuro-spécifiques

Date de début de l'étude : 14.12.07

Fin prévue de l'étude : 10.01.08

N° Autorisation : 1653.3

Expiration de l'Autorisation : 31.10.09

Expérimentateur(s) : Jonathan Thevenet / Bernard Schneider/ Philippe Colin

Sacrifice des animaux :

Nom du groupe	Numéro des animaux	Date de sacrifice
1. CMV-FPmax	1-3	4.01.08
2. Prion-FPmax	4-6	4.01.08
3. NSE-FPmax	7-10	4.01.08
3. CMV-FPmax	1-4	10.01.08
4. Syn-FPmax	5-9	10.01.08
5. CMV-FPmax-miR133b	10-14	10.01.08

☒ avec perfusion ☐ sans perfusion ☐ punch(s) : ☒ prélèvement(s) : Cerveau

Perfusion intracardiaque :

Anesthésie des animaux par surdose de pentobarbital 150mg/kg.

Perfusion Tampon Phosphate (voir protocole en Histologie) + 5000 U Liquemin/litre, puis perfusion Tampon Phosphate, PFA 4 %.

Perfusion standard :

	<u>Rat</u>	<u>Souris</u>
Pré wash	80 ml/1 min	30 ml/1 min
PFA 4%	200 ml/5 min	100 ml/5 min