



Étude fonctionnelle de la nucléoline chez la souris

Hélène Delage

► To cite this version:

Hélène Delage. Étude fonctionnelle de la nucléoline chez la souris : Mise en place et caractérisation d'un modèle Knock-Out conditionnel. Sciences du Vivant [q-bio]. 2016. hal-01548136

HAL Id: hal-01548136

<https://ephe.hal.science/hal-01548136>

Submitted on 27 Jun 2017

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

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

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

Présenté par Hélène Delage

Pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes

Etude fonctionnelle de la nucléoline chez la souris

Mise en place et caractérisation d'un modèle Knock-Out conditionnel

Soutenu le 15 décembre 2016 devant le jury suivant :

M. Jean-Marie Exbrayat– Président
M. Fabien Mongelard– Tuteur scientifique
Mme Jessie Colin– Tuteur pédagogique
Mme Sabine Richard– Rapporteur
M. Anthony Henras– Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

M. Fabien Mongelard
Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon -
Equipe Domaines Nucléaires et Pathologie (Responsable : J.J Diaz)
28, rue Laennec – 69008 Lyon
Direction : M. Alain Pusieux

Et de

Mme Jessie Colin
Laboratoire de Génétique et Biologie Cellulaire
Laboratoire Génétique Moléculaire et Physiologique
2 avenue de la Source de la Bièvre
78180 Montigny-le-Bretonneux
Direction : M. Bernard Mignotte

Etude fonctionnelle de la nucléoline chez la souris

Mise en place et caractérisation d'un modèle Knock-Out conditionnel

A mes parents

A ma famille

A toutes les personnes que je porte dans mon cœur

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier **Philippe Bouvet**, qui m'a accueillie dans son équipe en 2005 à l'ENS, et a osé me confier la réalisation de ce projet malgré le peu de compétences que j'avais en expérimentation animale et dans la conduite d'un projet scientifique.

Un immense merci à **Fabien Mongelard** qui m'a incitée à suivre cette formation EPHE et qui a accepté d'être mon tuteur scientifique. Je n'oublierai jamais les nombreuses heures passées à m'épauler dans la rédaction de mes devoirs d'analyse d'articles et surtout dans la rédaction de ce manuscrit. Merci pour ta disponibilité malgré ton agenda d'enseignant chargé, merci pour ta patience et ton soutien quand j'avais le moral dans les chaussettes, merci pour ta pédagogie qui m'a permis d'avoir un peu plus confiance en moi. Mille mercis.

Ce travail n'aurait pas pu se faire sans la participation de **Nicole Martinez**, alias **Maggy**, qui a assuré le travail, parfois fastidieux mais indispensable, de génotypage de nos petites bêtes. Je n'ai pas d'autre mot que MERCI. Merci pour ton soutien, ta présence et ton amitié que j'ai souvent malmenée par mon mauvais caractère. Merci pour toute l'aide que tu m'as apportée quand j'ai pris la décision de m'occuper de Gribouille, puis de Iota, ces chiens guides d'aveugles en formation que nous avions dans le bureau du LJC. Nos pauses café/thé, tes bons gâteaux, tes paniers de Genas et nos récréations sont des moments inoubliables.

Si ce travail a pu être mené à bien, c'est également grâce à la participation et la gentillesse inestimable de **tout le personnel du PBES**. Merci à **Céline Angleraux** d'avoir pris soin de nos centaines de souris. Merci à **Jean-Louis Thoumas** et **Marie Teixeira** pour leurs précieux conseils administratifs et techniques. Merci à **Agnès Couzon** pour m'avoir appris la culture d'embryons...j'ai encore des progrès à faire pour les flushs !!

Plusieurs personnes ont participé à ce projet, qu'elles en soient aussi remerciées : **Laurence Dutron-Belgarbi** qui m'a transmis sa maîtrise de la perfusion intra-cardiaque ; **Dominique Baas** pour le savoir-faire de la congélation et des coupes d'embryons ; **Alexandre Mejat** et **Delphine Bauer** qui ont réalisé les expériences de jonctions neuromusculaires ; les étudiants canadiens et danois : **Claire, Christian, John** et **Yujin**, chacun d'eux a mis son grain de sel dans les expériences. Un merci particulier à **Sabine Richard** qui nous a conseillée, guidée dans les expériences de comportement et qui a accepté d'évaluer ce travail.

Je ne peux pas oublier **Christophe Terzian** mon tuteur pédagogique qui m'a donné de précieux conseils pendant trois ans. Je remercie **Jessie Colin** qui, après le décès de Christophe, a pris au pied levé la suite du tutorat. Merci pour le temps passé à la relecture de ce manuscrit dans un délai restreint. Vos corrections m'ont permis d'être plus précise et rigoureuse.

Je remercie **tous les membres du LJC**. Je n'ai malheureusement pas la place de tous les nommer mais que chacun soit remercié de cette belle aventure humaine et scientifique. Dommage, qu'elle soit terminée, j'en garde d'excellents souvenirs.

Je tiens enfin à remercier **Jean-Jacques Diaz** et **toute l'équipe DNP** pour l'accueil reçu à notre arrivée. Un merci plus spécifique à **Jenny, Virginie** et **Fleur** qui m'ont soutenue et conseillées pendant les corrections de ce manuscrit.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	4
Liste des abréviations.....	9
Liste des figures.....	10
Liste des tableaux.....	11
<i>Introduction</i>	12
1. La nucléoline	13
1.1 <i>Le gène Ncl</i>	14
1.2 <i>La structure protéique de NCL</i>	14
1.2.1 Le domaine N-Terminal	15
1.2.2 Le domaine central.....	16
1.2.3 Le domaine C-terminal.....	16
1.2.4 Les modifications post-traductionnelles	17
1.2.4.1 La phosphorylation	17
1.2.4.2 La méthylation	18
1.2.4.3 La glycosylation.....	18
1.2.4.4 L'acétylation	19
1.2.4.5 L'ADP-ribosylation	19
1.2.4.6 La SUMOylation	19
1.3 <i>Localisation et fonctions associées</i>	20
1.3.1 La fonction nucléolaire de NCL.....	20
1.3.1.1 NCL régule la transcription par RNAPI	22
1.3.1.2 NCL participe à la maturation des ARNr et la biogenèse des ribosomes.....	24
1.3.1.3 NCL interagit avec la télomérase humaine	25
1.3.2 Le rôle de NCL dans le nucléoplasme	25
1.3.2.1 NCL modifie la structure de la chromatine par une activité de chaperone d'histones	25
1.3.2.2 NCL intervient dans la prolifération, la survie cellulaire et la régulation du cycle cellulaire	26
1.3.2.3 NCL agit comme facteur de transcription et contrôle la transcription d'oncogènes	27
1.3.3 La fonction cytoplasmique de NCL	28
1.3.3.1 NCL participe à la régulation de la traduction	28
1.3.3.2 NCL participe à la régulation de la stabilité des ARNm.....	29
1.3.3.3 NCL est impliquée dans la duplication du centrosome et la stabilité des microtubules	30
1.3.4 Le rôle de NCL à la membrane plasmique.....	31
1.3.5 NCL participe à la réponse au stress	32
1.4 <i>La nucléoline dans les maladies neurodégénératives</i>	35
1.4.1 NCL et la maladie d'Alzheimer	35
1.4.2 NCL et les maladies à polyglutamine.....	36
1.4.3 NCL et la démence frontotemporale (FTD)	36
2. Modèle murin pour l'invalidation conditionnelle du gène <i>Ncl</i>	38
2.1 <i>Principe de la recombinaison par le système Cre/loxP</i>	38

2.2	<i>Le contrôle de la transcription de la recombinaise Cre</i>	39
2.3	<i>Le contrôle de l'activité de la recombinaise Cre par induction chimique</i>	41
2.4	<i>Les points de vigilance vis-à-vis du système Cre-loxP</i>	42
	Objectifs	44
	Matériel et Méthodes	46
1.	Expérimentation animale	47
1.1	<i>Les souris utilisées</i>	47
1.1.1	Lignée NCL flox	47
1.1.2	Lignée Nestin-Cre	48
1.1.3	Lignée Nestin-Cre (FT)	48
1.1.4	Lignée RosaCreER ^{T2}	48
1.2	<i>Les conditions d'hébergement</i>	49
1.3	<i>L'administration du tamoxifène</i>	50
1.4	<i>Le prélèvement d'organes</i>	50
1.4.1	Echantillons à destination d'études de biologie moléculaire et biochimiques	51
1.4.2	Echantillons à destination d'études histologiques	51
1.5	<i>Les tests de comportement</i>	52
1.5.1	Test de l'open field	52
1.5.2	Test de lumière et zone sombre.....	53
1.5.3	Test de la barre horizontale	53
1.5.4	Test des barres parallèles.....	54
1.5.5	Analyse de la démarche	54
1.6	<i>Le suivi de gestation</i>	56
1.7	<i>Administration de BrdU</i>	56
1.8	<i>La culture d'embryon</i>	56
2.	Biologie moléculaire et biochimie	57
2.1	<i>Le génotypage</i>	57
2.1.1	Extraction d'ADN génomique (ADNg)	58
2.1.2	Analyse du locus <i>Ncl</i>	58
2.1.3	Détermination de la présence des transgènes <i>Nestin-Cre</i> et <i>Nestin-Cre</i> (FT)	59
2.1.4	Détermination de la présence du transgène <i>Rosa-CreER^{T2}</i>	60
2.1.5	Electrophorèse sur gel d'agarose	61
2.2	<i>Extraction d'ADN, ARN et protéines</i>	61
2.3	<i>Electrophorèse des protéines par SDS-PAGE</i>	61
2.4	<i>Western Blot</i>	62
2.5	<i>Dosage du cholestérol</i>	63
3.	Histologie et immunomarquages	64
3.1	<i>Conditionnement des échantillons</i>	64
3.1.1	Inclusion en paraffine.....	64
3.1.2	Inclusion en gélatine-sucrose	64

3.2	La réalisation de coupes d'échantillons	65
3.2.1	Coupe au microtome.....	65
3.2.2	Coupe au cryotome.....	65
3.3	Analyse histologie des coupes par coloration	66
3.4	Expériences d'immunofluorescence.....	66
3.4.1	Détection du BrdU sur coupes de cerveaux.....	66
3.4.2	Analyse des jonctions neuromusculaires	67
	Résultats	69
1.	Le génotypage des souris	70
1.1	Détermination des allèles de <i>Ncl</i>	70
1.2	Détermination de la présence des transgènes <i>Cre</i>	72
2.	Vérification des effets des séquences <i>loxP</i> chez les souris de la lignée « NCL flox »	73
3.	Effets de l'inactivation de <i>Ncl</i> chez l'adulte	74
3.1	Conditions expérimentales de l'expérience pilote.....	74
3.2	La perte totale de <i>Ncl</i> entraîne une perte de poids rapide et la mort de l'animal.	75
3.3	La recombinaise <i>CreER^{T2}</i> activée provoque la délétion de <i>Ncl</i>	77
3.3.1	Efficacité de la délétion à J9	78
3.3.2	Maintien de la délétion au cours du temps chez les souris <i>Ncl^{+/-} CreER^{T2+/-}</i> après injections de tamoxifène	79
3.4	La perte totale de <i>Ncl</i> entraîne une diminution de la quantité de NCL dans les organes	80
3.5	D'éventuelles variations de cholestérolémie chez les souris mutantes sont masquées par l'effet du tamoxifène.	82
4.	Effets de l'inactivation de <i>Ncl</i> au cours du développement	84
4.1	Etude de l'inactivation de <i>Ncl</i> dans la lignée « NCL Nestin- <i>Cre</i> ».....	84
4.1.1	Croisement pour l'obtention des souris hétérozygotes <i>Ncl^{+/-} ; Nestin-<i>Cre</i>^{+/-}</i>	84
4.1.2	L'haploinsuffisance de <i>Ncl</i> n'est pas viable.	85
4.1.3	L'haploinsuffisance de <i>Ncl</i> est compatible avec le développement <i>in utero</i>	86
4.1.4	Le KO homozygote pour <i>Ncl</i> est incompatible avec le développement <i>in utero</i>	88
4.1.5	L'inactivation de <i>Ncl</i> provoque des anomalies comportementales et cérébrales.	90
4.1.5.1	L'haploinsuffisance de <i>Ncl</i> entraîne un comportement anormal	90
4.1.5.2	La viabilité requiert la présence des deux allèles sauvages de <i>Ncl</i>	90
4.1.5.3	NCL à l'état hétérozygote est nécessaire au développement du système nerveux central.	92
4.2	Etude de l'inactivation de <i>Ncl</i> dans la lignée « <i>Ncl Nestin-<i>Cre</i> (FT)</i> ».....	93
4.2.1	L'inactivation de <i>Ncl</i> par l'un ou l'autre des transgènes <i>Nestin-<i>Cre</i></i> a des conséquences similaires.	94
4.2.2	Effets de l'inactivation de <i>Ncl</i> sur les paramètres biologique des souris mosaïques adultes	96
4.2.2.1	Les souris mosaïques ont un poids comparables aux souris contrôles.	96
4.2.2.2	La perte d'un allèle de <i>Ncl</i> provoque une hypoplasie du cervelet	97
4.2.2.3	L'haploinsuffisance de <i>Ncl</i> dans le cerveau provoque une diminution du taux de NCL.	98
4.2.2.4	La perte d'un allèle de <i>Ncl</i> n'induit pas de défauts aux jonctions neuromusculaires.	100
4.2.3	Effet de l'inactivation de <i>Ncl</i> sur le comportement des souris mosaïques.	101
4.2.3.1	La perte d'un allèle de <i>Ncl</i> dans le cerveau réduit l'activité exploratoire.	101
4.2.3.2	Les souris mosaïques ne sont pas anxieuses.	104

4.2.3.3	La perte d'un allèle de <i>Ncl</i> dans le cerveau affecte force et coordination.	105
4.2.3.4	L'équilibre des souris mosaïques est atteint.	106
4.2.3.5	La démarche des souris mosaïques est altérée	107
4.2.4	Effet de l'inactivation de <i>Ncl</i> sur le cervelet en développement.	109
4.3	<i>Etude de l'inactivation de Ncl dans les premiers stades de développement de l'embryon</i>	110
Discussion.....		113
1.	La transmission germinale de la délétion est un événement rare.	114
2.	L'inactivation totale de <i>Ncl</i> dans le système nerveux central provoque une anencéphalie.	116
3.	Le niveau d'expression de <i>Ncl</i> est critique pour le développement du système nerveux.	116
4.	La perte d'un allèle <i>Ncl</i> est tolérée chez l'adulte.	118
5.	Conclusion	120
Bibliographie		121
Annexes		131
Résumé		140

Liste des abréviations

ADNg : Acide désoxyribonucléique génomique
ADP : Adénosine diphosphate
APS : Ammonium persulfate
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ARNr : ARN ribosomiques
BET : Bromure d'éthidium
BrdU : bromodésoxyuridine
cKO : conditional Knock-Out
Cre : Cyclic recombinase
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
DFC : Dense fibrillar component
dpc : day post coitum
ECM : Evolutionary conserved motif
EDTA : Éthylène diamine tétra-acétique
ETS : External transcribed spacers
FC : Fibrillar center
flox : Flanked by LoxP
GAR : Glycine-Arginine-Rich
GC : Granular component
i.p : intrapéritonéale
ITS : Internal transcribed spacers
KO : Knock – Out
loxP : Locus of X-over P1
Ncl : Nucléoline
NLS : Nuclear localization signal
NRE : Nucleolin recognition element
pb : paire de base
PBES : Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris
PBS : Phosphate buffered salin
PCR : Polymerase chain reaction
PFA : Paraformaldehyde
RBD : RNA-Binding Domain
RNAi : Ribonucleic acid interference
RNAPI : ARN polymerase I
SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulphate – Polyacrylamide Analysis Gel Electrophoresis
snoRNA : small nucleolar RNA
SUMO : Small Ubiquitin-like MOdifier
TAE : Tris Acétate EDTA
TEMED : Tetramethylethylenediamine
UTR : Untranslated region
UV : Ultraviolet

Liste des figures

Figure 1 – Séquence primaire de la nucléoline de souris (mNCL).	15
Figure 2 – Localisation de NCL dans le nucléole d'un le noyau.	21
Figure 3 – Schéma d'un pré-ARNr avant maturation.	24
Figure 4 – Schéma récapitulatif des différentes localisations et principales fonctions connues de NCL.	34
Figure 5 – Le système Cre-loxP.	39
Figure 6 – Mécanisme d'action de la recombinase CreER induite par le tamoxifène.	42
Figure 7 – Schéma du gène Ncl et cible du KO conditionnel.	48
Figure 8 – Schémas explicatifs pour l'analyse de la démarche.	55
Figure 9 – La stratégie de génotypage permet d'identifier les allèles du gène Ncl.	59
Figure 10 – Position des amorces sur le transgène Rosa-CreER ^{T2} .	60
Figure 11 – Résultats des PCR de génotypage des échantillons.	72
Figure 12 – Fréquences des génotypes obtenus dans les naissances issues de croisements entre souris Ncl ^{+/-} .	73
Figure 13 – Courbe de l'évolution du poids des souris de différents génotypes suite au traitement au tamoxifène.	76
Figure 14 – Courbes de survie du groupe contrôle et expérimental après injection d'huile ou de tamoxifène.	77
Figure 15 – Génotypage sur des organes de souris hétérozygotes et homozygotes pour Ncl après traitement ou non au tamoxifène.	78
Figure 16 – Génotypage de différents tissus de souris Ncl ^{+/-} au cours du temps après injection de tamoxifène.	80
Figure 17 – Evaluation de la quantité de protéine NCL dans plusieurs organes après traitement au tamoxifène (A) et quantification du ratio NCL/actine (B).	81
Figure 18 – Evaluation de la quantité de protéine NCL dans le foie après traitement au tamoxifène et au cours du temps chez les souris Ncl ^{+/-} CreER ^{T2} .	82
Figure 19 – Concentration du cholestérol total à J1 et J8 chez les souris contrôles et homozygotes, après injection de tamoxifène.	83
Figure 20 – Morphologie de la tête des mort-nés Ncl ^{+/+} ; Nestin-Cre ^{+/-} et Ncl ^{fl/Δ} ; Nestin-Cre ^{+/-} .	93
Figure 21 – Comparaison des poids des souris mâles contrôles et mutantes à l'âge adulte.	97
Figure 22 – Comparaison des cervelets des souris contrôle versus mutant.	98
Figure 23 – Evaluation de la quantité de Ncl sur le cerveau et le cervelet de trois souris contrôles Ncl ^{+/+} ; Nestin-Cre(FT) ^{+/-} (vert) et quatre souris mosaïques Ncl ^{+/-} Δ, Nestin-Cre(FT) ^{+/-} (rouge et blanc).	99
Figure 24 – Analyse des jonctions neuromusculaires sur des fibres musculaire du tibialis anterior.	100
Figure 25 – Evaluation des déplacements des souris contrôles et mutantes dans l'exploration d'un nouvel espace. Test de l'open field.	102
Figure 26 – Analyses du test de l'open field.	103
Figure 27 – Caractéristiques des mouvements des souris contrôles et mosaïques dans l'open field.	104
Figure 28 – Evaluation de l'anxiété et du comportement exploratoire des souris contrôles et mutantes. Light & dark box.	105
Figure 29 – Paramètres et analyse du test de la barre horizontale.	106
Figure 30 – Analyse du test des barres parallèles.	107
Figure 31 – Analyses par empreintes de la démarche de souris contrôles et mutantes.	108
Figure 32 – Coupes confocales dans un cervelet de souris à P11 sauvage (A-D) ou mosaïque (E-H).	110
Figure 33 – Culture d'embryons de différents génotypes +/- tamoxifène 1μM.	112

Liste des tableaux

Tableau I - Paramètres d'hébergement.	49
Tableau II - Conditions expérimentales de l'étude pilote pour évaluer l'effet de l'inactivation du gène Ncl.	75
Tableau III - Fréquence des génotypes obtenus lors du croisement $Ncl^{f/f} \times Nestin-Cre^{+/-}$	85
Tableau IV - Répartition des génotypes obtenus lors de croisements $Ncl^{+/f/\Delta} ; Nestin-Cre^{+/-} \times Ncl^{+/+}$	86
Tableau V - Répartition des génotypes obtenus lors de croisements $Ncl^{+/f/\Delta} ; Nestin-Cre^{+/-} \times Ncl^{f/f}$	87
Tableau VI - Répartition des génotypes obtenus lors de croisements $Ncl^{+/f/\Delta} ; Nestin-Cre^{+/-} \times Ncl^{+/f/\Delta} ; Nestin-Cre^{+/-}$	89
Tableau VII - Synthèse des naissances de plusieurs croisements incluant les mort-nés pour chaque génotype. .	91
Tableau VIII - Répartition des génotypes et nombre de mort-nés obtenus lors de croisements $Ncl^{+/f/\Delta} ; Nestin-Cre(FT)^{+/-} \times Ncl^{+/f}$	95
Tableau IX - Conditions expérimentales pour la culture d'embryon +/- 1 μ M 4-OHT	111
Tableau X - Tableau récapitulatif des effets observés suite à l'inactivation de Ncl au cours du développement.	118

Introduction

Ce travail a été réalisé, de 2012 à 2015, à l'Ecole Normale Supérieure de Lyon dans le Laboratoire Joliot-Curie et plus particulièrement au sein de l'équipe « Assemblage de la chromatine et biogenèse du ribosome » dirigée par Philippe Bouvet, puis au sein de l'équipe « Domaines Nucléaires et Pathologiques » au Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, à partir de 2016.

L'équipe de P. Bouvet s'intéresse aux fonctions de la nucléoline, une protéine multifonctionnelle nucléolaire, que l'on retrouve dans d'autres compartiments cellulaires. La nucléoline (NCL) est connue pour être impliquée dans la transcription des ARN ribosomiques (ARNr) et leur maturation. En plus de ces fonctions nucléolaires, qui restent à caractériser complètement, la nucléoline est impliquée dans de très nombreux processus nucléaires. Ainsi, l'équipe a montré que NCL possède une activité de chaperonne d'histone et peut moduler l'activité de certains facteurs de remodelage de la chromatine ; et que dans le cytoplasme NCL possède des propriétés stabilisantes sur le réseau de microtubules.

D'autres équipes étudiant cette protéine ont décrit une palette de rôles très étendue, allant jusqu'à des fonctions au niveau de la membrane cellulaire. Par ailleurs, l'étude de NCL est également pertinente d'un point de vue médical. Par exemple, NCL est surexprimée dans de nombreux cancers, et elle joue un rôle dans certaines pathologies neurodégénératives.

Ce mémoire décrit la mise en place du premier modèle murin pour inactiver *in vivo* le gène *Ncl*. Il devrait permettre de faciliter le décryptage des fonctions de NCL sur l'organisme entier mais aussi dans le système nerveux central.

1. La nucléoline

La nucléoline (NCL) est une protéine multifonctionnelle, dont le nom provient de sa principale localisation : le nucléole. Elle est impliquée dans de nombreux mécanismes cellulaires, interagit avec l'ADN, l'ARN et des protéines. Initialement identifiée en 1973 chez le rat (Orrick et al., 1973), elle est présente chez tous les vertébrés et des protéines homologues sont identifiées chez les levures *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* ou encore chez les plantes comme le pois, l'oignon, le riz, le maïs ou *Arabidopsis thaliana* (Ginisty et al., 1999)

Cette première partie décrit le gène, la structure de NCL avec les modifications post-traductionnelles qu'elle peut subir, sa localisation associée aux fonctions qui lui sont actuellement attribuées et son implication dans certaines maladies.

1.1 Le gène *Ncl*

La nucléoline est codée par le gène *Ncl*, présent en une seule copie par génome haploïde chez les mammifères. Cependant des espèces, comme la carpe ou le xénope, possèdent jusqu'à trois copies du gène (Messmer and Dreyer, 1993; Quezada et al., 2006). Chez les plantes, deux gènes *NUC1* et *NUC2* sont présents tandis que le gène homologue chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* se nomme *NSR1* (Nuclear Signal Recognition) (Kondo and Inouye, 1992) ou *GAR2* (Glycine-Arginine-Rich 2) chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* (Gulli et al., 1995).

Le gène *Ncl* est localisé sur le chromosome 1 chez la souris et sur le chromosome 2 chez l'homme. Il est composé de 14 exons et 13 introns ; il couvre respectivement 9kb et 11 kb (Bourbon et al., 1988). Les introns 5, 11 et 12 contiennent des petits ARN nucléolaires appelés snoARN (small nucleolar RNA) nommés respectivement U82, U20, et U23 (Nicoloso et al., 1994; Rebane and Metspalu, 1999). Ces snoRNA sont produits à partir du transcrit du gène. Ils participent à la maturation des ARN ribosomiques (ARNr) : U20 et U82 sont impliqués dans la méthylation de l'ARN 18S tandis qu'U23 intervient dans la pseudouridination de cet ARN.

1.2 La structure protéique de NCL

La nucléoline murine (mNCL) et la nucléoline humaine (hNCL) sont composées de 706 et 709 acides aminés respectivement. L'analyse de la séquence protéique de NCL montre une conservation de la structure primaire entre les espèces. Par exemple, la séquence d'acides aminés de la nucléoline humaine (hNCL) est identique à 84% avec la séquence de la nucléoline murine (mNCL) et à 81 % avec la nucléoline de hamster (M. Srivastava et al., 1989). On distingue trois domaines dans la protéine : domaine N-terminal, domaine central et domaine C-terminal (Figure 1) décrits ci-après (Ginisty et al., 1999). La masse moléculaire apparente de cette protéine est observée autour de 100-110 kDa en gel d'électrophorèse alors que l'analyse de sa séquence primaire la prédit à ~77 kDa (Lapeyre et al., 1987). La différence de masse est attribuée à la composition en acides aminés du domaine N-terminal (Ginisty et al., 1999).

10 20 30 40 50

```

MVKLAKAGKT HGEAKKMAPP PKEVEEDSED EEMSEDEDD SGEEEVVIPQ
KKGKKATTTT AKKVVSQTK KAAVPTPAKK AAVTPGKKAV ATPAKKNITP
AKVIPTPGKK GAAQAKALVP TPGKKGAATP AKGAKNGKNA KKEDSDEDED
EEDEDDSDDED EDDEEEDEFEE PPIVKGVPKA KAAPAAPASE DEEDDEDEDD
EEDDDDEEED DSEEEVMEIT TAKGKTPAK VVPMKAKSVA EEEDDEEEDE
DDEDEDDEEE DDEDDDEEEE EEEPVKAAPG KRKKEMTKQK EAPEAKKQKV
EGSEPTTPFN LFIGNLNPNK SVNELKFAIS ELFAKNDLAV VDVRTGTNRK
FGYVDFESAE DLEKALELTG LKVFGEIKL EKPKG RDSKK VRAARTLLAK
NLSFNITEDE LKEVFEDAME IRLVSQDGKS KGIAYIEFKS EADAEKNLEE
KQGA EIDGRS VSLYYTG EKG QRQERTGKTS TWSGES KTLV LSNLSYSATK
ETLEEVFEKA TFIKVPQNPH GKPKGYAFIE FASFEDAKEA LNSCNKMEIE
GRTIRLELQG SNSRSQPS KT LFVKGLSEDT TEETLKESFE GSVRARIVTD
RETGSSKGFG FVDFNSEEDA KAAKEAMEDG EIDGNKVTLD WAKP KEGGGF
GGRGGGRGGF GGRGGGRGGR GGFGRGRGG FGGRGGFRGG RGGGGDFKPQ
GKKTKFE

```

Domaine N-terminal NLS RBD Domaine C-terminal

Acides Aminés chargés **Négativement (DE)** ; **Positivement (KRH)** ; **Hydrophobes (ALIVMW)**

Figure 1 – Séquence primaire de la nucléoline de souris (mNCL).

Protéine de 706 acides aminés, elle est composée de 3 domaines N-terminal, central et C-terminal. Le NLS est une séquence permettant la localisation de NCL dans le noyau. Le domaine central est constitué de 4 RBD qui fixent les ARNm et pré-ARNr tandis que le domaine C-terminal interagit avec des protéines. De nombreux sites pour des modifications post-traductionnelles sont identifiés tout le long de la protéine. Ces modifications affectent localisation et fonctions de NCL.

NLS : Nuclear Localization Signal ; RBD : RNA Binding Domain

1.2.1 Le domaine N-Terminal

Ce domaine s'étend sur les 300 premiers résidus. Il est chargé négativement et dit acide car plusieurs segments riches en acide glutamique et aspartique le constituent (Ginisty et al., 1999; Meera Srivastava et al., 1989). Ces zones acides interagissent avec des protéines, notamment avec l'histone H1 ce qui induirait la décondensation de la chromatine (Erard et al., 1988), mais aussi avec des protéines ribosomiques et la particule ribonucléoprotéique snoRNP U3 (small nucleolar RiboNucleoParticle : complexe comprenant l'ARN non codant U3 et des protéines impliquées dans la maturation des ARNr précurseurs dits pré-ARNr) (Ginisty et al., 1998). Ces régions acides sont responsables du caractère argyrophyle de NCL puisqu'elles sont capables de réduire l'argent lors d'une coloration au nitrate d'argent (Roussel et al., 1992), utilisée notamment pour le diagnostic des cancers (Trerè, 2000). Par ailleurs, ce domaine possède de multiples sites de phosphorylation (Belenguer et al., 1990) et des sites de protéolyse.

1.2.2 Le domaine central

Chez la souris, le domaine central est constitué de quatre domaines de liaison à l'ARN appelés RBD (RNA Binding Domain) alors qu'il n'y en a que deux chez les levures (*S. cerevisiae* et *S. pombe*) et les plantes (*A. thaliana*, pois, oignon...). Ce domaine central se situe entre les résidus 309 et 644 (Figure 1). Les quatre RBD sont issus des exons 6 à 13 et sont composés d'environ 80 acides aminés chacun (Bourbon et al., 1988).

La nucléoline interagit avec deux motifs d'ARN cibles différents : les motifs NRE et ECM. Le NRE (Nucleolin Recognition Element) est un motif tige-boucle, qui contient la séquence U/G CCCGA. Les RBD 1 et RBD 2 sont requis pour avoir une interaction spécifique avec ce motif (Ghisolfi-Nieto et al., 1996; Bouvet et al., 1997). Les NRE sont notamment présents sur les pré-ARNr, d'où des interactions fortes avec NCL (Ghisolfi-Nieto et al., 1996; Serin et al., 1996). Le motif ECM (Evolutionary Conserved Motif) est une séquence simple brin d'ARN de 11 nucléotides. Il est conservé chez les vertébrés et se situe 5 nucléotides en aval du premier site de clivage du pré-ARN. Les 4 RBD interagissent avec ECM et cette interaction est requise pour cliver les pré-ARNr de manière précoce (Ginisty et al., 2001, 1998).

En amont du RBD 1 se trouve un signal de localisation nucléaire bipartite NLS (Nuclear Localization Signal), codé par l'exon 5. Chez le poulet, le NLS a été localisé sur les résidus 256 à 273 et a pour séquence KRKKEMANKSAPEAKKKK (Schmidt-Zachmann and Nigg, 1993).

1.2.3 Le domaine C-terminal

Le domaine C-terminal, aussi appelé domaine GAR (Glycine Arginine Rich), tire son nom de la succession du motif RGG, Arginine (R), Glycine (G). Il est également riche en phénylalanine (Figure 1). La longueur de ce domaine est variable selon les nucléolines, les séquences et les arrangements des répétitions ne sont pas bien conservés. Par exemple, chez les plantes le domaine GAR est plus long que chez les mammifères (Ginisty et al., 1999). Ce domaine lie des ARN de manière non spécifique et avec une faible affinité, joue un rôle dans la localisation nucléolaire de NCL et dans l'interaction avec des protéines ribosomiques (Bouvet et al., 1998). Tuteja et collaborateurs ont identifié une activité d'hélicase ATP-dépendante à ce domaine, permettant à hNCL de dérouler les duplex ARN/ARN, ARN/ADN et ADN/ADN en déstabilisant les doubles hélices en présence d'ATP (Tuteja et al., 1995). Il a été proposé que ce domaine puisse adopter une conformation hélicoïdale, en raison de la

répétition régulière du motif RGG. Les chaînes latérales des résidus arginine et phénylalanine en interagissant avec les phosphates et les bases de l'ARN, respectivement, faciliteraient le dépliement des régions du pré-ARNr responsables de l'encombrement stérique rendant ainsi l'ARN accessible au domaine central (Ghisolfi et al., 1992).

1.2.4 Les modifications post-traductionnelles

NCL subit des modifications post-traductionnelles sur certains de ses acides aminés. Ces modifications chimiques sont à l'origine de la grande diversité de ses fonctions et de la modification de sa localisation.

1.2.4.1 La phosphorylation

La phosphorylation de NCL est la modification la plus connue ; d'ailleurs NCL est souvent caractérisée comme phosphoprotéine. C'est le domaine N-terminal qui est fortement phosphorylé (Mamrack et al., 1979) et NCL est le substrat de plusieurs kinases dont la Caséine Kinase II (CKII) (Caizergues-Ferrer et al., 1987) et CDK I (Cyclin-Dependent Kinase I) (Belenguer et al., 1990).

Les sites de phosphorylation par CKII ont été identifiés dans le domaine N-terminal à proximité des régions acides. Ces sites présentent les motifs SEDE (Xiao et al., 2014). Dans des cellules en croissance, CKII phosphoryle les résidus sérine (S) au cours de l'interphase, tandis que dans des cellules ne cyclant pas, NCL n'est plus phosphorylée (Belenguer et al., 1989). L'augmentation de l'activité de CKII et de NCL phosphorylée par CKII est corrélée avec une transcription active de l'ADNr, la synthèse d'ARNr, la croissance cellulaire et la prolifération (Schneider and Issinger, 1989). L'expression de mutants de NCL, non phosphorylables par CKII, diminue la proportion de cellules en phase S de près de 50 % et par conséquent diminue la prolifération. Cet effet semble médié par p53 qui se trouve stabilisée et activée par la présence de NCL non phosphorylée. Cette activation est accompagnée de l'apparition de marqueurs pro-apoptotiques (Xiao et al., 2014). La phosphorylation de NCL par CKII semble donc indispensable dans la prolifération cellulaire.

La phosphorylation par CDKI se produit sur les résidus thréonine (T) de NCL, plus particulièrement dans le domaine N-terminal à l'intérieur des répétitions basiques TPXKK, où X est un résidu non polaire. Ces répétitions sont présentes entre deux régions acides. Cette

phosphorylation se produit pendant la mitose et serait liée à la réorganisation de la chromatine nucléolaire (Belenguer et al., 1990).

1.2.4.2 La méthylation

La méthylation est l'ajout d'un ou plusieurs groupements CH₃ principalement sur les résidus arginine (R) et lysine (K). La méthylation de l'arginine se présente sous trois formes différentes : monométhylation, diméthylation asymétrique et symétrique, tandis que la lysine se trouve dans les formes mono-, di-, et triméthylation. De nombreuses méthyltransférases assurent ces modifications. Les lysines modifiées peuvent être déméthylées par des déméthylases (Guo et al., 2014). Dans la nucléoline, cette modification post-traductionnelle a été initialement trouvée sur les arginines du domaine GAR (Lapeyre et al., 1986). Dans une étude chez le rat, les nucléoles de cellules cancéreuses (Novikoff hepatoma) ont été isolés et NCL a été purifiée ; la composition en acides aminés a été déterminée par chromatographie (Lischwe et al., 1982). Les auteurs ont rapporté que près d'un tiers des résidus arginine sont méthylés faisant de NCL l'une des protéines du nucléole les plus méthylées (Lischwe et al., 1982). Ces résultats sont confortés par une étude plus récente utilisant des anticorps hautement spécifiques de différents motifs de méthylation pour immunopurifier des peptides méthylés qui ont été analysés par spectrométrie de masse (Guo et al., 2014). Trois résidus arginine dans le domaine central, et six dans le domaine C-terminal sont méthylés dans les cellules HCT116. Le résidu lysine K523 dans le domaine central est lui aussi méthylé probablement par Set7/9. Toutefois, le rôle de la méthylation de NCL, comme celle de nombreuses autres protéines, reste à définir. Il est potentiellement plus complexe que le rôle de la phosphorylation vue la diversité des modifications. Dans le cas des histones, la méthylation agit comme un signal reconnu par divers effecteurs qui entraînent la modification de la chromatine. De tels effecteurs restent à identifier pour NCL.

1.2.4.3 La glycosylation

La glycosylation est l'ajout de glucides sur la chaîne latérale des acides aminés. Il existe plusieurs types de glycosylation : fucosylation, galactosylation, N-glycosylation, O-glycosylation...

Il a été montré que dans les cellules d'ovaires du hamster chinois et dans les cellules humaines cancéreuses U937, NCL est glycosylée dans le domaine central (Lapeyre et al., 1987). Dans les cellules humaines immortalisées Jurkat, une portion de la nucléoline

extranucléaire est N- et O-glycosylée. Par analyse chromatographique et spectrométrie de masse, deux sites de N-glycosylation ont été localisés dans les RBD 1 et 3, sur les résidus N317 and N492 respectivement (Carpentier et al., 2005). Cette modification post-traductionnelle est indispensable pour l'expression de NCL à la surface cellulaire (Losfeld et al., 2009). Le paragraphe 1.3.4 traitera du rôle de NCL présente à la surface cellulaire.

Le profil de glycosylation de plusieurs protéines est modifié dans certains cancers dont celui du pancréas. NCL est l'une des protéines les plus affectées par ce phénomène (Hofmann et al., 2015). Les conséquences de ces altérations ne sont pas connues.

1.2.4.4 L'acétylation

L'acétylation consiste en l'ajout d'un groupement CO-CH₃. Des expériences dans des cellules HeLa et des cellules mononucléaires humaines du sang périphérique ont montré qu'une fraction de NCL subit une acétylation (Das et al., 2013). Ce sont plusieurs résidus lysine (K) présents dans les 150 premiers acides aminés du domaine N-terminal qui sont ciblés. La nucléoline acétylée au résidu K88 est localisée dans le noyau au niveau de foyers où des facteurs d'épissage sont présents (Das et al., 2013). Cette corrélation entre acétylation et localisation nucléaire suggère que NCL acétylée pourrait être impliquée dans des fonctions spécifiques du noyau, en particulier dans la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des gènes et le métabolisme des pré-ARNm (Das et al., 2013).

1.2.4.5 L'ADP-ribosylation

L'ADP-ribosylation est l'ajout d'un ou plusieurs ADP-ribose sur des molécules acceptrices. Une étude menée dans des cellules HeLa, sur les protéines nucléolaires totales ont identifié la nucléoline et B23 comme porteuses de cette modification (Leitinger and Wesierska-Gadek, 1993). L'ADP-ribosylation, notamment des histones, joue un rôle de signalisation nucléaire important dans la modulation de la structure de la chromatine, la réplication et la réparation de l'ADN. La fonction de cette modification sur NCL reste elle à éclaircir.

1.2.4.6 La SUMOylation

Enfin, une nouvelle modification post-traductionnelle de NCL a été récemment identifiée : la SUMOylation. Les protéines SUMO (Small Ubiquitin-like MODifier) sont de petites protéines

qui, en se fixant sur d'autres, modifient la conformation, l'activité, la localisation et les interactions protéine-protéine de leurs protéines cibles. La mise en place de cette modification se fait par une série d'étapes enzymatiques (Hay, 2005).

Sur hNCL, cinq SUMOylations ont été trouvées par crible à haut débit en spectrométrie de masse (Hendriks et al., 2014) et une par la technique de mutagenèse site-spécifique (Zhang et al., 2015). Ainsi, le résidu lysine K294 est modifié par une SUMOylation, ce site non consensus étant localisé dans le NLS. Une mutation de cette lysine en arginine diminue la séquestration nucléaire de NCL et atténue ses fonctions stabilisatrices des ARNm. Cela suggère que la SUMOylation joue un rôle dans la localisation nucléaire de hNCL et dans ses propriétés de liaison aux ARNm (Zhang et al., 2015). La SUMOylation de NCL augmente dans des conditions de stress, notamment l'exposition à l'arsénite et jouerait un rôle clé dans le déclenchement de l'apoptose, via la stabilisation de l'ARNm *gadd45α* (Growth Arrest and DNA Damage inducible 45), un inducteur de l'apoptose (Zhang et al., 2015). Dans de telles conditions de stress, NCL-SUMO aurait donc une fonction pro-apoptotique.

1.3 Localisation et fonctions associées

Comme le montre le paragraphe précédent, modifications post-traductionnelles et fonctions sont intimement liées. Les principales localisations donnent également un aperçu des fonctions attribuées à NCL.

1.3.1 La fonction nucléolaire de NCL

La localisation de NCL varie au cours des étapes du cycle cellulaire, toutefois elle est considérée comme la protéine la plus abondante dans le nucléole puisqu'elle représente près de 10 % des protéines nucléolaires totales (Bugler et al., 1982). Le nucléole est une sous-structure dynamique du noyau cellulaire, visible pendant l'interphase en microscopie à contraste de phase ou en microscopie électronique à transmission (MET). Il ne possède pas de membrane, s'organise autour des régions chromosomiques dites NOR (Nucleolar Organizer Region) qui portent les gènes codant les ARNr (5,8S - 18S et 28S) nécessaires à la biogenèse des ribosomes (Roussel et al., 1992). L'observation du nucléole en MET a permis de caractériser trois zones que la Figure 2 schématise : le centre fibrillaire (FC), le composant

fibrillaire dense (DFC) et le composant granulaire (GC), nomenclature dérivant de l'aspect en MET de ces compartiments.

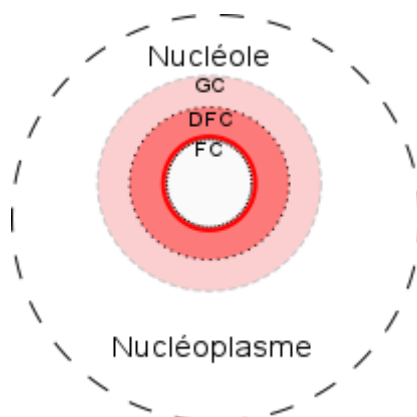


Figure 2 – Localisation de NCL dans le nucléole d'un le noyau.

(Le schéma n'est pas représenté à l'échelle)

Le centre fibrillaire (FC) est entouré par le composant fibrillaire dense (DFC), l'ensemble étant englobé dans le composant granulaire (GC). L'ADNr est transcrit à la jonction FC/DFC. Le pré-ARNr subit de multiples étapes de maturation dans le DFC et le GC avant d'être utilisé dans l'assemblage des ribosomes dans le GC. Les variations de la couleur rouge indiquent la présence plus (rouge foncé) ou moins (rouge clair) importante de NCL dans les différentes zones du nucléole.

Le nucléole est le centre d'assemblage des ribosomes, qui sont des complexes ribonucléoprotéiques comprenant des ARNr et des protéines ribosomiques, responsables de la traduction des ARNm en protéines. Les trois zones identifiées dans le nucléole correspondent aux sites de diverses étapes de la biogenèse des ribosomes. Ainsi, FC comprend les gènes ribosomiques (ADNr) transcrits par l'ARN polymérase I (RNAPI) à la frontière FC/DFC. Les pré-ARNr subissent différentes étapes de maturation depuis le DFC jusqu'au GC où l'assemblage avec des protéines ribosomiques est effectué avant l'export nucléo-cytoplasmique. NCL est rarement trouvée dans le FC. Elle est principalement dans la zone DFC, en particulier à la jonction FC/DFC et plus faiblement dans le GC (Ginisty et al., 1999). Sa présence dans le nucléole ne serait pas uniquement due au NLS. L'interaction combinée de ses domaines RBD et GAR avec des composants nucléolaires participerait aussi à cette localisation (Berger et al., 2015). Une étude récente a montré, par des expériences d'immunoprécipitation dans des cellules HeLa, que NCL est un des partenaires de WDR46 (WD repeat containing protein 46), une protéine nucléolaire humaine insoluble impliquée dans la structure du nucléole. La diminution de WDR46 par interférence à l'ARN (RNAi) entraîne une délocalisation de NCL vers la périphérie du nucléole et lors de la formation d'un nouveau nucléole NCL n'est pas recrutée correctement vers le GC mais reste en périphérie du nucléole (Hirai et al., 2013). Ces résultats suggèrent que le recrutement correct de NCL dépend de WDR46.

1.3.1.1 NCL régule la transcription par RNAPI

Plusieurs indices montrent l'importance de NCL dans la transcription par RNAPI. Dans le développement précoce du Xénope, NCL apparaît avant le début de la transcription de l'ADNr et de la synthèse des protéines ribosomiques suggérant qu'elle intervient dans les premières étapes de la biogenèse des ribosomes (Caizergues-Ferrer et al., 1989).

L'injection de sérum anti-NCL dans des glandes salivaires de chironomes augmente la transcription de l'ADNr d'un facteur 2,5-3 (Egyhazi et al., 1988) et l'injection de NCL purifiée dans des ovocytes de Xénope au stade IV réprime la transcription de l'ADNr (Roger et al., 2002). Dans des carpes acclimatées au froid, une augmentation de NCL inhibe la transcription de l'ADNr en même temps que la ségrégation du nucléole (Alvarez et al., 2003). Chez *Arabidopsis thaliana*, l'augmentation de NUC2 est également associée à une diminution de la transcription de l'ADNr (Durut et al., 2014). Mis ensemble, ces résultats suggèrent un rôle répressif de NCL sur la transcription de l'ADNr.

Plus récemment, et en contraste avec les résultats précédents, des expériences d'inhibition de NCL soit par interférence à l'ARN, soit par inactivation conditionnelle du gène dans des cellules DT40 suggèrent un rôle activateur de NCL sur la transcription par RNAPI. Dans les cellules HeLa, la dégradation de l'ARNm *Ncl* par RNAi entraîne l'arrêt de la synthèse des pré-ARNr, montrant ainsi que NCL est requise pour la transcription des gènes ribosomiques par RNAPI (Rickards et al., 2007; Ugrinova et al., 2007; Cong et al., 2012). Dans les DT40, la transcription de l'ADNr est drastiquement inhibée après invalidation de *Ncl* alors que la maturation des pré-ARNr est légèrement affectée (Storck et al., 2009; Cong et al., 2012).

Cette inhibition de la transcription est associée à plusieurs phénomènes : un arrêt de la prolifération, une entrée en apoptose pour un nombre significatif de cellules, une modification structurale et organisationnelle du nucléole puisque FC et DFC sont délocalisés en périphérie du GC. Le nucléole est plus petit et a une forme irrégulière du fait de la séparation de ses composants (Ugrinova et al., 2007; Storck et al., 2009).

Par ailleurs, une surexpression de NCL, dans les cellules HeLa, provoque une augmentation de la transcription de l'ADNr (Cong et al., 2012).

L'ensemble de ces données suggèrent que NCL joue un rôle positif lors de la transcription de l'ADNr par RNAPI. Ce rôle activateur est en accord avec les observations liant forte expression de NCL et forte prolifération notamment dans les cancers (Berger et al., 2015).

Le rôle de NCL dans la régulation de la transcription par RNAPI pourrait se jouer *via* la chromatine. Des études *in vitro* (Angelov et al., 2006) et *in vivo* (Gaume et al., 2011) ont mis en évidence une activité de chaperonne d'histones pour NCL. Les chaperonnes d'histones établissent un équilibre entre l'assemblage des nucléosomes, leur dissociation partielle ou leur éviction totale de la chromatine, lors des processus nucléaires (transcription, réplication, réparation de l'ADN). Pour assurer le positionnement correct et la régularité de l'espace entre nucléosomes, les chaperonnes d'histones agissent en coordination avec des facteurs de remodelage (Tyler, 2002). *In vitro*, NCL est capable d'augmenter les activités des facteurs de remodelage SWI/SNF et ACF (Angelov et al., 2006). En effet, des nucléosomes qui contiennent le variant d'histone macroH2A sont d'ordinaire résistants au remodelage par le complexe SWI/SNF mais, en présence de NCL, ce remodelage s'opère. MacroH2A est un variant non allélique, de l'histone canonique H2A et en plus du motif histone, il possède un macro domaine carboxy terminal. MacroH2A remplace H2A et forme des nucléosomes plus stables. Chez les mammifères, ces nucléosomes variants sont principalement trouvés sur le chromosome X inactif, et sont supposés important pour le maintien de l'inactivation. On les trouve aussi sur des gènes inductibles et sur des gènes qui portent simultanément des marques de chromatine active et inactive (Biterge and Schneider, 2014). Il a été montré que macroH2A est associé aux promoteurs des gènes inactifs dans l'ADNr où il semble être un acteur de la répression transcriptionnelle (Cong et al., 2014). L'inhibition expérimentale de l'expression de NCL est accompagnée d'un enrichissement de macroH2A au niveau des promoteurs de l'ADNr. De plus, la baisse de la transcription de l'ADNr observée après cette inhibition peut être contre balancée par l'inhibition de l'expression de macroH2A. Au final, même si les mécanismes moléculaires restent à déterminer il semble que NCL joue un rôle activateur de la transcription RNAPI en contrecarrant l'inhibition de macroH2A. Toutefois cette action semble spécifique car ce phénomène n'est pas observé avec un autre variant d'histone comme H2Abbd. De plus, NCL déstabilise l'octamère d'histone, ce qui aide à la dissociation du dimère H2A-H2B. Par ailleurs, des essais *in vitro* montrent que NCL facilite l'élongation de la transcription de matrice chromatinienne, probablement en favorisant la mobilité des dimères H2A-H2B. De plus, une étude réalisée par FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) sur des cellules HeLa exprimant des protéines de fusion histone-GFP suggère que NCL a un impact sur la fluidité des histones (Gaume et al., 2011).

La discordance entre ces résultats et ceux observés plus haut, peut résider dans l'approche mise en œuvre. Il est clair que des expériences visant à concilier les deux types de résultats sont nécessaires.

1.3.1.2 NCL participe à la maturation des ARNr et la biogenèse des ribosomes

La maturation des pré-ARNr est complexe et comporte plusieurs étapes. Le pré-ARNr possède des séquences transcrites externes en 5' et 3' dites ETS (External Transcribed Spacers) et des séquences transcrites internes dites ITS (Internal Transcribed Spacers) qui séparent les séquences d'ARNr 18S, 5,8S et 28S (Figure 3). La maturation consiste d'une part en l'ajout de modifications chimiques comme la méthylation ou la pseudo-uridylation sur la séquence par des snoRNP et d'autre part à cliver le pré-ARN sur des sites spécifiques, dont les ETS et ITS, et dans un ordre défini (Cooper, 2000).

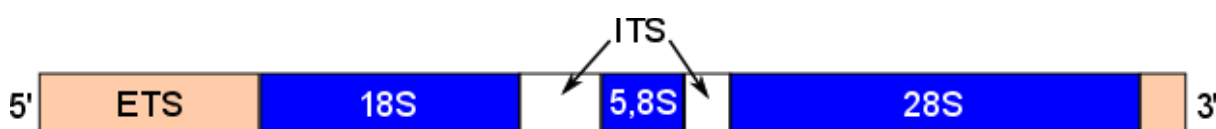


Figure 3 - Schéma d'un pré-ARNr avant maturation.

Les ARNr sont séparés par des séquences transcrites internes (ITS) tandis que des séquences externes (ETS) coiffent les extrémités 5' et 3'. La maturation d'un pré-ARNr consiste notamment au clivage des ETS et ITS.

NCL est impliquée dans le processus de maturation des pré-ARNr (Ginisty et al., 1998). L'interaction spécifique de NCL avec le pré-ARNr est requise pour la première étape de maturation (Bouvet et al., 1998; Ginisty et al., 1998; Allain et al., 2000). Elle lie, par ses 4 RDB, l'ECM localisé dans le 5'ETS près du premier site de clivage (Ginisty et al., 2000, 2001). *In vitro*, cette liaison NCL/ECM stimule le recrutement du complexe snoRNP U3 sur le pré-ARNr (Ginisty et al., 1998; Turner et al., 2009). Ce complexe est requis pour la maturation et le repliement des pré-ARNr mais le mécanisme moléculaire reste inconnu (Zhang et al., 2013). De plus, les RBD1 et 2 lient les NRE présents en plusieurs points le long de la séquence du pré-ARNr (5' et 3'ETS, ITS, 18 et 28S) (Serin et al., 1997). Le rôle de ces interactions reste à définir. Par son domaine C-terminal, NCL interagit aussi avec plusieurs protéines ribosomiques, spécialement des protéines présentes au cœur du ribosome qui sont supposées être parmi les premières protéines assemblées dans les particules pré-ribosomiques (Bouvet et al., 1998). Toutes ces données illustrent le rôle de NCL dans la maturation des pré-ARNr et la biogenèse des ribosomes.

1.3.1.3 *NCL interagit avec la télomérase humaine*

NCL pourrait avoir un rôle dans la réplication et le maintien des télomères car elle a été trouvée liée sur les répétitions télomériques *in vitro* avec une préférence pour les formes simples brins. Le complexe de télomérase humaine est formé de hTERT, la sous-unité catalytique à activité de transcriptase inverse, et hTERC, l'ARN matrice servant à l'extension des télomères, tous localisés dans le nucléole. Le domaine RBD 1 d'une part et les domaines RBD 4 et GAR d'autre part, sont capables d'interagir *in vitro* et *in vivo* avec hTERT de manière dépendante de hTERC (Khurts et al., 2004). Ce sont à la fois des interactions de type protéine-protéine et protéine-ARN qui ont lieu entre ces différents partenaires et semblent nécessaires pour maintenir le complexe de télomérase dans le nucléole et plus particulièrement dans le DFC. Le rôle de cette interaction reste obscur, les auteurs suggèrent que NCL aiderait à la formation de la télomérase et maintiendrait un pool de télomérase prêt à fonctionner.

1.3.2 **Le rôle de NCL dans le nucléoplasme**

Bien que majoritairement présente dans le nucléole, NCL est aussi localisée dans le nucléoplasme délimité par l'enveloppe nucléaire. De nombreuses fonctions sont associées à NCL dans ce compartiment cellulaire.

1.3.2.1 *NCL modifie la structure de la chromatine par une activité de chaperonne d'histones*

Par sa structure, NCL est capable de lier l'ADN de manière non spécifique et de modifier la structure de la chromatine.

Il a été montré, en utilisant des noyaux de cellules CHO, que NCL a une forte affinité pour l'histone H1 (Erard et al., 1988). Cette interaction se produit par l'intermédiaire des régions acides localisées dans le domaine N-terminal de NCL. De telles interactions ioniques auraient comme effet de déplacer l'histone H1 de la chromatine, sans modifier la structure du nucléosome, et ainsi d'induire la décondensation de la chromatine. La phosphorylation de NCL favoriserait l'interaction avec l'histone H1.

Comme décrit dans le paragraphe 1.3.1.1 « NCL régule la transcription par RNAPI », NCL a une activité de chaperonne d'histones qui pourrait se révéler importante dans la transcription

par les autres ARN polymérase. Ce rôle reste à clarifier et fait l'objet d'une étude en cours dans l'équipe de P. Bouvet.

1.3.2.2 NCL intervient dans la prolifération, la survie cellulaire et la régulation du cycle cellulaire

La corrélation positive entre quantité de NCL et prolifération des cellules a été établie par de nombreux articles (Lapeyre et al., 1987; Derenzini et al., 1995; Srivastava and Pollard, 1999). Les cellules cancéreuses étant hautement prolifératives, il n'est pas surprenant de constater une surexpression de NCL dans de nombreux cancer (Berger et al., 2015). La mise en évidence de cette surexpression est utilisée dans le diagnostic de cancers bien qu'il soit difficile de savoir si elle est une cause ou une conséquence d'une rapide prolifération cellulaire.

Dans les cellules DT40, NCL est absolument nécessaire pour la prolifération et la survie cellulaire. Dès que la quantité de NCL diminue après une invalidation inducible du gène, la prolifération cellulaire est freinée puis bloquée conduisant à la mort cellulaire (Storck et al., 2009). Ces résultats sont en accord avec des expériences dans des cellules HeLa et des fibroblastes humains où la diminution de NCL par RNAi réduit la prolifération cellulaire tandis que l'apoptose augmente (Ugrinova et al., 2007).

Au cours du cycle cellulaire, la localisation de NCL évolue. A l'interphase et en prophase, NCL est principalement localisée dans le nucléole et en faible concentration dans le nucléoplasme. En métaphase, elle est peu présente dans le cytoplasme, elle est retrouvée en périphérie des chromosomes, plus particulièrement aux environs du kinétochore, lieu d'ancrage des chromosomes aux microtubules (Ma et al., 2007). Durant la mitose, la diminution de NCL par RNAi dans des cellules HeLa provoque des défauts dans le regroupement des chromosomes : soit ils sont mal ou pas alignés sur la plaque métaphasique, soit ils sont éparpillés dans le cytoplasme. Ces anomalies seraient dues à un défaut d'ancrage entre microtubules et kinétochore où NCL est nécessaire pour un attachement correct (Ma et al., 2007). Une autre étude similaire a observé l'apparition de micronoyaux et de cellules multinucléées (Ugrinova et al., 2007). Le rôle de NCL au kinétochore n'est actuellement pas compris.

1.3.2.3 NCL agit comme facteur de transcription et contrôle la transcription d'oncogènes

Comme cela a été décrit plus haut, NCL est surexprimée dans de nombreux cancers ; la dérégulation de NCL peut être une conséquence d'un état pathologique, ou contribuer à l'initiation et/ou à la progression de la maladie (Berger et al., 2015). La multifonctionnalité de NCL rend difficile l'identification des voies les plus pertinentes dans l'apparition et le développement des cancers. Plusieurs articles rapportent la fonction de NCL en tant que facteur de transcription y compris d'oncogènes.

La famille des oncoprotéines Myb est composée de trois membres (A-, B- et c-Myb), tous des facteurs de transcription. A-Myb est exprimé dans peu de types cellulaires, B-Myb est ubiquitaire tandis que c-Myb est principalement exprimé dans les cellules hématopoïétiques et régule leur prolifération et différenciation. Il a été montré que NCL interagit directement et spécifiquement avec les facteurs de transcription A- et c-Myb mais pas avec B-Myb, *in vitro* et *in vivo*. Des expériences de co-transfection montrent que NCL inhibe l'activité transcriptionnelle de c-Myb. Le mécanisme moléculaire de cette diminution d'activité n'est pas clairement établi (Ying et al., 2000).

Le facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) est un facteur important dans la formation des vaisseaux sanguins en particulier lors de la tumorigenèse précoce et de l'invasion tumorale. NCL, en fixant une séquence spécifique du promoteur *VEGF*, agirait comme activateur de la transcription de *VEGF*. Des expériences de surexpression ou de diminution de NCL provoquent respectivement, une augmentation ou une diminution d'au moins 2 fois du niveau d'ARNm *VEGF* (Uribe et al., 2011). NCL participerait au mécanisme d'angiogenèse pendant la tumorigenèse.

L'interleukine-9 (IL-9) est une cytokine multifonctionnelle. IL-9 et son récepteur IL-9R sont impliqués dans la croissance cellulaire et l'inhibition de l'apoptose dans différents types de lignées cellulaires transformées, ce qui suggère un potentiel rôle dans la tumorigenèse. Une surexpression d'IL-9R se produit dans différentes types de lymphomes, leucémies humaines et murines. Par la technique de retard sur gel, NCL a été trouvée comme protéine se liant sur le promoteur d'*Il9r*, plus particulièrement dans une région riche en AT. Cette interaction a été confirmée *in vivo* dans des cellules de lymphome T de souris par immunoprécipitation de la chromatine suivi d'une qPCR : NCL est enrichie près de 15 fois sur le promoteur *Il9r* dans des cellules de lymphome qui l'expriment fortement. Cela est associé à l'ouverture de la chromatine du promoteur et suggère fortement que NCL contribue à une activation de la transcription de *Il9r* (Shang et al., 2012).

NCL est aussi impliquée dans le cancer du col de l'utérus dû aux papillomavirus humains de type 18 (HPV18) (Grinstein et al., 2002) et 16 (HPV16) (Sato et al., 2009). Les génomes de HPV16 et HPV18 sont intégrés dans le génome nucléaire des cellules hôtes. Les oncogènes des protéines virales E6 et E7 sont fortement exprimés, ces protéines virales exerçant leur potentiel carcinogène en inactivant des suppresseurs de tumeur comme p53. NCL est un facteur essentiel pour l'expression de HPV18 dans les cellules cancéreuses et dans le maintien d'une prolifération de ces cellules. Elle fixe de manière spécifique l'enhancer de HPV18 sur lequel elle contrôle la formation d'un site facilitant l'ouverture de la chromatine. De ce fait, NCL active la transcription en phase S des oncoprotéines E6 et E7. En revanche, l'inactivation de NCL bloque cette même transcription et réduit la prolifération cellulaire des cellules ayant intégré le génome de HPV18. NCL a donc une fonction de régulation de la transcription de l'oncogène et un potentiel oncogénique (Grinstein et al., 2002).

Il y a d'autres exemples dans la littérature rapportant l'implication directe de NCL dans la régulation de la transcription de certains gènes comme Myc inhibé par NCL (González and Hurley, 2010). Selon les cas, NCL a une action activatrice ou inhibitrice. Cette dualité repose peut-être sur une propriété qui a été mise en évidence au laboratoire. En effet, comme expliqué plus haut, NCL présente une activité de chaperonne d'histone et de co-remodeleur de la chromatine (Angelov et al., 2006). Cette activité pourrait, selon le contexte propre à chaque gène, favoriser une certaine fluidité de la chromatine ce qui faciliterait le changement d'état transcriptionnel. Dans le cas de c-Myc, il est intéressant de noter que la transcription de *Ncl* est dépendante de c-Myc, ce qui suggère l'existence d'une boucle de contrôle.

1.3.3 La fonction cytoplasmique de NCL

La nucléoline a un rôle de navette entre noyau et cytoplasme pour transporter diverses molécules dont des protéines ribosomales impliquées dans la synthèse des ribosomes (Borer 1989). Des études plus récentes ont mis en lumière de nouveaux rôles pour NCL cytoplasmique qui impliquent des interactions NCL-protéines et NCL-ARN.

1.3.3.1 NCL participe à la régulation de la traduction

Les ARNm ont à leurs extrémités 5' et 3' des régions non traduites (UTR, UnTranslated Region) et au centre une région codante. Une étude sur tout le génome de cellules HeLa a récemment été réalisée pour identifier les ARNm interagissant avec NCL (Abdelmohsen et

al., 2011). L'étude est basée sur une immunoprécipitation des complexes contenant NCL suivie d'une identification des ARNm sur puce. Elle révèle qu'une majorité d'entre eux présentent une séquence riche en G dans leurs régions codantes et dans leurs extrémités 5' - et 3'-UTR et/ou présentent des séquences riches en adénine (A) et uridine (U) dites « ARE » (AU Rich Elements) localisées dans le 3'UTR. La liaison de NCL au ARE a une fonction activatrice de la traduction pour certains de ces ARNm cible (Abdelmohsen et al., 2011).

Les métalloprotéinases matricielles (MMP) constituent une famille de protéases impliquées dans la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire. Parmi elles, MMP-9 joue un rôle important dans le remodelage des tissus dans des processus normaux (développement embryonnaire et osseux) et pathologiques (arthrite, cancer). Lors de situations d'hypométabolisme expérimentalement induites par une carence en fer, le niveau de MMP-9 triple, grâce à l'amélioration de l'efficacité de traduction de son ARNm. Des tests de gènes rapporteurs révèlent que cette amélioration est principalement due à la liaison de NCL sur le 3'UTR de l'ARNm *MMP-9* (Fähling et al., 2005).

NCL interagit également avec l'extrémité 5'UTR d'ARNm. Dans le cas des ARNm du gène ProstaGlandine endoperoxide-H Synthase (*PGHS-1*), cette liaison ralentit sa traduction. Ce ralentissement explique le délai, de 2 à 3 jours, observé entre l'accumulation des ARNm et celle de *PGHS-1*. Le détail des mécanismes d'inhibition de la traduction n'est pas compris. Cependant, le 5'UTR et les deux premiers exons sont nécessaires pour cette répression. Cette région contient des NRE peu conservés qui recrutent NCL *via* la formation d'une structure secondaire stable. NCL diminue alors l'efficacité de traduction des ribosomes par un mécanisme inconnu (Bunimov et al., 2007).

1.3.3.2 NCL participe à la régulation de la stabilité des ARNm

NCL affecte aussi la stabilité d'ARNm cibles. Par exemple, la majorité des patients atteints de leucémie lymphocytaire chronique à cellules B (B-CLL) surexprime la protéine anti-apoptotique *bcl-2* dans leurs cellules B. Une étude révèle que chez les malades, les ARNm *bcl-2* sont beaucoup plus stables et le niveau d'expression de NCL cytoplasmique est 26 fois plus élevé que dans les cellules B normales. Il a été montré *in vitro* que NCL s'associe sur une des séquences ARE du 3'UTR de l'ARNm *bcl-2*, le protégeant de la dégradation par la ribonucléase (Sengupta et al., 2004). De plus, l'ajout de NCL recombinante humaine dans des extraits de cellules B normales diminue le taux de dégradation de l'ARNm *bcl-2* et par conséquent augmente la durée de vie de cet ARNm. Enfin, une diminution de NCL par RNAi

diminue le niveau de cet ARNm. Tous ces résultats indiquent que la surexpression de *bcl-2*, dans le cas de B-CLL, est liée à la stabilisation de l'ARNm *bcl-2* par NCL (Otake et al., 2007).

Un autre mécanisme jouant sur les ARNm est la voie des micro-ARN (miARN). NCL interagit avec le complexe microprocessor, requis pour la maturation initiale des miARN, dans le noyau. NCL interagit aussi directement et spécifiquement avec les transcrits primaires de certains miARN. En l'absence de NCL, la production de ces miARN est diminuée (Pickering et al., 2011). C'est le cas des miARN 15a/16 qui ciblent l'ARNm *bcl-2*. L'ARNm *bcl-2* serait contrôlé à deux niveaux par NCL : positivement par une liaison directe de la protéine qui favoriserait la stabilité du messenger et négativement via la production de miARN ciblant l'ARNm. La bonne compréhension de ces mécanismes nécessite que l'on affine notre connaissance des modifications post-traductionnelles et de la localisation sub-nucléaire de NCL.

1.3.3.3 NCL est impliquée dans la duplication du centrosome et la stabilité des microtubules

Par une analyse protéomique, NCL a été identifiée dans les centrosomes humains (Andersen et al., 2003) ; tandis qu'avec une analyse par immunofluorescence c'est une forme phosphorylée de NCL qui a été détectée dans les pôles des fuseaux mitotiques (Ma et al., 2007). Une étude de l'équipe de P. Bouvet avait suggéré que NCL aurait un rôle dans la duplication des centrosomes. En effet, une diminution de NCL par RNAi provoque une amplification anormale du centrosome en mitose (Ugrinova et al., 2007). Une étude plus récente a montré par immunofluorescence que, pendant l'interphase, NCL est localisée sur le centriole mature du centrosome (Gaume et al., 2015). Les données de protéomique d'Andersen *et al.* ont été confirmées grâce à des analyses par western blot de centrosomes purifiés. Des expériences d'immunoprécipitation ont montré que NCL appartient à un complexe protéique contenant deux protéines centrosomales, γ -tubuline et ninéine, impliquées dans les étapes d'accrochage et d'élongation des microtubules. Une diminution de NCL par RNAi provoque l'accumulation de structures anormales portant des marqueurs de centrioles immatures. Au niveau du centriole mature, la vitesse de formation des microtubules est réduite et des défauts d'ancrages des microtubules sont observés. De plus, le réseau de microtubule est désorganisé dans ces cellules montrant souvent des microtubules non centrosomaux. Tout cela suggère que NCL joue un rôle direct dans le cycle du centrosome mais aucun mécanisme moléculaire n'est connu à jour.

Le rôle de NCL dans la dynamique des microtubules ne semble pas se limiter aux centres organisateurs. Pour caractériser les fonctions de NCL sur la régulation des microtubules, une étude a fait varier l'expression de NCL dans des cellules et en a étudié les effets sur la dynamique globale des microtubules par l'analyse de la cinétique de la protéine EB3 qui se lie à l'extrémité + du microtubule lors de la polymérisation (Gaume et al., 2016). Dans un contexte de surexpression de NCL, la durée de polymérisation est plus longue mais avec une vitesse réduite. Les pauses sont moins fréquentes et de plus courte durée ; les catastrophes sont également moins fréquentes avec une vitesse de dépolymérisation plus lente et sur une courte distance. Dans le contexte d'une diminution de NCL, la durée de polymérisation est plus courte avec une vitesse légèrement augmentée. Les pauses sont plus fréquentes et plus longues ; la vitesse de dépolymérisation est plus rapide et sur une plus longue distance. En somme, pendant la phase de croissance des microtubules, NCL contrôle la vitesse de polymérisation en réduisant la fréquence des pauses et catastrophes.

Ces études indiquent que NCL participe au contrôle de la dynamique des microtubules et à leur ancrage au centrosome. Elles dévoilent une fonction tout à fait inattendue pour NCL, soulèvent de très nombreuses questions d'ordre mécanistique dont les réponses seront sans doute intéressantes dans le cadre de processus normaux comme pathologiques.

Enfin, NCL participe à de nombreuses voies de transduction du signal. Elle interagit par exemple avec les récepteurs de la famille ErbB, favorise leur dimérisation et leur activation indépendamment de leur ligand (Di Segni et al., 2008). Plus en aval dans la voie de signalisation ErbB, NCL interagit avec Ras. Cette somme d'interactions favoriserait la prolifération cellulaire (Farin et al., 2011).

1.3.4 Le rôle de NCL à la membrane plasmique

Bien que NCL ne possèdent pas de domaine transmembranaire hydrophobe, ni de séquence cible pour une localisation à la membrane plasmique, elle a été observée par immunofluorescence et microscopie électronique dans cette zone dans plusieurs types cellulaires (Berger et al., 2015). Les modalités d'association entre membrane et NCL ne sont pas clairement connues, mais une étroite collaboration avec le cytosquelette d'actine est nécessaire (Hovanessian et al., 2000). La fraction de NCL trouvée à la membrane cytoplasmique a subi des modifications post-traductionnelles notamment la N- et O-glycosylation (Carpentier et al., 2005). L'isoforme de NCL-glycosylée est aussi présente dans le cytoplasme mais pas dans le noyau. Cette localisation extranucléaire se produit malgré la

présence du NLS ce qui suggère que la glycosylation influence la localisation et pourrait interférer sur la fonction de NCL (Carpentier et al., 2005). Lorsqu'un inhibiteur de la glycosylation est utilisé sur des cellules Jurkat, la nucléoline de surface est largement réduite sans effet apparent sur la nucléoline cytoplasmique et nucléaire, indiquant la nécessité de la glycosylation pour cette localisation membranaire (Losfeld et al., 2009).

D'un point de vue fonctionnel, NCL agirait comme récepteur de surface pour plusieurs types de ligands impliqués dans la prolifération cellulaires, la différenciation, l'adhésion, l'angiogenèse et l'apoptose (Hovanessian et al., 2000; Otake et al., 2007; Srivastava and Pollard, 1999). Il a également été montré que la liaison de HB19, un pseudopeptide spécifique de NCL provoque une entrée de Ca^{2+} dans la cellule, et pourrait être impliquée dans l'activation de voies de signalisation cellulaires (Losfeld et al., 2009). NCL serait aussi une navette pour des ligands entre la surface de la cellule et le cytoplasme et/ou le noyau (Losfeld et al., 2009; Srivastava and Pollard, 1999). A la membrane plasmique de cellules de lymphome B, NCL est trouvée en complexe avec la protéine transmembranaire Fas, médiateur de la mort cellulaire par apoptose. Cette interaction gêne la liaison du ligand de Fas et inhibe ainsi l'apoptose (Wise et al., 2013).

Le rôle de la nucléoline membranaire est aussi à considérer dans les mécanismes pathologiques. En effet, la quantité de NCL glycosylée présente à la surface cellulaire augmente avec le degré de malignité des gliomes humains. NCL peut alors devenir un marqueur histopathologique et une potentielle cible pour une thérapie (Galzio et al., 2012). Elle est également identifiée comme récepteur cellulaire pour l'entrée de virus multiples : virus respiratoire syncytial humain (RSV) (Tayyari et al., 2011), virus de la grippe (Chan et al., 2016), virus de l'Herpès, HIV (Callebaut et al., 1998), etc.

1.3.5 NCL participe à la réponse au stress

Lorsque l'ADN double brin est cassé, un processus complexe et hautement orchestré est mis en place avec le recrutement de facteurs de réparation et de modulation de la structure de la chromatine. NCL interagit *via* son domaine GAR, avec RAD50, une protéine de réparation de l'ADN, puis est rapidement recrutée sur le site de cassure par le complexe MRN (MRE11-NBS1-RAD50) qui intervient lors des cassures double brin. Grâce à son activité de chaperonne d'histone, NCL enlève les histones H2A et H2B du nucléosome présent sur le site de cassure. Cette dissociation du nucléosome permet aux protéines de réparation d'accéder à la lésion et de la réparer. Une diminution de NCL empêche la rupture du nucléosome, le recrutement des facteurs de réparation et la réparation de la cassure double brin. Cela indique

une participation de NCL dans la réparation de l'ADN et confirme son rôle dans la modification de la structure de la chromatine (Goldstein et al., 2013).

Dans le contexte de la réparation de l'ADN par excision de nucléotides (NER), une surexpression expérimentale de NCL diminue l'efficacité de la réparation tandis qu'une inhibition par RNAi l'augmente (Yang, 2009). Les auteurs suggèrent que c'est l'interaction directe de NCL avec PCNA, une protéine clé de la voie NER, qui inhiberait la réparation. Le mécanisme précis n'a pas été décrit mais il a été proposé que l'activité hélicase de NCL participe à l'ouverture de la double hélice d'ADN nécessaire à la réparation.

La protéine p53 est un élément crucial dans la réponse cellulaire suite à un stress : elle est capable d'inhiber la prolifération ou d'induire l'apoptose de la cellule. Dans les cancers humains, le gène p53 présente souvent des mutations empêchant l'activation de p53. Ce défaut peut contribuer à la prolifération de cellules génétiquement défectueuses conduisant au développement de cancers.

Une étude a montré que l'augmentation de la traduction de p53, observée après une irradiation ionisante, implique NCL. Le 5'UTR de l'ARNm *p53* joue un rôle important dans ce phénomène ; NCL s'y lie et inhibe la traduction de p53 (Takagi et al., 2005). La liaison de la protéine ribosomique L26 (RPL26) à ce même UTR provoque les effets inverses. NCL et RPL26 apparaissent comme des régulateurs de la traduction de p53, et agissent en compétition vis-à-vis d'une liaison avec le 5'UTR de l'ARNm *p53*.

Le même groupe d'auteurs a ensuite tenté de comprendre le mécanisme moléculaire par lequel NCL réprime la traduction de p53 ainsi que ses relations avec RPL26 (Chen et al., 2012). Avec des expériences de transcription/traduction *in vitro*, il a été montré que NCL agit directement avec les séquences 5'- et 3'UTR de l'ARNm *p53*, via ses RBD pour réprimer la traduction de p53. NCL et RPL26 sont en compétition pour lier des structures en double brin présentes dans les 5'- et 3'-UTR.

Finalement les auteurs de cette étude proposent que dans des cellules non stressées NCL, sous forme de dimères, lie directement les séquences structurées des 5' et 3'UTR ; en condition de stress, RPL26 est recruté sur les UTR, rompt le complexe NCL-NCL, ce qui lève l'inhibition de la traduction de p53. Toutes ces interactions suggèrent également une fonction extra-ribosomique de RPL26.

Le terme de stress nucléolaire désigne une voie de réponse au stress par laquelle le nucléole signale au cytoplasme de provoquer l'apoptose (Tsoi et al., 2012). Sous l'action d'un stress comme l'irradiation γ , un choc thermique ou des molécules chimiques, le nucléole est capable de réguler le taux de synthèse des protéines en ajustant la biogenèse de ribosomes tout en

séquestrant et en libérant une variété de protéines affectées au cycle cellulaire et à la réparation de l'ADN (Nalabothula et al., 2010). NCL est l'une des protéines qui participe à cette réponse. A titre d'exemple, un choc thermique ou un stress génotoxique provoque une délocalisation d'une fraction de NCL du nucléole vers le nucléoplasme. NCL se lie, *in vitro* comme *in vivo*, avec la Protéine de Réplication A (RPA), une protéine clé du contrôle de la réplication, en particulier pour l'étape d'initiation. Cette interaction, qui se produit par l'intermédiaire du domaine C-terminal de NCL, est suffisante pour inhiber l'initiation de la réplication de l'ADN *in vitro* (Kim et al., 2005).

Ces exemples montrent la diversité des mécanismes qui impliquent NCL dans la réponse au stress.

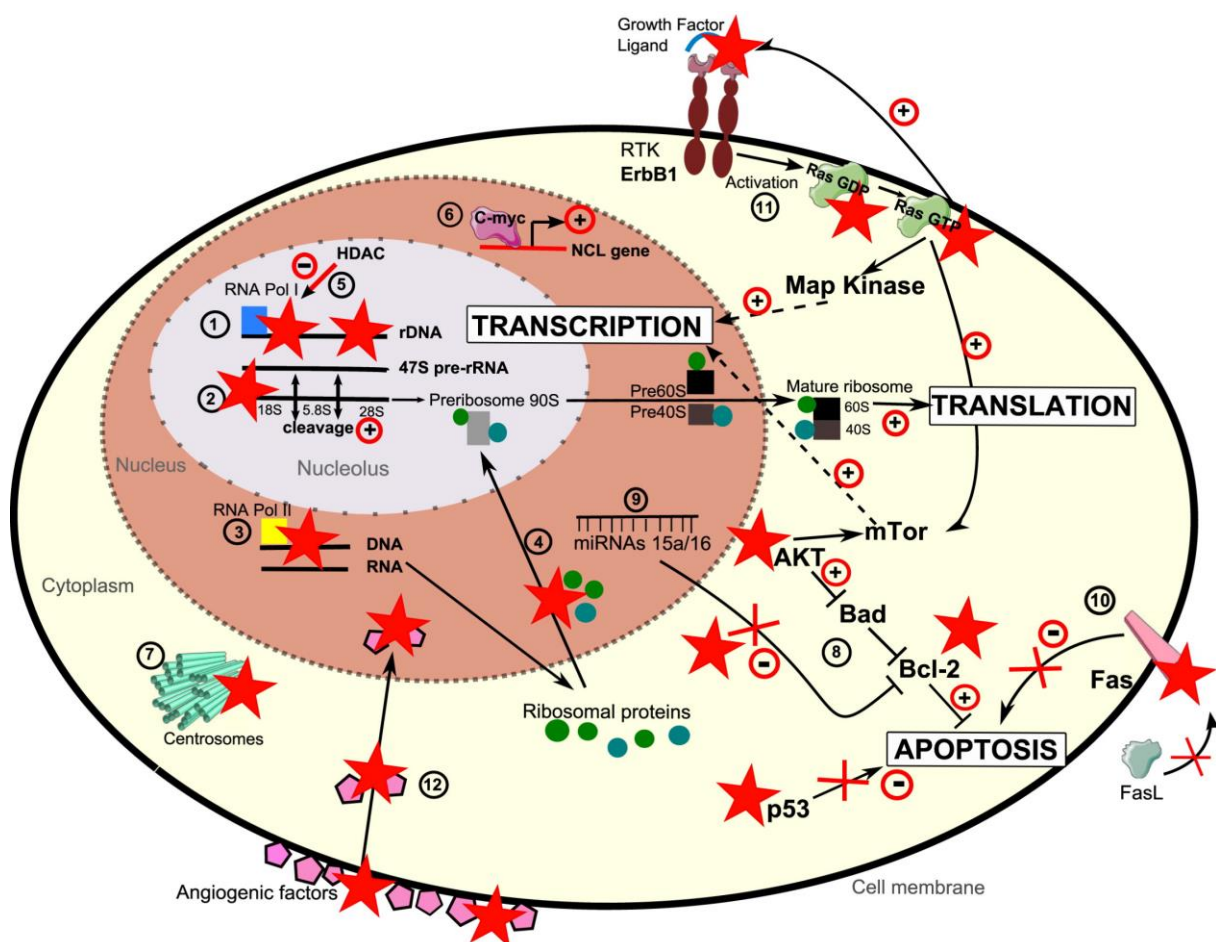


Figure 4 - Schéma récapitulatif des différentes localisations et principales fonctions connues de NCL

D'après (Berger et al., 2015). Dans le noyau et le nucléole, NCL (étoile rouge) participe à la transcription de l'ADNr par l'ARN Polymérase I (1), intervient dans le clivage des pré-ARNr (2). NCL est nécessaire pour la transcription par l'ARN polymérase II (3) et le transport des protéines ribosomales (4). Elle maintient l'euchromatine dans un état actif (5), facilite la transcription de certains gènes surexprimés dans des cancers (6). Dans le cytoplasme, elle est importante pour la duplication correcte du centrosome (7) et interagit avec divers ARNm pour modifier leur stabilité et/ou traduction (8) ou d'autres classes d'ARN tels que les microARN, affectant l'expression d'oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs (9). A la surface de la cellule, elle peut inhiber l'apoptose (10) ou augmenter la prolifération, la migration, entraîner une résistance à l'apoptose (11) selon les voies de signalisation utilisées. Enfin, elle sert de navette pour des molécules de surface vers le compartiment nucléaire (12).

1.4 La nucléoline dans les maladies neurodégénératives

De par ses multiples fonctions et localisations, la nucléoline a un rôle dans des pathologies diverses (cancers, infections virales, thalassémie...). D'ailleurs, la dérégulation de l'expression de NCL et/ou de sa localisation sont décrites dans différentes maladies neurodégénératives, incluant les maladies de Parkinson (PD), d'Alzheimer (AD), d'Huntington (maladie à polyglutamine, polyQ) et les syndromes de démence frontotemporale (FTD).

1.4.1 NCL et la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une forme commune de démence qui touche des millions de personnes dans le monde. Elle est caractérisée par des symptômes comportementaux et cognitifs qui dérivent de profonds changements fonctionnels et structuraux dans les neurones allant jusqu'à leur mort progressive dans le cortex et l'hippocampe, composé notamment de la Corne d'Ammon (CA), du gyrus denté (DG). Une hypothèse sur l'origine de cette maladie serait une accumulation de la protéine amyloïde bêta ($A\beta$) qui provient d'un clivage protéolytique incorrect de la protéine transmembranaire précurseur amyloïde (APP), protéine ubiquitaire dont la fonction principale est inconnue. Ce clivage anormal provoque la formation de peptides amyloïdes beta 42 ($A\beta_{42}$) qui peut exister sous de nombreuses formes : monomères, dimères, oligomères et polymères. Les formes présentes varient selon leur concentration intra et/ou extracellulaires. Les polymères hydrophobes sont une forme stable pouvant s'accumuler progressivement en fibrilles amyloïdes ou plaques amyloïdes, intra ou extracellulaires. La progressive accumulation cérébrale d' $A\beta_{42}$ initie une cascade multicellulaire complexe allant jusqu'à un dysfonctionnement et une perte neuronale qui diminue les fonctions cognitives (Dennis J. Selkoe, 2001; Sarkar et al., 2016).

Plusieurs rapports incitent à tenir compte de l'implication de NCL dans cette maladie.

A partir de lysat cytoplasmique de cellules T leucémiques humaines, Zaidi et collaborateurs ont purifié par chromatographie et identifié, par analyse de séquence d'acides aminés, des formes tronquées des NCL comme des interacteurs spécifiques de la région 3'UTR de l'ARNm APP. Cette interaction pourrait provoquer une stabilisation de cet ARNm, les conséquences sur la traduction ne sont pas discutées par les auteurs (Zaidi and Malter, 1995).

Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, l'expression de NCL a été évaluée dans les structures de l'hippocampe. Au cours de la maladie, une diminution de l'expression NCL

est observée notamment dans la corne d'Ammon. De plus, NCL n'est plus localisée dans le nucléole des neurones du gyrus denté. (Hernández-Ortega et al., 2015). Cette sévère délocalisation de NCL associée aux altérations de l'expression de plusieurs protéines nucléaires et ribosomiques suggèrent un stress nucléolaire dans les cellules neuronales qui pourrait conduire à la neurodégénérescence. Par ailleurs, NCL est aussi présente à la surface des macrophages un des composant de la microglie. Elle agit alors comme récepteur du peptide A β 42 monomérique ou fibrillaire. Par cette interaction, NCL contribuerait à l'élimination d'A β 42 par phagocytose par les microglies (Ozawa et al., 2013). Mieux connaître les fonctions de NCL dans les différents compartiments cellulaires pourrait contribuer à la prévention et au traitement de cette maladie.

1.4.2 NCL et les maladies à polyglutamine

Les maladies par expansion de polyglutamine (polyQ) regroupent neuf pathologies dont la maladie de Huntington. Les gènes mutés portent une expansion de trinuécléotides CAG répétés (> 40) menant à l'allongement d'un motif polyglutaminé dans les protéines correspondantes. Le tissu neural est le principal site de ces pathologies : les neurones affectés présentent des agrégats de protéines mutées insolubles auxquels l'expansion de polyglutamine confère des propriétés toxiques. Cette toxicité cause la mort des neurones dans des régions spécifiques du cerveau, propre à chaque maladie (Reis et al., 2016). En plus du rôle pathogène des protéines, les ARNm anormaux eux-mêmes sont neurotoxiques. Ces ARNm anormaux ont tendance à former des foyers dans le noyau des cellules de patients comme dans les cellules des modèles animaux. Ces foyers d'ARNm-CAG sont capables de séquestrer des protéines (Wojciechowska and Krzyzosiak, 2011; Chan, 2014). Par exemple, NCL interagit directement et spécifiquement, par ses RBD 2 et 3, avec les ARNm-CAG. Cette interaction empêche NCL de se lier sur la partie *UCE* (Upstream Control Element) du promoteur de l'ADNr qui devient hyperméthylé et réduit la transcription des ARNr (Tsoi et al., 2012). Ces mécanismes qui mènent à la mort cellulaire contribueraient ainsi à la pathogenèse.

1.4.3 NCL et la démence frontotemporale (FTD)

Le syndrome (FTD/ALS) associe une démence frontotemporale (FTD) et une sclérose latérale amyotrophique (ALS). Il atteint le comportement, la personnalité, le langage, la mémoire et

induit des problèmes moteurs : faiblesse, paralysie et atrophie des muscles. Il est fatal dans les trois ans après la survenue des symptômes.

Un défaut génétique, identifié sur le locus 9p21, est la cause la plus commune de FTD/ALS. Une répétition d'hexanucléotides GGGGCC a été identifiée dans le premier intron du gène C9orf72 (Chromosome 9 open reading frame 72). Cette localisation intronique suggère que le mécanisme de la maladie implique les ARN plutôt que la protéine normalement produite. C9orf72 code une protéine conservée mais dont la fonction est inconnue (DeJesus-Hernandez et al., 2011). Chez les malades, ce motif (GGGGCC)_n est répété de 30 à plusieurs centaines de fois. Les répétitions sont transcrites dans les deux directions (sens et anti-sens) et peuvent conduire à la formation dans le noyau de foyers d'ARN qui peuvent interagir avec des protéines liant les ARN. Il a été montré que des neurones de souris exprimant C9orf72 muté présente un déplacement de NCL partiel et diffus dans le noyau, ce qui suggère que les ARNm mutés induisent un stress nucléolaire partiel, les auteurs n'ont pas détecté de conséquences sur la transcription de l'ADNr (O'Rourke et al., 2015).

En conclusion, par sa structure et sa localisation ubiquitaire, bien que principalement nucléolaire, et ses nombreuses modifications post-traductionnelles, NCL est capable d'avoir de nombreuses interactions avec des acides nucléiques comme avec des protéines. De ce fait, ses fonctions sont multiples et complexes : on la retrouve dans de nombreux processus cellulaires (transcription par les ARN polymérases I et II, biogenèse des ribosomes, maturation des ARNr, régulation de la traduction, etc...) normaux et pathologiques. La complexité de ses actions est telle qu'il est difficile de tirer des conclusions simples sur son rôle global. De plus, toutes les études ont été menées dans des modèles de cellules en culture, la plupart du temps dérivées de cellules cancéreuses. Son étude dans un organisme entier pourrait ouvrir de nouvelles perspectives notamment au cours du développement et maladies neurodégénératives. Aussi, il nous est apparu utile de développer un modèle murin permettant de réaliser l'inactivation conditionnelle de *Ncl* et nous avons initié la création d'un tel modèle.

2. Modèle murin pour l'invalidation conditionnelle du gène *Ncl*.

Comme expliqué précédemment, des études menées dans notre laboratoire ont montré que l'utilisation de RNAi contre *Ncl* sur des cellules (HeLa et fibroblastes humains normaux) induit des perturbations dans le cycle cellulaire : les cellules s'arrêtent en phase G2, il n'y a plus de prolifération cellulaire et une augmentation de l'apoptose est constatée (Ugrinova et al., 2007). De plus, le laboratoire a mené une autre étude avec la lignée cellulaire DT40 issue des lymphocytes B de poulet en inactivant de manière conditionnelle le gène *Ncl* dans ces cellules. Les résultats montrent que la nucléoline est indispensable à la prolifération et la survie cellulaire dans ce système (Storck et al., 2009).

Considérant ces résultats, la création d'un modèle d'invalidation totale (KO) du gène *Ncl* chez la souris ne semblait pas envisageable. C'est pourquoi, la stratégie d'un modèle d'invalidation conditionnelle ou Knock-Out conditionnel (cKO) a été adoptée et mise en œuvre avec le système *Cre-loxP*.

2.1 Principe de la recombinaison par le système *Cre/loxP*

Le système *Cre/loxP* est naturellement présent dans le cycle de vie du bactériophage P1 pour la réplication du génome viral. Ce système est composé de deux acteurs : l'enzyme recombinase Cre (Cyclic Recombinase), protéine de 38 kDa, et de séquences d'ADN spécifiques appelées *loxP* (Locus of X-over P1) de 34 pb. La recombinase Cre est capable de reconnaître les séquences *loxP* et de réaliser des recombinaisons entre ces séquences. En fonction de l'orientation et de la localisation de ces séquences *loxP*, plusieurs types de modifications génétiques peuvent avoir lieu : délétion, inversion, translocation, insertion de séquences d'ADN (Sauer and Henderson, 1988; Hofker and van Deursen, 2011). La Figure 5 illustre le principe d'action de la recombinase dans le cas d'une délétion. La recombinase Cre reconnaît les séquences *loxP* et la région comprise entre les séquences *loxP* est excisée de l'ADN génomique en formant un ADN circulaire.

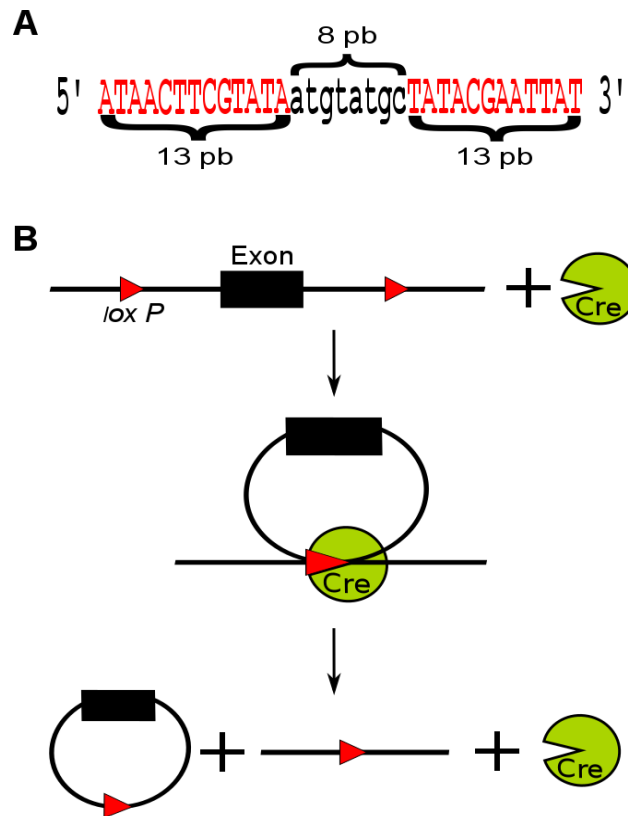


Figure 5 - Le système Cre-loxP.

(A) Séquence *loxP* de 34 pb reconnue par la recombinase Cre. Deux séquences palindromiques (rouge) sont séparées par une séquence de 8 pb (noir) dite région espaceur. (B) Mécanisme d'action du système dans le cas d'une délétion. La séquence présente entre les 2 sites *loxP* est excisée suite à la recombinaison des séquences *loxP* par l'enzyme Cre.

Ce mécanisme a été développé en une technologie de recombinaison site-spécifique largement utilisée pour générer des souris génétiquement modifiées. L'obtention de ces souris nécessite que les séquences *loxP*, associées au gène d'intérêt, soient intégrées dans le génome d'une lignée de souris par recombinaison homologue tandis que le gène de la recombinase Cre est intégré dans le génome d'une autre lignée de souris. Le croisement des deux souris permettra d'obtenir des descendants possédant simultanément les séquences *loxP* dans le gène à invalider et le gène de la recombinase (Hofker and van Deursen, 2011). Dans ces souris, le gène d'intérêt peut être invalidé d'une manière maîtrisée, soit en contrôlant la transcription de la recombinase Cre, soit en contrôlant son activité enzymatique. Ces deux mécanismes de régulation sont expliqués ci-après.

2.2 Le contrôle de la transcription de la recombinase Cre

Une première possibilité pour inactiver le gène d'intérêt est de contrôler la transcription de Cre afin que la recombinase soit présente ou non dans les cellules. Dans ce système, le

transgène *Cre* est sous le contrôle d'un promoteur permettant une expression contrôlée de *Cre* dans l'espace et dans le temps. En choisissant le promoteur, l'expression de *Cre*, et donc l'apparition de l'inactivation du gène ciblé, pourra être ubiquitaire, restreinte à un organe, ou à une lignée cellulaire spécifique.

Dans ce projet, nous avons utilisé deux lignées de souris qui expriment toutes deux la recombinaison *Cre* sous le contrôle de promoteurs dérivant de celui du gène *Nestin* du rat. *Nestine* est une protéine des filaments intermédiaires composant le cytosquelette des cellules. Elle s'exprime principalement dans les cellules progénitrices, actives et en division, du système nerveux central et périphérique qui donnent neurones et glie. Elle est abondante pendant la neurogenèse précoce et dans ces systèmes nerveux suggérant qu'elle est critique pour le développement neural. Toutefois, elle est aussi trouvée dans les précurseurs myogéniques des muscles squelettiques et du cœur, dans le bourgeon dentaire en développement, les testicules, les cellules progénitrices de la gaine du follicule pileux de la peau (Michalczyk et Ziman 2005). Au moment de la différenciation cellulaire, l'expression de *nestine* est réduite, elle est alors remplacée par des filaments intermédiaires spécifiques des tissus. Chez l'adulte, *nestine* est ré-exprimée transitoirement après des dommages des muscles ou du SNC. De plus, des tissus adultes, comme le SNC et la peau, contiennent de faibles populations de cellules souches/progénitrices exprimant *Nestin*, suggérant un rôle de réserve en cas d'activation. Cette protéine est utilisée comme marqueur des cellules souches, des cellules en prolifération et en cours de migration (Michalczyk et Ziman 2005).

Les deux lignées utilisées, diffèrent l'une de l'autre par les séquences, issues du promoteur original de *Nestin*, retenues par les auteurs (Betz et al., 1996; Tronche et al., 1999), ce qui se traduit par un profil d'expression de *Cre* différent. La lignée *Nestin-Cre* de Betz et collaborateurs a une expression ubiquitaire : les index de délétions varient de 35 à 98 % selon les organes/tissus analysés. Le maximum est observé dans les testicules et le cerveau avec un index de 98 et 92 % respectivement (Betz et al., 1996). La lignée *Nestin-Cre* de Tronche et collaborateurs, notée désormais *Nestin-Cre* (FT), exprime la recombinaison *Cre* de manière plus spécifique dans le système nerveux central (SNC). D'autres organes (testicules, reins, cœur, poumons) l'expriment également mais avec une fréquence beaucoup plus faible comme l'illustre le site Mouse Genome Informatics (<http://www.informatics.jax.org/>) ("Tg(Nes-cre)1Kln Transgene Detail MGI Mouse (MGI:2176173)," n.d.). L'article original ne donne pas de détail sur la construction, ni sur l'expression du transgène.

Nous avons choisi ces deux lignées dans le but d'observer les effets de l'inactivation de *Ncl* dans le SNC. En effet, comme cela est expliqué plus haut, *NCL* est impliquée dans de nombreux syndromes dégénératifs humains. De plus, un article récent montre que *NCL*

participe, en se liant à des ARN, à la croissance et la prolifération des neurones (Perry et al., 2016). Son étude à l'aide de notre modèle cKO est à même d'apporter des réponses importantes aux questions qui se posent à propos de ces mécanismes normaux ou pathologiques. Ces deux lignées présentent un avantage technique, puisqu'elles expriment Cre dans les lignées germinales mâles et femelles. Nous avons tiré parti de cette expression pour tenter d'obtenir une transmission germinale de la délétion. Au laboratoire, cette stratégie s'est révélée efficace dans le cadre de la création d'une lignée cKO pour le gène *PC4* (Swaminathan et al., 2016).

2.3 Le contrôle de l'activité de la recombinaise Cre par induction chimique

Une autre possibilité pour inactiver le gène d'intérêt est de contrôler l'activité de la recombinaise de Cre. Dans ce système, comme précédemment, le promoteur détermine le(s) type(s) cellulaire(s) et le moment où la recombinaise Cre va s'exprimer. L'enzyme est alors présente mais inactive ; c'est l'ajout d'un inducteur chimique qui va induire son activité de recombinaison. L'utilisation combinée du promoteur particulier et de l'inducteur chimique permet, en théorie, une grande précision dans le contrôle spatio-temporel de l'activité de la recombinaise Cre et donc de l'induction de la recombinaison.

Dans cette étude, c'est la lignée transgénique C57BL/6-*Gt(ROSA)26Sor*^{tm9(Cre/ESR1)Arte} qui est utilisée, elle sera désormais nommée RosaCreER^{T2}. La recombinaise chimère CreER^{T2} est une fusion de la recombinaise Cre et du domaine de liaison de l'hormone du récepteur aux œstrogènes humain (ER). Trois mutations ont été introduites dans ce domaine, ce qui permet à la protéine chimère d'être uniquement activée par les œstrogènes synthétiques tel le tamoxifène et non par les œstrogènes endogènes. Une fois le transgène transcrit et traduit, la recombinaise CreER^{T2} est inactive car elle forme un complexe avec une protéine de choc thermique Hsp90 qui la séquestre dans le cytoplasme de la cellule. Les interactions entre Hsp90 et la recombinaise se rompent lorsque le tamoxifène, métabolisé en 4-hydroxytamoxifène (4-OHT) se lie sur le récepteur ER^{T2}. La recombinaise est alors libérée et se délocalise du cytoplasme vers le noyau où elle va agir sur le gène d'intérêt flanqué des séquences *loxP* (Zhao et al., 2006; Hofker and van Deursen, 2011). La Figure 6 présente un schéma explicatif du mécanisme. Le transgène étant inséré dans le locus *Gt(ROSA)26*, situé sur le chromosome 6. Ce locus contient le gène d'un long ARN non-codant sous le contrôle

d'un promoteur constitutif et d'expression ubiquitaire : la recombinaise sera exprimée et donc activable par le tamoxifène dans toutes les cellules de la souris.

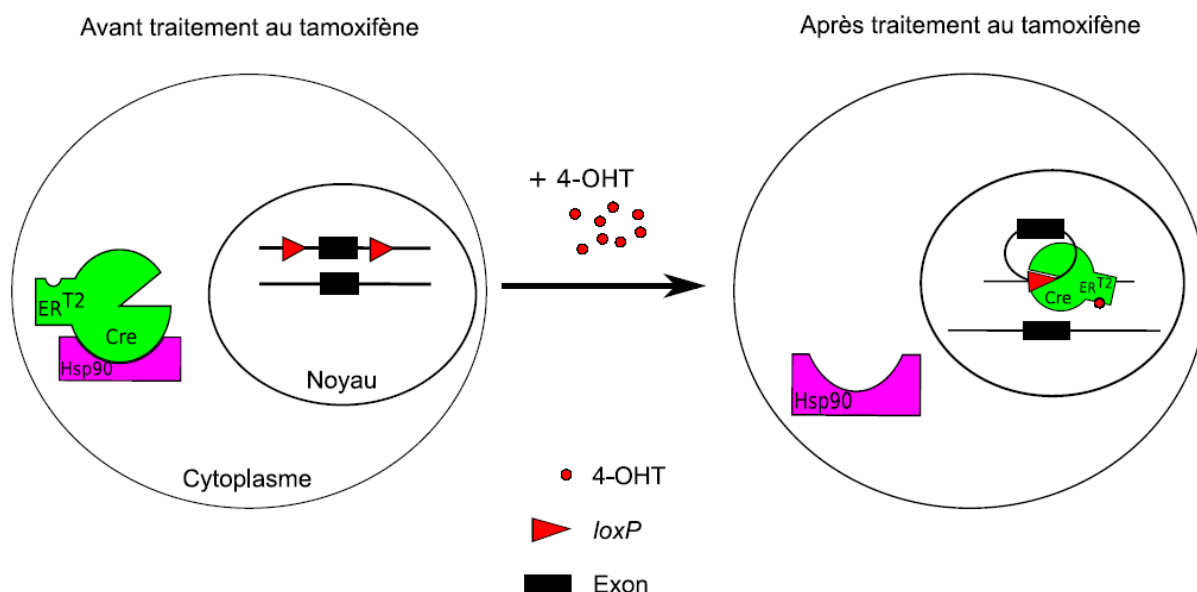


Figure 6 - Mécanisme d'action de la recombinaise CreER induite par le tamoxifène.

Avant traitement au tamoxifène la recombinaise CreER^{T2} est séquestrée dans le cytoplasme de la cellule par Hsp90. La fixation du 4-OHT dissocie la recombinaise et Hsp90. La recombinaise CreER^{T2} est libérée et se déplace alors dans le noyau cellulaire pour agir sur le génome.

Ces deux modèles sont complémentaires. Le modèle Rosa-Cre d'expression ubiquitaire nous permet d'explorer les effets de l'inactivation de *Ncl* dans de nombreux tissus simultanément. Par exemple, une collaboration avec le groupe de José Courty a mis en œuvre ces souris pour montrer, dans un modèle de greffes orthotopiques de cancers du pancréas, que l'inactivation de *Ncl* se traduit par une réduction de la vascularisation de la tumeur. L'activation de CreER^{T2} est en théorie possible à tous les âges, les limites étant posées par une certaine toxicité du tamoxifène qui sera abordée dans la discussion. Les souris *Nestin-Cre* ont été essentiellement choisies pour tenter le passage germinal de la délétion. Les souris *Nestin-Cre* (FT) ont été utilisées pour tenter aussi ce passage et pour étudier le rôle de NCL dans le SNC.

2.4 Les points de vigilance vis-à-vis du système *Cre-loxP*

Bien que ce système d'inactivation conditionnelle soit un outil biotechnologique largement utilisé, il faut tout de même garder à l'esprit que la présence d'une recombinaise, inductible ou non, dans le génome d'un organisme n'est pas anodine. Plusieurs auteurs relatent des effets plus ou moins dommageables selon le modèle, les promoteurs choisis. Ainsi, l'expression de la recombinaise CreER^T dans des cellules de mammifères, n'ayant pas reçu des séquences

loxP exogènes, peut provoquer une diminution de la prolifération, une augmentation de l'apoptose et de nombreuses aberrations chromosomiques dépendant de l'activité de la recombinaise Cre (Loonstra et al., 2001). Une autre étude utilisant la recombinaise CreER^{T2} a constaté des défauts dans le développement embryonnaire des souris, des anémies létales et une augmentation de l'apoptose dans plusieurs tissus (Naiche and Papaioannou, 2007). De plus, une étude a comparé des souris exprimant la recombinaise Cre et la recombinaise chimère CreER^{T2}, toutes deux placées sous le contrôle du promoteur Nestine (Forni et al., 2006) : des dommages cérébraux ont été détectés suite à une expression élevée de Cre dans les progéniteurs neuronaux (Forni et al., 2006). En revanche, la lignée de souris Nestin-Cre étant largement utilisée en neurobiologie, une équipe a analysé la contribution du transgène sur le comportement. Aucune altération de la locomotion, de l'activité exploratoire, de l'apprentissage et de la mémoire, de la sociabilité, des réactions sensorimotrices n'a été décelée. Seule une défaillance dans l'acquisition de la peur sous différentes conditions est observée (Giusti et al., 2014).

L'ensemble de ces données montre l'importance de choisir les contrôles adaptés afin de s'assurer que les éventuels phénotypes détectés soient bien spécifiques du gène d'intérêt invalidé et non des effets secondaires de l'activité de la recombinaise Cre. C'est pourquoi, dans la mesure du possible, les animaux contrôles de cette étude expriment tous la recombinaise quel que soit le promoteur utilisé.

Objectifs

L'objectif général de ce projet a été de caractériser les effets de l'inactivation de *Ncl* chez la souris. Des approches utilisant la recombinaison de site spécifique *Cre-loxP* ont été mises en œuvre en vue de l'invalidation conditionnelle du gène *Ncl* de manière ubiquitaire ou tissu spécifique.

Cet objectif a été précisé lors de la conduite de plusieurs études en parallèle :

- ⇒ Etudier les effets de la délétion chez les souris adultes. L'induction de la délétion du gène *Ncl* a été faite par le biais d'injection de tamoxifène dans des souris exprimant le transgène *Rosa-CreER^{T2}* de manière ubiquitaire.
- ⇒ Etudier l'impact de l'invalidation du gène *Ncl* au cours du développement dans tout l'organisme *via* un système inductible au tamoxifène.
- ⇒ Etudier l'impact de l'invalidation du gène *Ncl* pour le développement du système nerveux central *via* l'expression de Cre sous le contrôle de promoteurs spécifiques.

Matériel et **Méthodes**

1. Expérimentation animale

1.1 Les souris utilisées

Dans ce projet plusieurs lignées de souris sont utilisées, toutes possèdent le même fond génétique C57Bl/6, les animaux de chaque lignées sont génotypés quelques jours après la naissance.

L'ensemble des expériences réalisées ont fait l'objet d'une validation par le comité d'éthique.

1.1.1 Lignée NCL flox

Notre laboratoire a créé, en collaboration avec l'Institut Clinique de la Souris à Illkirch, une lignée de souris transgéniques dans laquelle des séquences *loxP* ont été insérées dans le gène *Ncl*, c'est pourquoi cette lignée est dite « Ncl flox » (flanked by *loxP*).

Après analyse de la structure du gène, l'exon 3 a été sélectionné pour être la cible du KO conditionnel (Figure 7). L'excision de cet exon provoque un décalage dans la séquence de l'ARNm et l'insertion précoce d'un codon stop. Deux situations peuvent avoir lieu pour ce transcrit : soit il est détecté comme ARNm non-sens par les voies de contrôle qualité des ARNm, il est alors dégradé ; soit il est traduit, mais le cadre de lecture étant modifié par un codon stop prématuré présent dans la phase ouverte de lecture, la traduction est arrêtée, une protéine tronquée est obtenue. Comme il sera indiqué plus tard, les résultats des western blot ne montrent pas de protéines tronquées ce qui suggère que les ARNm sont dégradés.

Les séquences *loxP* ont été incorporées de part et d'autre de cet exon par recombinaison homologue dans des cellules ES à partir desquelles la lignée transgénique a été établie. L'allèle sauvage est noté Ncl^{+} et l'allèle contenant les séquences *loxP* dit allèle floxé Ncl^{fl} . La lignée est maintenue à l'état hétérozygote $Ncl^{+/fl}$ ou à l'état homozygote $Ncl^{fl/fl}$ selon les besoins des expériences.

La lignée Ncl flox est croisée avec différentes lignées exprimant la recombinaise Cre selon les expériences du projet.

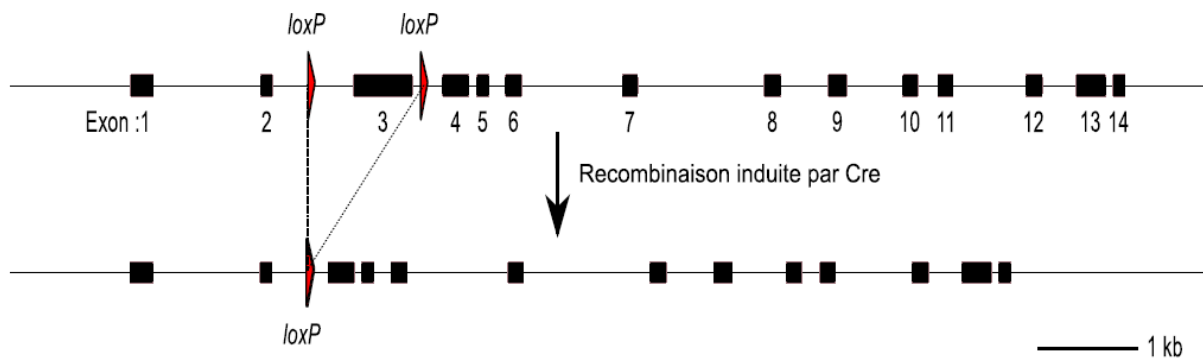


Figure 7 - Schéma du gène Ncl et cible du KO conditionnel.

Les séquences loxP sont positionnées de part et d'autre de l'exon 3 qui sera supprimé après la recombinaison induite par Cre.

1.1.2 Lignée Nestin-Cre

La lignée *Nestin-Cre* est décrite par (Betz et al., 1996). La région codante de *Cre*, incluant le signal de localisation nucléaire, est exprimée sous le contrôle du promoteur du gène *Nestin* de rat et d'un enhancer présent dans le second intron de *Nestin*. Comme décrit dans le paragraphe 2.2 « Le contrôle de la transcription de la recombinaase Cre », cette recombinaase s'exprime dans le SNC mais aussi dans d'autres organes.

1.1.3 Lignée Nestin-Cre (FT)

La lignée *Nestin-Cre* décrite par F.Tronche (Tronche et al., 1999) exprime Cre plus spécifiquement dans les précurseurs des cellules neuronale et gliales que la lignée précédente. Le transgène est localisé sur le chromosome 12 et son expression est détectée à partir de E10,5 dans le SNC.

Pour ces deux lignées *Nestin-Cre*, les souris qui possèdent le transgène seront notées *Nestin-Cre*⁺ et *Nestin-Cre*^{-/-} si elles ne l'ont pas. Quand le transgène est présent, seul les génotypes des parents pourront nous indiquer si le transgène est à l'état hétérozygote *Nestin-Cre*^{+/-}, le caractère homozygote ne peut pas être déterminé par la PCR de génotypage telle que nous l'employons. Les deux lignées sont maintenues à l'état hétérozygote *Nestin-Cre*^{+/-}.

1.1.4 Lignée RosaCreERT2

Cette lignée commerciale provient de chez Taconic (C57BL/6-*Gt(ROSA)26Sor*^{tm9(Cre/ESR1)Arte}) (Seibler et al., 2003). Comme mentionné plus au paragraphe 2.3, le transgène codant CreERT^{T2}

est inséré dans le locus *Gt(ROSA)26*. Cette lignée exprime la recombinaise CreER^{T2} de manière ubiquitaire, l'activité de recombinaise est induite par l'administration de tamoxifène. Le fournisseur mentionne une efficacité de la délétion variable selon les organes et les gènes ciblés : supérieure à 70 %, excepté dans le cerveau où elle est plus faible, moins de 70 % (Biosciences, n.d.).

Pour faciliter la lecture de ce manuscrit, le transgène codant CreER^{T2} sera désormais noté *CreER^{T2}* et la nomenclature suivante sera utilisée : transgène à l'état homozygote *CreER^{T2/+}* ; transgène à l'état hétérozygote *CreER^{T2+/-}* ; absence de transgène *CreER^{T2-/-}*. Cette lignée est maintenue à l'état homozygote *CreER^{T2/+}*.

Il faut noter que la société Taconic qui commercialise la « lignée Rosa-CreER^{T2} » recommande la présence à l'état hétérozygote de ce transgène au cours des expériences, afin de minimiser d'une part la probabilité d'événements de recombinaison indésirables et d'autre part la toxicité inhérente à la présence de Cre.

1.2 Les conditions d'hébergement

Les lignées murines citées précédemment sont hébergées sur le Plateau de Biologie Expérimentale de la Souris (PBES) de l'ENS de Lyon. Cette plateforme technologique de la Structure Fédérative de Recherche BioSciences, a un statut sanitaire EOPS (Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique). Les conditions d'hébergement sont résumées dans le Tableau I, sachant que les souris utilisées sont dans le secteur élevage ou dans le secteur expérimental A1.

Tableau I - Paramètres d'hébergement.

Source : PBES – ENS de Lyon

	Secteur expérimental A1				Secteur élevage			
Etage	Rez-de-chaussée				Premier étage			
Pièce	001	001	002	003	101	102	103	104
Hébergement	Portoirs ventilés en surpression	Cages conventionnelles			Portoirs ventilés en surpression			
Manipulation des animaux	Sous hotte de change	Conventionnelle			Sous hotte de change			
Pression dans les pièces d'hébergement	30 Pa +/- 5 Pa							
Renouvellement d'air	15 volumes / heure							

Température des pièces d'hébergement	22°C +/- 2°C
Hygrométrie des pièces d'hébergement	50 % +/- 10 %
Lumière dans les pièces d'hébergement	Alternance Jour / Nuit : 13/12h Phase lumineuse : 7h30 - 20h30 Changement heure d'été / heure d'hiver
Nourriture	Sauf exceptions : Reproducteurs, petits avant sevrage : formule « élevage » irradiée à 10 kGy (réf : A03-10, société SAFE) Animaux après sevrage : formule « entretien » irradiée à 10 kGy (réf : A04-10, société SAFE)
Boisson	Eau de ville adoucie, acidifiée (PH 4 à 6) et chlorée (4,5 à 6,5 ppm)
Litière	Sciure de peuplier calibrée (réf. 29/12, société Souralit) autoclavée 20 minutes à 121°C

1.3 L'administration du tamoxifène

Comme indiqué en introduction, la recombinaise CreER^{T2} a une activité dépendante de la présence du tamoxifène. Cette molécule synthétique a une forte affinité pour les récepteurs aux œstrogènes et sa molécule active, le 4-OHT, va se fixer de manière spécifique sur la recombinaise chimère.

Une solution de tamoxifène (Cayman chemical company – 13258) à 10 mg/mL est préparée par dissolution dans de l'huile de colza à 37°C à l'abri de la lumière. La solution est filtrée (0,22 µm) et aliquotée puis conservée à -20°C. Le tamoxifène est administré aux souris par injection intrapéritonéale (*i.p*) de 100µL, 1 mg/souris adulte (~40-45 mg/kg/jour). Chaque souris reçoit une injection quotidienne d'un mg pendant cinq jours consécutifs (J1 à J5), selon le protocole proposé dans l'ouvrage *Transgenic Mouse Methods and Protocols* (Hofker and van Deursen, 2011).

Les souris sont pesées le premier jour de l'injection (J1), ce poids initial sert de référence pour l'ensemble de l'expérience. Les souris sont surveillées et pesées quotidiennement. Une perte de 20 % du poids initial est considérée comme une souffrance pour l'animal constituant un point limite. Aussi, dès qu'une souris atteint ce point limite, elle est mise à mort.

1.4 Le prélèvement d'organes

Les conditions de prélèvement varient en fonction de la finalité de l'échantillon.

1.4.1 Echantillons à destination d'études de biologie moléculaire et biochimiques

La numérotation des souriceaux, de 1 à 99, se fait par le prélèvement de certains doigts des pattes, entre huit et dix jours après la naissance (P8 à P10). Ce prélèvement est indolore à cet âge, puisque les doigts ne sont pas encore innervés. Les phalanges coupées sont utilisées pour réaliser les génotypages.

La souris adulte est tuée par dislocation cervicale, pesée et rapidement disséquée. Les organes sont prélevés, éventuellement pesés, rincés au PBS 1X si nécessaire, congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Les souris pour lesquelles un dosage du cholestérol est réalisé sont anesthésiées par l'administration dans l'œil d'une goutte de chlorhydrate de tétracaïne à 10 mg/mL (~0,5 mg/œil). Les prélèvements de sang sont réalisés dans le sinus rétro-orbital à l'aide d'une pipette en verre. Le sang est prélevé dans un tube sans traitement particulier, laissé à température ambiante pendant 30 min afin qu'il coagule. Le tube est centrifugé 10 min à 10000 g à 4°C. Le surnageant (sérum) est congelé à -20°C.

1.4.2 Echantillons à destination d'études histologiques

La souris est pesée, anesthésiée par un mélange de kétamine (33mg/mL) et xylasine (0,6mg/mL) en *i.p.* (~90 µL/souris). La kétamine est un analgésique qui empêche la douleur tandis que la xylasine est un sédatif qui provoque l'endormissement de l'animal entraînant une myorelaxation.

Dès que la souris est endormie, elle est disséquée pour accéder au cœur. Une perfusion intracardiaque de PBS 1X est réalisée afin de remplacer le sang par le PBS. Quand il n'y a plus de sang, l'animal est perfusé avec 5 à 10 mL d'une solution de PFA 4% - PBS 1X qui commence à fixer les organes et entraîne sa mort. La perfusion terminée, les organes sont prélevés et fixés dans du PFA 4% - PBS 1X à 4°C entre une nuit et 24h.

La suite du traitement des échantillons est décrite dans le paragraphe histologie.

1.5 Les tests de comportement

Les tests de comportements ont été réalisés avec l'aide de Christian Nielsen, dans le cadre de son stage de Master Biosciences 1^{ère} année tandis que les expériences sur la démarche ont été faites avec l'aide de John Giorgi, étudiant de l'Université d'Ottawa lors de son stage de Master.

Des souris mutantes *Ncl*^{+fl/Δ}; *Nestin-Cre* (FT)^{+/-} et des souris contrôles *Ncl*^{+/+}; *Nestin-Cre*(FT)^{+/-} ont subi plusieurs tests. Ils sont faits par paire mutant/contrôle de même âge et de même sexe, avec des souris âgées de 2 à 17 mois.

Les tests de comportement sont sensibles aux influences externes et leur réalisation requiert des précautions. Tous les tests ont été réalisés au PBES, dans une pièce plus spécialement dédiée à cet usage, où il est possible de contrôler le niveau d'éclairage. Tous les tests sont conduits en silence, sans gestes brusques, en évitant toute manipulation inutilement stressante pour l'animal. Les animaux sont placés dans cette pièce 30 minutes avant le début des tests.

1.5.1 Test de l'open field

Ce test mesure l'activité générale et le comportement d'exploration des rongeurs par l'enregistrement des déplacements et mouvements de l'animal.

Le support est composé d'une boîte en PVC gris neutre ouverte de 40 x 40 cm avec quatre parois suffisamment hautes pour éviter que les animaux ne s'échappent. Une caméra associée au logiciel Ethovision XT (Noldus) est utilisée pour l'enregistrement, le suivi et l'analyse des mouvements des souris. L'intensité lumineuse mesurée dans la boîte est de onze lux. Le test dure 20 minutes par souris.

Pour l'analyse, la surface disponible est divisée virtuellement en neuf zones carrées d'aire identique. Une zone supplémentaire inclue une bande de trois centimètres de large le long de chaque mur. Pour éliminer les mouvements de faible amplitude, comme des tremblements qui perturberaient le calcul des distances parcourues, une distance de déplacement minimale de sept mm est requise. Pour calculer la vitesse moyenne seulement quand les souris bougent, et non sur les périodes d'inactivité qui surviennent pendant les 20 minutes d'enregistrement, une vitesse minimale de 2,5 cm.s⁻¹ est requise.

Ce test a été effectué sur sept souris contrôles et huit souris mutantes. Une souris est testée à la fois : elle est déposée dans la boîte, libre de ses déplacements pendant la durée du test. La boîte est nettoyée avec un papier absorbant humidifié à l'eau après chaque animal.

1.5.2 Test de lumière et zone sombre

Ce test est complémentaire du test précédent, il mesure l'activité locomotrice et l'anxiété. Il est basé sur la réponse comportementale de la souris face à de faibles stress : un nouvel environnement et la présence de lumière dans cet environnement. De manière innée, les rongeurs ont une aversion pour les zones illuminées et en même temps ont un comportement spontané d'exploration face à un nouvel environnement. Les réactions de l'animal sont enregistrées par vidéo et analysées.

Les conditions opérationnelles sont identiques à celles décrites ci-dessus, la modification principale apportée est la présence d'un compartiment non éclairé recouvrant la moitié de la surface disponible. Une ouverture entre les deux compartiments permet à la souris de se déplacer à sa guise de l'un à l'autre des compartiments.

Dans ce test, sept souris contrôles et 19 souris mutantes sont impliquées. Le test dure cinq minutes, les souris sont testées individuellement.

1.5.3 Test de la barre horizontale

Ce test mesure la coordination motrice des souris. La mise en œuvre de ce test est une adaptation du test proposé par Deacon en 2013 (Deacon, 2013). Une barre métallique de trois mm de diamètre, en forme de U, est fixée à une hauteur de 20 cm au-dessus d'une cage contenant de la sciure pour amortir la chute des souris. La partie horizontale de la tige est de 38 cm, le milieu est identifié par une marque. L'intensité lumineuse est de 350 lux lors du test. La tige est nettoyée après chaque test.

La souris est attrapée par la queue et est déposée au milieu de la tige de telle sorte qu'elle s'agrippe uniquement avec ses pattes avant. Une fois lâchée, la souris doit attraper la tige avec ses pattes arrière et atteindre un des angles. Le temps nécessaire pour réaliser cette activité est mesuré en secondes puis converti en points. Les souris capables d'atteindre une des extrémités ou de rester sur la barre plus de 30 secondes ont le maximum de points.

Dans ce test, six souris contrôles et 17 souris mutantes sont évaluées. Les souris sont testées individuellement et chacune a trois essais avec un temps de récupération entre chaque. La moyenne est calculée pour chaque souris dans chaque génotype. Les souris sont habituées à la pièce où se déroule le test, pendant au moins dix minutes.

1.5.4 Test des barres parallèles

Ce test évalue la coordination motrice et l'équilibre.

Deux barres parallèles (4 mm de diamètre, 90 cm de long, 3 cm d'espacement) sont placées à 11 cm au-dessus de la paillasse. Deux cages avec de la sciure sont placées sous les extrémités des barres.

Les souris sont placées au milieu des barres, perpendiculaires à celles-ci. Les pattes avant sont sur une barre et les pattes arrière sur l'autre. La distance parcourue (maximum de 45 cm) est mesurée et le nombre de pertes d'équilibre est compté. Le temps pour atteindre l'une des cages est mesuré.

Dans ce test, sept souris contrôles et huit souris mutantes sont évaluées. Elles sont d'abord entraînées pendant deux jours par cinq répétitions consécutives de trois essais chacune, sans pause entre chaque essai et une pause de cinq minutes entre chaque répétition. Le troisième jour, les souris ont un dernier entraînement de trois essais avant le test final constitué de trois essais. Les souris qui hésitent sont délicatement stimulées de la main tandis que celles qui tombent dans les cinq premières secondes ont un nouvel essai.

1.5.5 Analyse de la démarche

L'analyse de la démarche des souris est faite avec le test des empreintes.

Ce test est une adaptation du protocole proposé par (Clark et al., 1997). Un couloir métallique ouvert (50 cm de long, 9 cm de large, 5 cm de hauteur) est recouvert de papier blanc. De la peinture à l'eau est déposée sur les pattes avant (rose) et arrière (bleue) des souris avec un pinceau. Les souris sont rapidement déposées à l'entrée du couloir et avancent le long de celui-ci. Elles sont délicatement poussées de la main si elles ne se déplacent pas. Chaque souris réalise une empreinte par jour pendant trois jours consécutifs en une semaine. A partir des empreintes laissées sur le papier, plusieurs paramètres sont analysés.

- *La longueur du pas* : Distance divisée par le nombre de pas nécessaires pour parcourir cette distance.
- *La largeur de la démarche* : Distance minimale entre l’empreinte d’une patte et une ligne reliant les empreintes consécutives de la patte contra-latérale (Figure 8A).

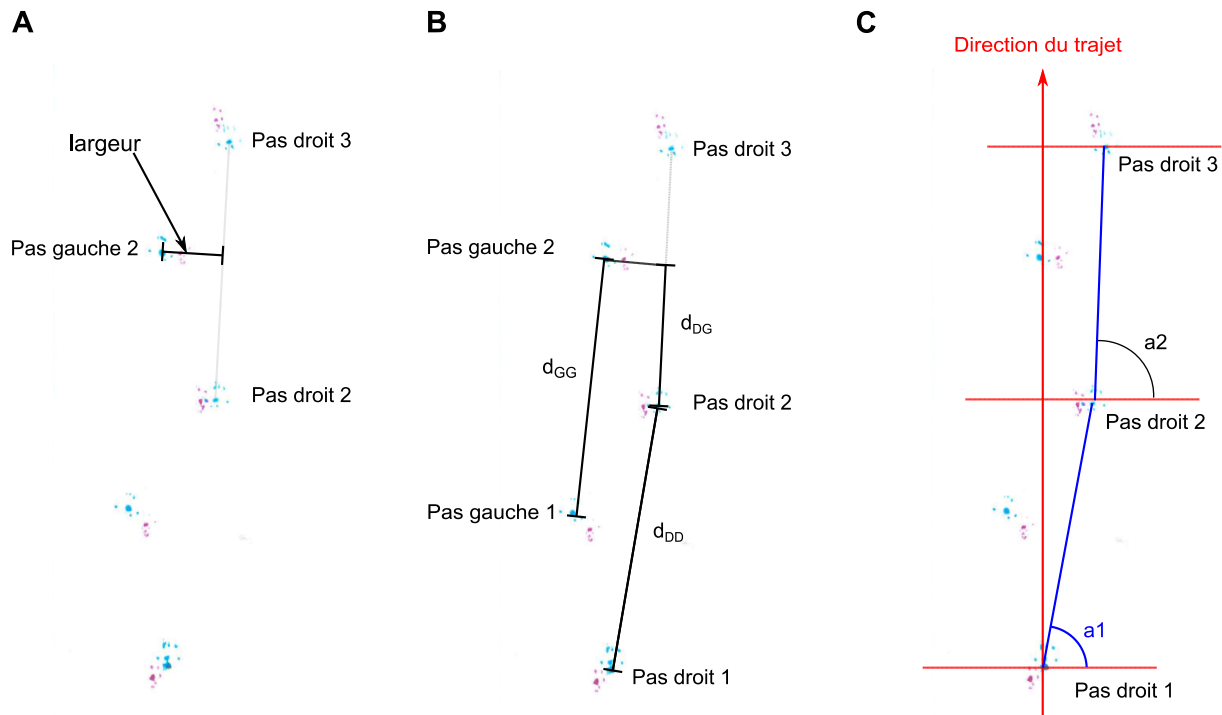


Figure 8 - Schémas explicatifs pour l’analyse de la démarche.

Les empreintes des pattes avant sont roses et celles des pattes arrière sont bleues. (A) Largeur de la démarche. (B) Schéma représentant les distances à prendre en compte pour déterminer le coefficient d’alternance. (C) Schéma pour déterminer les angles du mouvement linéaire.

- *Le coefficient d’alternance* : il décrit l’uniformité de l’alternance des pas.

La distance du pas Droite-Gauche (d_{DG}) et la distance du pas Droite-Droite (d_{DD}) sont mesurées pour chaque paire de pas droite-gauche. Le ratio d_{DG}/d_{DD} est calculé puis soustrait à 0,5. Tous les ratios sont ensuite moyennés en valeurs absolues (Figure 8b).

Dans une alternance parfaite, le coefficient d’alternance est proche de 0 tandis qu’une démarche qui traîne le coefficient est proche de 0,5.

- *Le mouvement linéaire* : il donne une indication sur la linéarité du déplacement.

Une ligne perpendiculaire à la direction du trajet est tracée au niveau du premier pas droit. L’angle entre cette ligne perpendiculaire et les empreintes droites successives est calculé. Les différences d’angle a sont calculées entre chaque paire successive ($a_2 - a_1$; $a_3 - a_2$) (Figure 8c). Les valeurs absolues de toutes les différences d’angle sont ajoutées puis divisées par le

nombre de pas. Si la mesure obtenue est élevée cela signifie que le déplacement n'est pas linéaire.

Toute cette analyse de la démarche a été effectuée sur dix souris contrôles et neuf souris mutantes.

1.6 Le suivi de gestation

La gestation d'une souris est de 19 à 21 jours, l'Annexe 1 en présente les différents stades et les principales étapes. Les femelles en accouplement sont suivies quotidiennement par la vérification de la présence ou non du bouchon vaginal. Quand celui-ci est présent, il est considéré que la fécondation a eu lieu depuis 0,5 jour (E0,5 – Embryonic day) et la naissance a lieu trois semaines plus tard. Les femelles sont suivies avec attention pour identifier correctement le jour de naissance.

1.7 Administration de BrdU

Une solution de BrdU, bromodésoxyuridine, à 20 mg/mL est préparée par dissolution dans du PBS 1X à 37°C, filtrée (0,22 µm), aliquotée et conservée à -20°C. Le BrdU est un analogue de la thymidine et s'incorpore dans l'ADN lors de sa réplication. C'est une molécule qui permet d'identifier les cellules en prolifération, seules les cellules en phase S seront marquées.

De jeunes souris mutantes $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre$ (FT) $^{+/-}$ (n = 7) et des souris contrôles $Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre$ (FT) $^{+/-}$ (n = 6) de 11 jours (P11) sont pesées et reçoivent du BrdU en *i.p* (~50µg µg/g de souris). Les souriceaux sont gardés pendant deux heures dans du coton et sous une lampe pour limiter la perte de chaleur. Ils sont tués par décapitation, leur cerveau est prélevé puis fixé au PFA 4% - PBS 1X pendant 12 à 24h. L'échantillon est ensuite préparé en fonction de son analyse finale.

1.8 La culture d'embryon

Cette expérience concerne les souris de la lignée RosaCreER^{T2}. Les croisements sont réalisés de telle sorte que tous les embryons soient du même génotype afin de ne pas avoir besoin de

faire leur génotypage. Tous les embryons obtenus sont hétérozygotes $CreER^{T2+/-}$, et pour Ncl , ils sont soit $Ncl^{+/+}$, soit $Ncl^{+/fl}$ ou $Ncl^{fl/fl}$.

Les femelles reçoivent une injection de 100µL en *i.p* d'hormone dite H1 (SYNCRO-PART® PMSG Bovins-Ovins-Caprins) à 50 UI/mL. Cette hormone, la gonadotrophine sérique équine (eCG) ou PMSG (Pregnant Mare's Serum Gonadotropin), induit et synchronise les ovulations, active la maturation des ovocytes. 46 à 48h après l'injection de H1, elles reçoivent une injection de 100µL en *i.p* d'hormone dite H2 (Chorulon®) à 50 UI/mL. La gonadotrophine chorionique humaine (hCG) achève la maturation du follicule et provoque sa rupture. Elle favorise l'ovulation ainsi que l'apparition du corps jaune. Après l'injection de H2, les femelles sont mises en accouplement. Le lendemain de la mise en accouplement, les femelles sont triées en fonction de la présence ou non d'un bouchon vaginal. Celles qui ont un bouchon vaginal sont mises à mort par dislocation cervicale à E1,5 de gestation. Les oviductes sont prélevés puis disséqués, sous loupe binoculaire, de manière à en extraire les embryons à 2 cellules. Ces derniers sont mis en culture dans du KSOM + 4 mg/mL BSA à 37°C, 5% CO₂. Selon les conditions expérimentales, une concentration finale de 1 µM de 4-hydroxytamoxifène (4-OHT) est ajoutée ou non au milieu de culture pendant 24h. Passé ce délai, le milieu de culture est changé pour toutes les cultures d'embryons. Les embryons sont photographiés chaque jour pour voir l'évolution de leur développement jusqu'à E4,5.

2. Biologie moléculaire et biochimie

2.1 Le génotypage

Le génotypage des souris consiste à caractériser les allèles ou la présence de nos différents gènes d'intérêt. Pour cela, il est nécessaire d'extraire l'ADN génomique à partir d'un fragment de tissu (doigts, queue, peau...) puis de l'amplifier par la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) avec des amorces spécifiques du gène et enfin de réaliser une détection sur gel d'agarose.

La technique de PCR confère à ces analyses une sensibilité telle que des précautions strictes doivent être prises pour éviter les contaminations qui généreraient des faux positifs. Un jeu de pipettes est dédié à cet usage et toutes les pipettes sont munies de pointes à filtres. Elles sont régulièrement nettoyées par autoclavage ou traitement avec une solution *ad hoc*. L'ADNg est extrait sur une paillasse et avec du matériel dédié, les PCR sont assemblées sur

une paillasse distante et les tubes d'ADNg sont manipulés de sorte à éviter les contaminations par « carry over ». L'analyse des PCR par électrophorèse est menée dans une pièce distincte. Des contrôles positifs et négatifs sont systématiquement inclus dans chaque série de PCR.

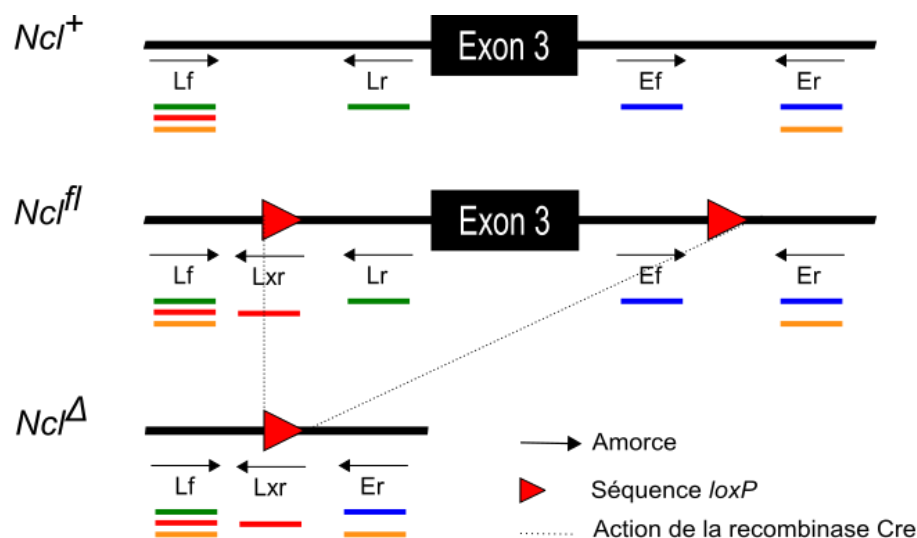
2.1.1 Extraction d'ADN génomique (ADNg)

Le tissu est tout d'abord dissocié dans 100 µL d'un tampon de lyse contenant une protéase thermostable (KapaBiosystems ; Kapa Express Extract ; KK7103) pendant dix minutes à 75°C. La protéase est inactivée par une incubation de cinq minutes à 95°C. Le milieu réactionnel est mélangé puis centrifugé une minute à 15800 g afin de séparer les débris cellulaires du surnageant dans lequel se trouve l'ADNg. L'ADNg est conservé à -20°C.

Chaque gène d'intérêt est caractérisé par une ou plusieurs PCR à partir d'1 µL d'ADNg (~25ng).

2.1.2 Analyse du locus *Ncl*

Plusieurs couples d'amorces peuvent être utilisés pour déterminer les allèles de *Ncl*. La Figure 9 précise la position des différentes amorces en fonction de la région analysée et les tailles attendues des fragments PCR.



Couple d'amorces	Lf 4788 / Lr 4789	Ef 4785 / Er 4784	Lf 4786 / Lxr 4787	Lf 4783 / Er 4784
Région analysée	Présence de <i>loxP</i> en position distale	Vérification de l'excision du marqueur de sélection	PCR spécifique des séquences <i>loxP</i>	Vérification de l'excision de l'exon 3
<i>Ncl</i> ⁺	223 pb	288 pb		1226 pb
<i>Ncl</i> ^{fl}	303 pb	393 pb	197 pb	1450 pb
<i>Ncl</i> ^Δ			197 pb	400 pb

Figure 9 – La stratégie de génotypage permet d'identifier les allèles du gène *Ncl*.

Les amorces Lf4783/Er4784 amplifient les trois types d'allèles possibles pour *Ncl* et permettent d'identifier la présence de la délétion. Les Lf4786/Lxr4787 sont spécifiques de la séquence *loxP* tandis que les autres couples d'amorces identifient les allèles sauvages et *loxP*.

Les amorces Lf 4783/Er 4784 permettent de déterminer si la délétion de l'exon a été réalisée. Ce couple d'amorces est utilisé systématiquement dès que l'exon 3 du gène *Ncl* est susceptible d'être excisé. Une autre PCR est effectuée avec les amorces Ef 4785/Er 4784. Cette PCR permet de savoir si la séquence *loxP* est présente ou non et de lever d'éventuelles ambiguïtés présentes dans la première PCR. Ce couple d'amorces a été choisi en raison de l'absence d'un amplicon aspécifique de 400 pb que l'on peut observer avec les amorces Lf 4788/Lr 4789 lorsque les échantillons sont hétérozygotes *Ncl*^{+/fl}. Enfin, les amorces Lf 4788/Lxr 4787 sont spécifiques de la séquence *LoxP* mais ne permettent pas de discriminer à elles seules si la délétion est effective.

2.1.3 Détermination de la présence des transgènes *Nestin-Cre* et *Nestin-Cre* (FT)

Selon les croisements, les souris possèdent ou non le transgène *Nestin-Cre*.

Cette PCR utilise deux couples d'amorces : le couple Cre 531/Cre 819, spécifique du transgène et le couple CD8S/CD8AS utilisé comme contrôle interne. En effet, si le transgène *Nestin-Cre* est présent dans les cellules, les amorces Cre 531/Cre 819 donneront un amplicon d'une taille théorique de 288 pb détectable sur gel d'agarose à ~300 pb. En revanche, si le transgène est absent, ces amorces ne s'hybrideront pas sur l'ADNg et aucune bande ne sera détectée sur gel. Dans cette situation, on ne peut pas savoir si l'échantillon testé est *Nestin-Cre*^{-/-} ou s'il y a eu un problème d'amplification. Pour pallier à cette indétermination, les amorces CD8S/CD8AS sont ajoutées au milieu réactionnel afin d'amplifier 100 pb de l'ADNg sur tous les échantillons à génotyper et s'assurer que la réaction de PCR s'est déroulée correctement.

2.1.4 Détermination de la présence du transgène *Rosa-CreER*^{T2}

La PCR de génotypage du transgène *Rosa-CreER*^{T2} nécessite trois amorces : R26F2 et R26R, spécifiques du locus *Gt(ROSA)26*, et CreER qui s'hybride sur la séquence du transgène. La Figure 10 précise la position de celles-ci.

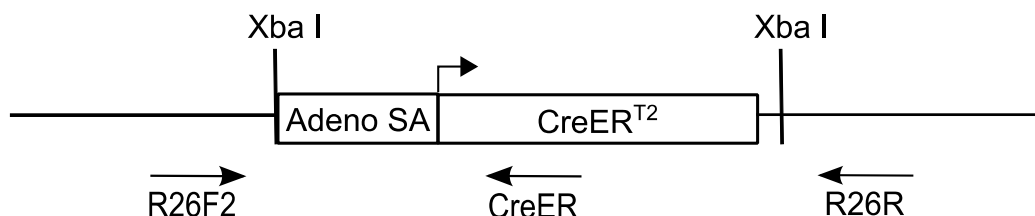


Figure 10 - Position des amorces sur le transgène *Rosa-CreER*^{T2}.

Les amorces R26F2/CreER fonctionnent en présence du transgène *CreER*^{T2} et ne donnent pas d'amplicon s'il est absent.

Si le transgène est absent, l'amorce CreER ne sera pas utilisée et les amorces R26F2/R26R permettront l'amplification d'un fragment de 650 pb en théorie et détectable à 600 pb sur gel d'agarose. L'échantillon est alors considéré comme sauvage *CreER*^{T2/-}.

En revanche, si le transgène est intégré dans le locus *Rosa26*, les amorces R26F2/CreER peuvent s'hybrider et un amplicon de 900 pb sur gel d'agarose indiquera la présence du transgène.

L'ensemble des caractéristiques des PCR des différents gènes est précisé dans l'Annexe 2.

Etant donné que la PCR Lf 4783/Er 4784 donne des amplicons de tailles différentes, elle est parfois délicate à réaliser. Aussi, le kit FastStart PCR Master de Roche (Cat

n°04 710 444 001) est utilisé avec 0,4 μ M pour chacune des amorces pour un volume de réaction de 25 μ L. Les autres PCR sont préparées avec le kit GoTaq DNA Polymerase (Promega M3175) dans un volume final de 15 μ L en utilisant 0,2 μ M de chaque amorce ; 0,2 mM de chaque dNTP et 0,375U d'enzyme par réaction.

2.1.5 Electrophorèse sur gel d'agarose

Une fois les réactions d'amplification terminées, une étape d'électrophorèse sur gel d'agarose de 0,8 à 2 % préparé dans du TAE 0,5X (Tris, Acétate, EDTA pH8) permet de séparer les amplicons en fonction de leur taille.

La migration se fait dans un tampon TAE 0,5X à 100V pendant 20 à 30 minutes selon les PCR. Le gel est ensuite incubé pendant 15 minutes dans un bain de TAE 0,5X avec du bromure d'éthidium (BET) à 0,5 μ g/mL. Cette molécule va s'intercaler entre les brins d'ADN amplifiés. Le gel est exposé à une lumière UV à 250 nm, le BET est excité et devient fluorescent rouge-orange ce qui permet la visualisation des bandes amplifiées. Un marqueur de poids moléculaire adapté (50 pb, 200 pb ou 1 kb) à la taille des fragments est déposé sur chaque gel ainsi que des contrôles négatifs (H_2O à la place de l'ADNg) et positifs (des échantillons des génotypes attendus).

2.2 Extraction d'ADN, ARN et protéines

A partir des échantillons prélevés et congelés dans l'azote liquide (cf. §1.4.1), une triple extraction d'ADN, ARN et protéines est réalisée avec le kit « Total DNA, RNA and protein » isolation de Macherey-Nagel (réf. 740966) selon le protocole du fournisseur.

L'ADN est utilisé pour vérifier le génotype dans l'organe étudié, les protéines sont utilisées pour des analyses en western blot. Les ARN sont conservés à -80°C.

2.3 Electrophorèse des protéines par SDS-PAGE

La technique de SDS-PAGE est une électrophorèse en gel de polyacrylamide en condition dénaturante apportée par le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Le SDS est un détergent anionique très fort qui casse la structure tridimensionnelle des protéines en dépliant les

chaînes polypeptidiques. De plus, les anions se lient aux acides aminés de la protéine lui donnant une charge globale négative. Ayant toutes la même charge électrique, les protéines sont alors séparées en fonction de leur poids moléculaire par un courant électrique. Les protéines de faible poids moléculaires migrent plus vite tandis que les protéines de poids moléculaire élevé migreront moins et on les retrouvera en haut du gel.

Le gel d'électrophorèse est composé de deux parties. Un gel dit de concentration (4 % acrylamide : bis-acrylamide 29 : 1 ; 130 mM Tris HCl pH6,8 ; 0,1 % SDS ; 10 mM APS ; 0,1 % TEMED) avec des puits dans lesquels on dépose 1 à 5 µL de protéines/puits. Dans ce gel, les protéines, dénaturées par le SDS, se concentrent avant de passer dans le gel de séparation (10 % acrylamide: bis-acrylamide 29 :1 ; 375 mM Tris HCl pH8,8 ; 0,1 % SDS ; 10 mM APS ; 0,1 % TEMED) dans lequel a lieu la séparation en fonction de leur poids moléculaire.

En fonction de la masse de la protéine à étudier le pourcentage d'acrylamide/bis-acrylamide est modifié afin d'augmenter ou de diminuer les réticulations du gel de séparation et donc d'affiner la séparation.

La migration se fait dans du tampon (25 mM Tris ; 200 mM Glycine ; SDS 0,1 %) pendant 20-30 min à 30 mA le temps que les échantillons soient sortis du gel de concentration puis ~1h à 50 mA une fois dans le gel de séparation.

2.4 Western Blot

Une fois les protéines séparées, elles sont transférées sur une membrane de nitrocellulose par un champ électrique afin de révéler notre protéine d'intérêt avec un ou plusieurs anticorps.

Le transfert se fait en milieu liquide ou semi-sec (Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell ; Biorad) avec le tampon de migration auquel est ajouté 20 % Ethanol pendant 1h à 25 V selon les indications du fournisseur. Un marqueur coloré de poids moléculaire, ayant migré en même temps que les échantillons, indique si le transfert s'est fait de manière correcte.

La membrane est ensuite incubée dans un tampon de blocage (PBS 1X ; Tween 0,1% ; lait 5%) pendant 45 minutes à température ambiante sous agitation légère. Les protéines du lait viennent se fixer de manière non spécifique sur la membrane pour limiter l'hybridation aspécifique par l'anticorps primaire qui générerait du bruit de fond.

La solution d'anticorps primaire contient un anticorps polyclonal de lapin anti-nucléoline 134 dilué 1/1000 et un anticorps monoclonal de souris anti-β actine (Sigma A5441) dilué 1/2000 dans du PBS 1X – Tween 0,1 % - lait 1 %. L'anticorps anti-β actine sert de contrôle interne

pour vérifier que les échantillons ont sensiblement tous la même quantité de protéines. La membrane est incubée 1h à température ambiante sous agitation légère dans cette solution d'anticorps. Trois lavages de 10 minutes sont ensuite effectués dans du PBS 1X ; Tween 0,1%.

L'incubation avec la solution d'anticorps secondaires se fait sur la nuit à 4°C sous agitation légère. Les anticorps secondaires sont des anticorps de chèvre anti-souris et anti-lapin dilués respectivement à 1/15000 et à 1/2500 dans du PBS 1X – Tween 0,1 % - lait 1 % et liés à des fluorochromes IRDye 680 et IRDye 800 (LI-COR 926-32220 et 926-32211).

Trois lavages de 10 minutes dans du PBS 1X ; Tween 0,1 % et un dans du PBS 1X sont effectués avant la révélation de la membrane avec le scanner Odyssey de Li-Cor qui enregistre les signaux obtenus suite à l'excitation des fluorochromes. L'ensemble de la procédure permet une quantification plus aisée qu'avec un système chimioluminescent.

La quantification du signal obtenu est calculée par le logiciel Image Studio Lite. Le ratio NCL/Actine permet de normaliser les résultats obtenus.

2.5 Dosage du cholestérol

Le dosage du cholestérol est réalisé sur le sérum de six souris *Ncl^{fl/fl} CreER^{T2+/-}* et six souris *Ncl^{+/+} CreER^{T2+/-}*, à J1 (avant injection) et à J8, le jour de leur mise à mort après avoir reçu du tamoxifène de J1 à J5.

Le protocole du « Total cholesterol assay kit (colorimetric) » de Cell Biolabs, inc (réf. STA-384) a été adapté. Les sérums, obtenus selon le protocole décrit au paragraphe 1.4.1, sont au dilués 1/25. Les réactions sont réalisées avec cinq µL de sérum dilué et autant de réactif. La réaction colorimétrique se développe pendant une incubation de 45 min à 37°C puis un dosage de l'absorbance est fait au nanodrop à 570 nm. La concentration des échantillons est calculée à partir de la gamme étalon établie en parallèle des échantillons et selon les recommandations du manuel du kit.

3. Histologie et immunomarquages

3.1 Conditionnement des échantillons

Une fois fixé dans le PFA 4 % - PBS 1X pendant la nuit (cf. §1.4.1), les échantillons subissent soit une inclusion en paraffine en vue d'étudier la structure, la morphologie d'un tissu grâce à diverses colorations histologiques ; soit une inclusion en gélatine-sucrose avant congélation en vue de réaliser des marquages immunohistochimiques.

3.1.1 Inclusion en paraffine

Le principe de ce traitement est de déshydrater progressivement l'échantillon afin que la paraffine pénètre bien dans le tissu. Une succession de trois bains d'une heure chacun dans différents tampons et alcools est nécessaire. Le volume utilisé pour chaque bain est généralement 20 à 30 fois le volume de l'échantillon. La succession des bains est la suivante : PBS 1X ; éthanol 30 % ; éthanol 50 % ; éthanol 70 % (à la fin du premier bain, l'échantillon est coupé si nécessaire) ; éthanol 95 % ; éthanol 100 % ; butanol ; paraffine à 60°C.

L'inclusion finale consiste à déposer l'échantillon dans un moule en plastique préalablement identifié au fond duquel un peu de paraffine a été coulée. Une fois l'échantillon déposé et bien orienté, il est recouvert de paraffine chaude. La solidification se fait à température ambiante, les blocs de paraffine sont conservés à température ambiante ou à 4°C jusqu'à leur utilisation.

3.1.2 Inclusion en gélatine-sucrose

L'échantillon est incubé dans du PBS 1X entre une nuit et 24h à 4°C, puis dans un bain de PBS 1X – Sucrose 30% pendant 12h à 48h à 4°C. Le jour de l'inclusion, il est incubé dans une solution de gélatine 7,5% - sucrose 30%, pendant au minimum une demi-heure à 37°C pour imprégnation.

Pendant ce temps, des moules sont identifiés et annotés pour indiquer l'orientation future de l'échantillon à couper. Chaque moule est déposé sur une surface froide (4°C) et plane. Un fond de 2-3 mm de solution de gélatine-sucrose chaude (37°C) est coulé dans le moule. Une fois la couche gélifiée, l'échantillon est déposé dessus de manière orientée. Il est recouvert de

la solution de gélatine-sucrose en excès (environ 3 mm au-dessus de la pièce). Il faut attendre 10-15 minutes pour que le milieu d'inclusion se gélifie. Un bain de 2-méthyl-butane (isopentane) est refroidi, à l'aide de paillettes de carboglace, à -30°C, -40°C ; chaque moule y est ensuite plongé dedans. L'immersion dure 2 à 3 minutes jusqu'à ce que le milieu d'inclusion devienne blanc. Les échantillons sont conservés à une température inférieure ou égale à -20°C.

3.2 La réalisation de coupes d'échantillons

3.2.1 Coupe au microtome

Les échantillons inclus en paraffine sont coupés à température ambiante au microtome (Leica) à une épaisseur de huit à dix μm .

Des lames SuperFrost UltraPlus avec de l'eau sont posées sur une plaque chauffante à 37-39°C. Chaque coupe est déposée sur la goutte d'eau jusqu'à ce que la coupe ne présente plus de pli. L'eau est alors délicatement éliminée avec du papier absorbant. Chaque lame contient plusieurs coupes de l'échantillon à analyser. Les lames sont stockées dans une étuve à 37°C pendant plusieurs jours pour sécher les coupes, puis conservées à température ambiante jusqu'à leur utilisation pour des colorations ou immunomarquages.

3.2.2 Coupe au cryotome

Les échantillons congelés sont coupés avec un cryotome (Microm HM550) entre -17 et -20°C. Les coupes ont une épaisseur variant de 20 à 40 μm selon l'échantillon, elles sont collées par différence de température sur des lames SuperFrost UltraPlus.

Les lames sont conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Que les coupes soient réalisées au microtome ou au cryotome, les lames sont dites sériées. Pour cela une série de dix lames est utilisée. La première coupe est déposée sur une première lame, la deuxième coupe sur la deuxième lame et ainsi de suite jusqu'à la dixième lame, la onzième coupe sera sur la première lame au-dessus de la première coupe etc. Chaque lame aura le même nombre de coupes, chacune d'elle correspondant à une région de l'organe.

3.3 Analyse histologique des coupes par coloration

Avant la coloration, des étapes de déparaffinage et de réhydratation sont nécessaires. Elles consistent à passer les lames dans plusieurs bains successifs : deux bains de dix minutes dans du méthylcyclohexane, deux bains de trois minutes dans des alcools de degrés différents : éthanol 100 %, éthanol 95 %, éthanol 70 %. Un bain d'eau final permet la réhydratation.

Dans les coupes de cerveaux, la coloration au bleu luxol rapide a pour but de colorer les gaines de myéline en bleu-vert, les neurones sont violets et la contre-coloration au rouge nucléaire colore les noyaux cellulaires en rouge.

Le bleu luxol rapide est un colorant, soluble dans l'alcool, qui permet de détecter les lipoprotéines de la gaine de myéline des fibres nerveuses. Cette coloration s'effectue par un échange entre les bases des lipoprotéines et les bases du colorant. Une solution de bleu luxol rapide est préparée à 0,1 % dans de l'éthanol 95 %. Les lames sont incubées pendant 16-24 h dans cette solution à 58°C, rincées quelques minutes dans l'éthanol 95 % pour enlever l'excès de colorant et rincées dans de l'eau distillée. Les lames sont ensuite immergées dans une solution de carbonate de lithium 0,05% pendant quelques secondes, puis dans l'éthanol 70 % pendant 20-30 secondes jusqu'à ce que des substances grises-blanches visibles au microscope apparaissent. Enfin, les lames sont rincées dans deux bains de cinq minutes dans de l'eau distillée.

Une goutte d'une solution de rouge nucléaire, à 0,2 % dans 5% de sulfate d'ammonium, est déposée sur les coupes pour colorer les acides nucléiques. L'incubation dure dix minutes à température ambiante. Deux rinçages de cinq minutes sont effectués avec de l'eau. Une déshydratation est effectuée par des bains de trois minutes chacun d'éthanol à des degrés d'alcool croissant : éthanol 70 %, éthanol 95 %, deux bains d'éthanol 100% puis deux bains dans le méthylcyclohexane. Enfin chaque lame est recouverte d'une lamelle déposée sur quelques gouttes du milieu de montage DePeX (Electron Microscopy Sciences).

3.4 Expériences d'immunofluorescence

3.4.1 Détection du BrdU sur coupes de cerveaux

Les expériences d'immunofluorescence sur les coupes de cerveaux congelés ont été réalisées avec Yujin Suk, étudiante de l'université d'Ottawa à l'occasion de son stage de Licence.

Les lames séries sont traitées pendant deux heures dans du HCl 2M à température ambiante sous légère agitation, puis rincées quatre fois cinq minutes avec du PBS 1X pour ramener le pH à 7,4. Elles sont ensuite incubées dans une solution de blocage (8 % SVF, 0,3 % BSA, 0,3 % Triton-X100, PBS 1X) pendant une heure à 4°C sous agitation. Les coupes sont ensuite incubées avec deux solutions d'anticorps primaires dilués dans la solution de blocage : anti-BrdU FITC monoclonal produit chez la souris (Beckton Dickinson – réf. 347583) (1/50) et anti-Ncl 5567 polyclonal produit chez le lapin (1/300) (développé au laboratoire) pendant une nuit à 4°C puis rincées par quatre bains de cinq minutes dans du PBS 1X. L'incubation avec les anticorps secondaires dirigés contre les anticorps primaires de souris et couplés au fluorochrome Alexa Fluor® 488 (Invitrogen A11025) (1/1000) et les anticorps secondaires dirigés contre les anticorps de lapin couplés au fluorochrome Alexa Fluor® 555 (Molecular Probes A31572) (1/1000) dilués dans la solution de blocage dure deux heures à température ambiante.

L'incubation avec les différents anticorps secondaires dirigés soit, contre les anticorps primaires de souris soit contre les anticorps de lapin sont dilués dans la solution de blocage dure deux heures à température ambiante. Ces anticorps secondaires sont couplés au fluorochrome Alexa Fluor® 488 (Invitrogen A11025) (1/1000) et au fluorochrome Alexa Fluor® 555 (Molecular Probes A31572) (1/1000) respectivement.

Trois rinçages de cinq minutes dans du PBS 1X sont effectués avant de réaliser le montage dans le milieu de montage Fluoromont G (Southern Biotech) contenant du DAPI 1X (250ng/mL).

Les coupes sont photographiées au microscope confocal Zeiss et analysées par le logiciel Zen.

3.4.2 Analyse des jonctions neuromusculaires

Les expériences d'analyse des jonctions neuromusculaires ont été réalisées par Delphine Bauer de l'équipe « Architecture Nucléaire » dirigée par Alexandre Méjat de l'Institut NeuroMyoGene (INMG), CNRS UMR 5310 /INSERM U 1217/ UCBL I à Lyon.

L'expérience d'immunofluorescence a été réalisée sur des fibres musculaires de souris. Les muscles *tibialis anterior* sont disséqués et fixés dans du 4 % PFA-PBS 1X pendant 30 minutes à température ambiante puis rincés avec du PBS 1X (pH 7,5) à température ambiante. Chaque fibre musculaire est isolée individuellement avec des pinces ultrafines (Moria N°5) sous loupe binoculaire (Olympus). Les fibres sont perméabilisées et incubées dans un tampon de blocage (1% BSA/0,5% Triton X-100/1X PBS) à 4°C pendant la nuit, puis incubées avec

Alpha-bungarotoxin-Alexa Fluor conjugate (Molecular Probes; 1:1000) pendant une heure à température ambiante dans le tampon de blocage. Elles sont lavées trois fois une heure dans du 0,5% Triton X-100/PBS et laissées dans un bain supplémentaire sur la nuit à 4°C. Enfin, les fibres isolées sont incluses dans le milieu de montage Fluoromount G contenant du DAPI (250 ng/mL).

Les séries d'images en Z ont été collectées sur un microscope AxioImager Z1 (Zeiss). La pile d'images a été projetée en une image unique en utilisant le logiciel ImageJ. La surface du réseau des récepteurs à l'acétylcholine (AChR) a été quantifiée avec le logiciel Adobe© Photoshop CC 2014. Un minimum de 40 fibres musculaires par souris, de deux souris différentes pour chaque condition expérimentale a été analysé pour chaque coloration. Vingt jonctions neuromusculaires par souris ont été analysées.

Résultats

Le but principal de ce projet était de créer et de caractériser un modèle murin d'inactivation conditionnelle (cKO) du gène *Ncl*. Ce modèle est le premier disponible pour la communauté scientifique. Il permettra d'aborder des questions qui pour l'instant restent en suspens et n'étaient pas facilement abordables dans un modèle cellulaire. Nous avons adopté une démarche classique en utilisant la technologie de recombinaison de site-spécifique *Cre-loxP*. Comme montré ci-après, *Ncl* est vital ce qui confirme des résultats précédemment obtenus, par notre groupe et d'autres, sur des cellules en culture, après interférence par ARN contre *Ncl*. D'une manière plus surprenante, nous avons aussi montré que l'haploinsuffisance de *Ncl*, si elle est bien tolérée à l'âge adulte, entraîne l'apparition de phénotypes sévères et pénétrants si elle apparaît au cours du développement du système nerveux central.

1. Le génotypage des souris

L'ensemble des analyses présentées dans ce mémoire requiert une connaissance sans équivoque du génotype des animaux étudiés. Le génotypage permet de déterminer la nature des allèles de *Ncl* (sauvage, floxé, délété) et de savoir si les transgènes exprimant la recombinase Cre (*CreER^{T2}*, *Nestin-Cre* ou *Nestin-Cre (FT)*) sont présents dans le génome. Pour cela, les PCR sont réalisées sur l'ADNg extrait des doigts des souris qui ont été prélevés lors de l'identification des souriceaux. Cette approche est valide pour déterminer la présence des transgènes exprimant Cre, toutefois dans les cas des deux transgènes *Nestin-Cre* il n'est pas possible de savoir si l'individu est homo ou hétérozygote. En ce qui concerne la présence de la délétion, il faut garder à l'esprit que notre approche ne renseigne pas complètement sur l'état de délétion d'autres tissus.

1.1 Détermination des allèles de *Ncl*

Les résultats de la Figure 11A, B et C présentent le génotypage de différentes souris. Les souris *Ncl^{+/+}*, *Ncl^{+fl}* et *Ncl^{fl/fl}* possèdent un génotype connu par ailleurs par l'analyse par Southern blot réalisé à l'Institut Clinique de la Souris. La souris *Ncl^{+fl/Δ}* est issue du croisement d'une souris *Ncl^{+fl}* avec une souris *Nestin-Cre^{+/-}* tandis que la souris *Ncl^{fl/Δ}* est issue du croisement de souris *Ncl^{+fl/Δ}* entre elles. Ces deux souris possèdent un transgène exprimant Cre.

La Figure 11B présente les fragments amplifiés par le couple d'amorces Lf 4783/Er 4784 pour le gène *Ncl* (voir Figure 9 du Matériel et Méthode pour la description des amorces et la taille attendue des amplicons). Pour le premier échantillon, une seule bande d'environ 1200 pb est visible. Ce résultat est conforme à la taille attendue de l'amplicon (1226 pb) pour l'allèle sauvage et confirme que cette souris est de génotype *Ncl*^{+/+}. Le deuxième échantillon montre deux bandes, d'environ 1200 pb et 1400 pb. Ces tailles sont conformes aux amplicons attendus (1226 et 1412 pb) pour les allèles sauvages et floxés respectivement. Cette souris est donc de génotype *Ncl*^{+/fl} conformément à l'analyse par Southern blot. De même, le troisième échantillon n'a qu'une bande d'environ 1400 pb, cet animal est donc bien homozygote *Ncl*^{fl/fl}. Le quatrième échantillon présente trois allèles différents. En plus des allèles sauvages et floxés, une bande à 400 pb signale la présence de la délétion de l'exon 3 de *Ncl* (voir Figure 9). Cette souris est donc une mosaïque de cellules ayant ou pas réalisé la délétion de l'allèle floxé. Ce mosaïcisme est dû à l'expression stochastique de *Cre* dans les doigts. Ce caractère hétérogène sera discuté plus tard. Le génotype de ces souris mosaïque est noté *Ncl*^{+/fl/Δ}. Par un raisonnement analogue, la dernière souris est de génotype *Ncl*^{fl/Δ}. L'approche que nous utilisons ne nous permet pas de mesurer le degré de mosaïcisme des souris *Ncl*^{fl/Δ} et *Ncl*^{+/fl/Δ} : la PCR avec ces couples d'amorces n'est pas quantitative car elle donne lieu à des compétitions en amplicons que nous ne maîtrisons pas. L'amplicon du gène muté étant plus petit (402 pb) que ceux des allèles sauvage (1226 pb) et flox (1412 pb), il est amplifié de manière plus efficace et cette compétition peut masquer la présence des allèles sauvage et flox.

Pour confirmer la présence des allèles sauvages et floxés, nous réalisons des PCR avec le couple d'amorces Ef 4785/Er 4784 (Figure 11C) qui ne ciblent pas le gène excisé (voir Figure 9). La compétition est amoindrie, c'est un bon moyen de vérifier la présence des allèles sauvage et/ou flox. Avec ce couple d'amorces, l'allèle sauvage donne un amplicon d'environ 300 pb et l'allèle floxé d'environ 400 pb, conformes aux tailles attendues de 288 et 393 pb respectivement (voir Figure 9). Ces deux couples d'amorces ont été systématiquement utilisés dans nos travaux.

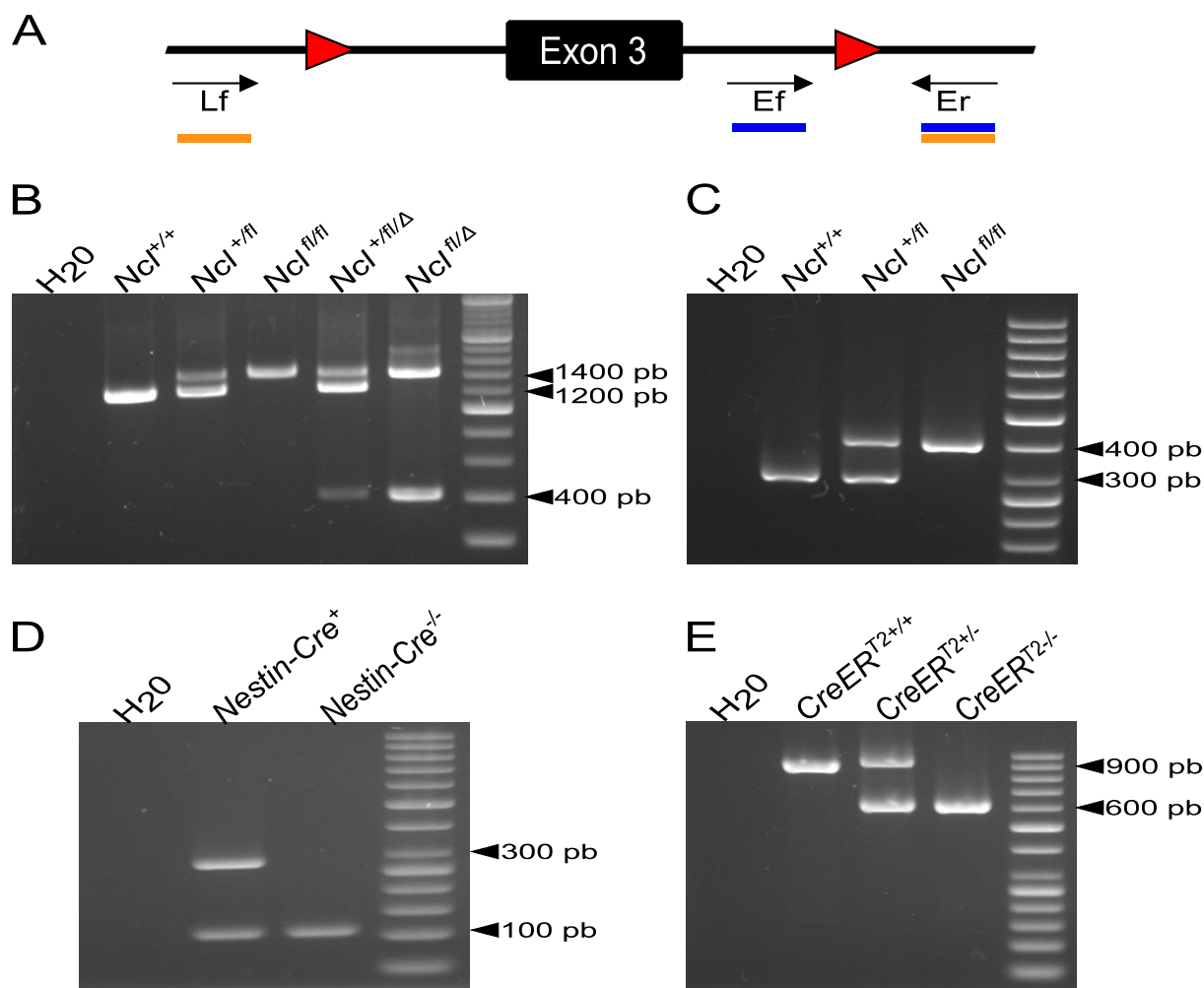


Figure 11 - Résultats des PCR de génotypage des échantillons.

(A) Schéma de positionnement des couples d'amorces utilisés pour déterminer les allèles de *Ncl*. (B) Identification des allèles du gène *Ncl* avec le couple d'amorces Lf/Er. (C) Identification des allèles du gène *Ncl* avec le couple d'amorces Ef/Er pour confirmer les allèles sauvage (288 pb) et floxé (393 pb) du gène *Ncl*. (D) Identification de la présence du transgène *Nestin-Cre* avec les amorces Cre 531/Cre 819/CD8 S/CD8 AS. L'amplicon à 288 pb indique la présence des transgènes *Nestin-Cre* ou *Nestin-Cre(FT)* dans le génome. Si ces derniers sont absents, seul le fragment du contrôle interne à 100 pb est visible. L'homozygotie ou l'hétérozygotie des transgènes est déduite du génotype initial des parents. (E) PCR *Rosa-CreER^{T2}* avec les amorces R26F2/R26R/CreER. Ce transgène peut être à l'état homozygote (900pb), hétérozygote (600 et 900 pb) ou absent (600 pb). Le témoin négatif utilise de l'eau au lieu d'ADNg.

1.2 Détermination de la présence des transgènes *Cre*

La Figure 11D illustre les résultats de PCR pour détecter le transgène *Nestin-Cre* ou *Nestin-Cre (FT)*. La bande à 100 pb est le contrôle interne qui valide que la réaction de PCR a bien fonctionné. La bande de 288 pb indique que le transgène est présent : la souris est *Nestin-Cre⁺*, alors que l'absence de bande signifie que l'animal ne possède pas ce transgène : il est *Nestin-Cre^{-/-}*. L'inconvénient de cette détection est que l'amplification de *Cre* n'utilise qu'un couple d'amorce, ne permettant pas de déterminer si l'animal possède le transgène à l'état hétérozygote ou homozygote. Il faut connaître le génotype des parents pour, selon les croisements, éventuellement lever cette ambiguïté.

Enfin la Figure 11E représente les amplicons issus de la PCR utilisée pour détecter la présence du transgène *CreER^{T2}*. Une bande unique aux alentours de 900 pb signifie que l'animal possède le transgène à l'état homozygote (noté *CreER^{T2+/+}*) tandis qu'une unique bande à 650 pb indique l'absence du transgène (génotype *CreER^{T2-/-}*). La présence des deux bandes indique un génotype hétérozygote *CreER^{T2+/-}*.

2. Vérification des effets des séquences *loxP* chez les souris de la lignée « NCL flox »

La lignée « NCL flox » étant la lignée à la base de tous les croisements, il a été vérifié dans les souris hétérozygotes *Ncl^{+/fl}* que la présence des séquences *loxP* n'a pas d'incidence majeure sur le développement embryonnaire. Pour cela, les souris *Ncl^{+/fl}* sont croisées entre elles et les génotypes des individus obtenus sont déterminés. Théoriquement, les ratios mendéliens suivants : 25 % *Ncl^{+/+}* ; 50 % *Ncl^{+/fl}* et 25 % *Ncl^{fl/fl}* sont attendus.

La Figure 12 montre que les trois génotypes sont présents dans les proportions attendues même si les animaux sauvages sont légèrement moins représentés.

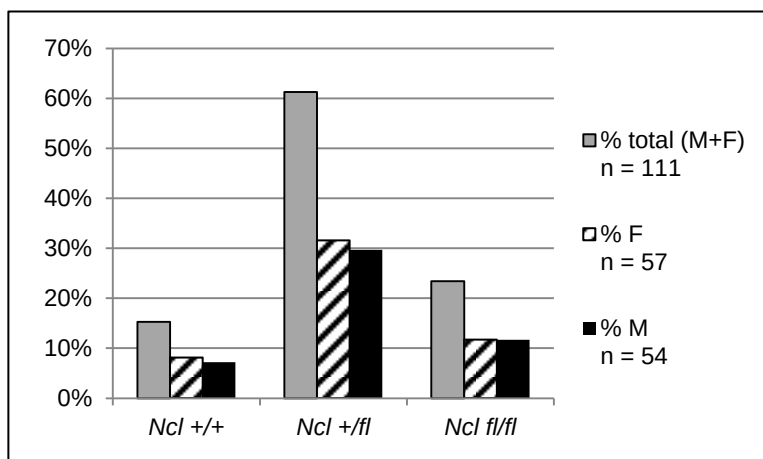


Figure 12 – Fréquences des génotypes obtenus dans les naissances issues de croisements entre souris *Ncl^{+/fl}*.
La fréquence des sexes au sein de chaque génotype est indiquée : M, mâles, histogramme noir ; F, femelles, histogramme hachuré ; Total, somme des mâles et femelles, histogramme gris.

Le ratio des sexes est proche de 1 pour les trois génotypes. Cette approche permet d'indiquer que la présence des séquences *loxP* ne semble pas perturber le développement des animaux.

3. Effets de l'inactivation de *Ncl* chez l'adulte

Le but de cette partie de notre étude est d'inactiver le gène *Ncl* lorsque les souris sont adultes et d'en caractériser les conséquences. Pour cela, la recombinaise CreER^{T2} activable a été utilisée. Chez les souris porteuses du transgène *CreER^{T2}*, l'inactivation du gène *Ncl* est induite par des injections de tamoxifène en *i.p.*, et se produit dans tout l'organisme avec une efficacité variable en fonction des organes et tissus. Il est rappelé que nous utilisons le transgène *CreER^{T2}* à l'état hétérozygote dans des souris par ailleurs sauvages, hétérozygotes *Ncl^{+/-}* ou homozygotes *Ncl^{fl/fl}*.

3.1 Conditions expérimentales de l'expérience pilote

Une étude pilote est réalisée sur quelques animaux afin d'évaluer les effets du tamoxifène, le bruit de fond de recombinaison, les effets de l'activation de la recombinaise CreER^{T2} et vérifier que les conditions expérimentales envisagées permettent une haute efficacité de la délétion de l'exon 3 du gène *Ncl*.

Pour cela, deux groupes sont constitués : un groupe contrôle et un groupe expérimental. Chaque souris a été génotypée avant l'expérience ce qui a permis de constituer des sous-groupes composés d'animaux âgés entre deux et dix mois, de différents génotypes (identifiés par un code couleur) et traités comme le précise le Tableau II ci-dessous. Le protocole d'injection montre un bon compromis entre efficacité et toxicité (Hofker and van Deursen, 2011).

Tableau II - Conditions expérimentales de l'étude pilote pour évaluer l'effet de l'inactivation du gène *Ncl*.

Les traitements sont administrés par injection intrapéritonéale quotidienne pendant cinq jours consécutifs. Chaque génotype à une couleur définie.

Groupe contrôle					
Génotype	Age	Traitement	Sexe	Nombre	Objectif
<i>Ncl^{fl/fl} ; Rosa-CreER^{T2+/-}</i>	94 à 246 j (3 à 8 mois)	Huile	3 F – 2 M	5	Evaluer le bruit de fond de recombinaison du modèle.
<i>Ncl^{+/+} ; Rosa-CreER^{T2+/-}</i>	122 à 349 j (4 à 11 mois)	Tamoxifène	2 F – 2 M	4	Activer la recombinaise Cre par le tamoxifène et évaluer l’effet seul de l’enzyme active sur l’animal dans un contexte sauvage pour <i>Ncl</i> .
<i>Ncl^{fl/fl} ; Rosa-CreER^{T2+/-}</i>	130 à 262 j (4 à 8 mois)	Tamoxifène	2F – 2 M	4	Evaluer la toxicité du tamoxifène sur les animaux ayant les allèles flox et/ou sauvage pour <i>Ncl</i> .
<i>Ncl^{+/fl} ; Rosa-CreER^{T2+/-}</i>	70 à 145 j (2 à 5 mois)	Tamoxifène	3F	3	
Groupe expérimental					
<i>Ncl^{fl/fl} ; Rosa-CreER^{T2+/-}</i>	102 à 307 j (3 à 10 mois)	Tamoxifène	3 F – 5 M	8	Vérifier l’efficacité de la délétion de l’exon 3 du gène <i>Ncl</i> . Observer les conséquences de l’inactivation des 2 copies (KO) du gène <i>Ncl</i>
<i>Ncl^{+/fl} ; Rosa-CreER^{T2+/-}</i>	132 à 306 j (4 à 10 mois)	Tamoxifène	2F – 1M	3	Vérifier l’efficacité de la délétion de l’exon 3 du gène <i>Ncl</i> . Observer les conséquences de l’inactivation (KO) d’une seule copie du gène <i>Ncl</i> .

3.2 La perte totale de *Ncl* entraîne une perte de poids rapide et la mort de l'animal.

Chaque souris est suivie quotidiennement durant l'expérience par une pesée et une observation de l'allure générale et du comportement.

Pour chaque génotype, le poids est mesuré quotidiennement puis exprimé en pourcentage du poids initial à J1. La moyenne des pourcentages, faite sur les individus de même génotype, est présentée dans la Figure 13. Par soucis de lisibilité, seul le groupe expérimental (*Ncl^{fl/fl} CreER^{T2+/-}* et *Ncl^{+/fl} CreER^{T2+/-}*) et le sous-groupe contrôle *Ncl^{+/+} CreER^{T2+/-}* avec tamoxifène sont représentés. Les autres sous-groupes contrôles, qui présentent le même profil que les contrôles *Ncl^{+/+} CreER^{T2+/-}*, sont présentés en Annexe 3.

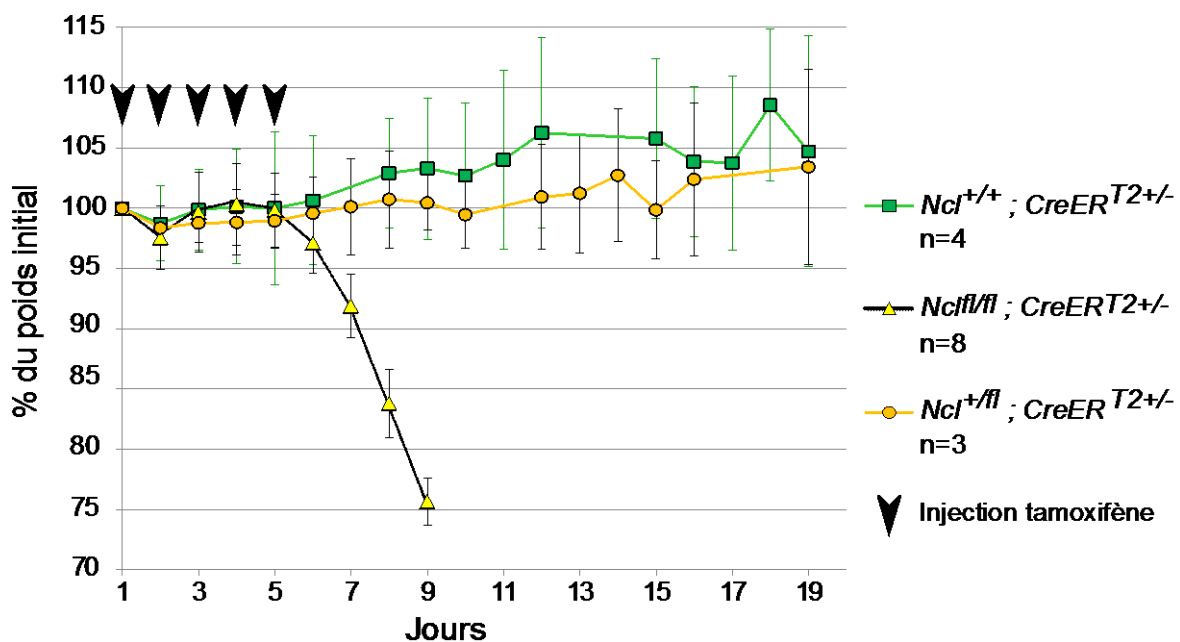


Figure 13 - Courbe de l'évolution du poids des souris de différents génotypes suite au traitement au tamoxifène.
Les courbes représentent une moyenne pour 4, 8 ou 3 animaux +/- écart-type.

Le principal résultat de cette analyse est la rapide perte de poids, après injection de tamoxifène, des souris homozygotes $Ncl^{fl/fl}$ entre J6 et J9 alors que les souris hétérozygotes $Ncl^{+/fl}$ se comportent comme les contrôles sur la même période et au-delà. Outre la perte de poids, les souris homozygotes présentent une prostration et une perte de poils à la manipulation qui ne sont pas observées dans les autres groupes.

La Figure 14 montre, que les souris $Ncl^{fl/fl}$ meurent (7 individus) ou atteignent leur point limite (1 individu), entre 3 et 4 jours (J8-J9) après la dernière injection de tamoxifène alors que les hétérozygotes $Ncl^{+/fl}$ ne présentent pas d'anomalie. Ces résultats montrent que chez l'adulte, la perte d'un seul allèle de Ncl est tolérée, tandis qu'une atteinte homozygote s'avère rapidement mortelle. La survie du groupe contrôle n'est pas impactée par l'administration de tamoxifène ou d'huile, ceci quel que soit le génotype.

La perte des deux allèles de Ncl n'est donc pas tolérée chez l'adulte alors que l'haploinsuffisance n'a pas d'impact majeur. A noter que les souris contrôles $Ncl^{+/+} CreERT2^{+/-}$ se comportent comme les autres contrôles : la présence nucléaire de l'enzyme active est donc bien tolérée.

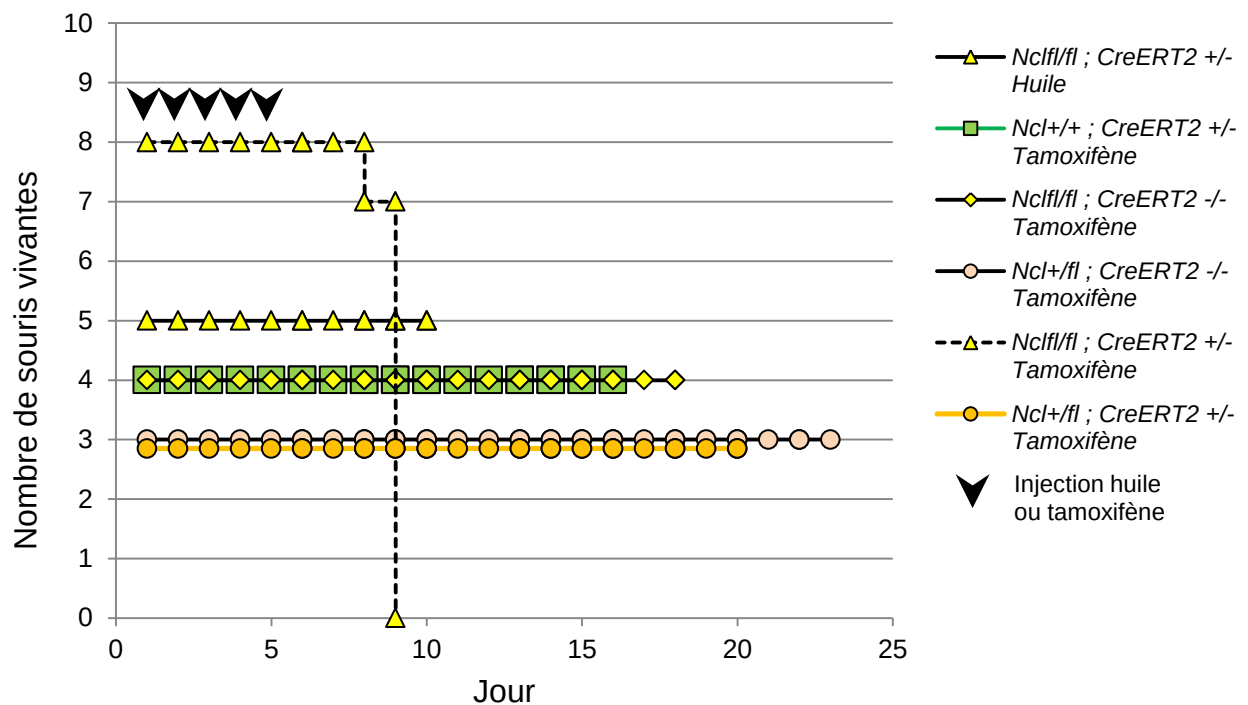


Figure 14 - Courbes de survie du groupe contrôle et expérimental après injection d'huile ou de tamoxifène

3.3 La recombinaise $CreER^{T2}$ activée provoque l'inactivation de Ncl .

Pour s'assurer que l'inactivation de Ncl médiée par $CreER^{T2}$ a été efficace, en particulier chez les souris $Ncl^{+/fl} CreER^{T2+/-}$, le génotypage a été effectué sur divers organes. Les prélèvements ont été réalisés sur les souris $Ncl^{fl/fl} CreER^{T2+/-}$, le jour de leur mort (J8 ou J9) et sur des souris $Ncl^{+/fl} CreER^{T2+/-}$ sacrifiées au même jour. Toujours pour ce sous-groupe $Ncl^{+/fl} CreER^{T2+/-}$, des souris ont été sacrifiées à différents temps (J13, J15, J20 et J22) et génotypées. Cela permet de vérifier que la délétion est toujours présente au cours du temps chez ces souris survivantes dans différents organes. Les données du fournisseur Taconic indiquent que la recombinaison ne touche pas la totalité des cellules (Biosciences, n.d.), ce qui est confirmé par les résultats de génotypage ci-dessous, où l'allèle floxé reste détectable chez tous les individus. Une hypothèse est que les cellules ayant échappées à la recombinaison, sont susceptibles de proliférer plus efficacement que les cellules mutantes et de faire diminuer les proportions de ces dernières, conduisant à une éventuelle perte de l'allèle muté.

3.3.1 Efficacité de la délétion à J9

A partir de tissus congelés, une triple extraction ADN, ARN, protéines est réalisée. Le génotype de quelques organes (ovaire, rate, foie, cerveau, duodénum, muscle) est vérifié pour les souris $Ncl^{fl/fl}$ $CreER^{T2+/-}$ traitées à l'huile et au tamoxifène et pour les souris $Ncl^{+/fl}$ $CreER^{T2+/-}$. Les échantillons sont issus de souris mortes entre J8 et J9.

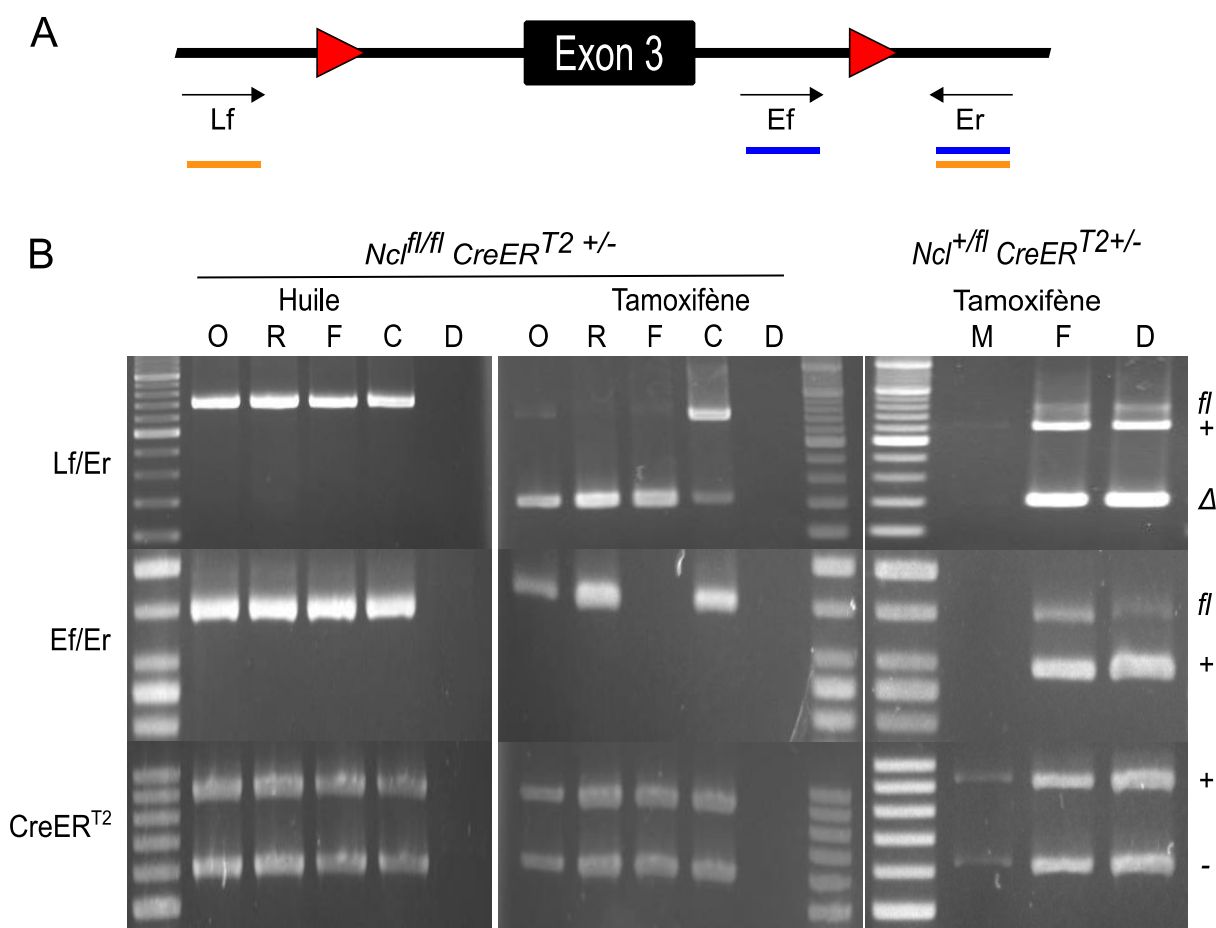


Figure 15 – Génotypage sur des organes de souris hétérozygotes et homozygotes pour *Ncl* après traitement ou non au tamoxifène.

(A) Schéma de positionnement des couples d'amorces utilisés pour déterminer les allèles de *Ncl*. (B) Identification des allèles du gène *Ncl* par PCR avec les couples d'amorces Lf/Er et Ef/Er sur différents organes de souris homozygotes pour *Ncl* traitées à l'huile (colonne de gauche) ou au tamoxifène (colonne du milieu) et de souris hétérozygotes (colonne de droite) traitées au tamoxifène. Le trio d'amorces $CreER^{T2}$ indique la présence (+) du transgène à l'état hétérozygote $CreER^{T2+/-}$. C : cerveau ; D : duodénum ; F : Foie ; M : Muscle ; O : ovaire ; R : Rate.

La Figure 15 montre que la souris traitée avec de l'huile ne présente pas de délétion au locus *Ncl* alors que chez la souris de même génotype traitée au tamoxifène, presque tous les organes testés présentent cette délétion. La délétion est également détectée chez la souris hétérozygote $Ncl^{+/fl}$ à J9. L'analyse du duodénum n'est pas concluante chez les souris homozygotes $Ncl^{fl/fl}$ alors qu'elle l'est pour la souris $Ncl^{+/fl}$. Ceci provient probablement d'un problème ponctuel d'extraction de l'ADN pour le duodénum. L'efficacité de délétion est moindre dans le

cerveau. Ce résultat n'est pas surprenant puisque le fournisseur Taconic mentionne une efficacité de délétion inférieure à 70 % dans cet organe (Biosciences, n.d.). Cette moindre efficacité pourrait être due à une plus faible biodisponibilité du tamoxifène dans le cerveau bien que cette drogue soit connue pour passer la barrière hématoencéphalique (Kimelberg, 2008). Elle pourrait aussi être due à une moindre efficacité de CreERT2 dans les neurones en raison peut-être d'une conformation de la chromatine réfractaire à la recombinaison (Zheng et al., 2000).

Ces résultats de génotypage montrent qu'à J8-J9 le tamoxifène a bien activé la recombinase CreERT2 qui a pu agir sur le génome et exciser l'exon 3 de *Ncl* chez les souris *Ncl^{fl/fl}* et *Ncl^{+fl}*. Ces expériences confirment donc bien que la mort des souris *Ncl^{fl/fl}* est due à la perte des deux allèles et que la perte d'un seul allèle est bien tolérée.

3.3.2 Maintien de la délétion au cours du temps chez les souris *Ncl^{+fl} CreERT2^{+/-}* après injections de tamoxifène

Il s'agit de vérifier que les cellules qui ont échappé à la recombinaison ne remplacent pas, au cours du temps, les cellules mutantes au bénéfice d'un avantage compétitif. Le génotype des hétérozygotes *Ncl^{+fl} CreERT2^{+/-}* mises à mort à différents temps de l'expérience (J9, J13, J15, J20 et J22) a été déterminé.

Comme précédemment, un génotypage est réalisé sur différents tissus : muscle, foie et duodénum. La Figure 16 présente les résultats obtenus. La délétion de *Ncl* est détectable jusqu'à 22 jours après la première injection principalement dans le foie et le duodénum. Comme pour l'expérience précédente, les résultats obtenus avec le muscle ne sont pas convaincants à cause peut-être faible contenu relatif en ADN de ces tissus.

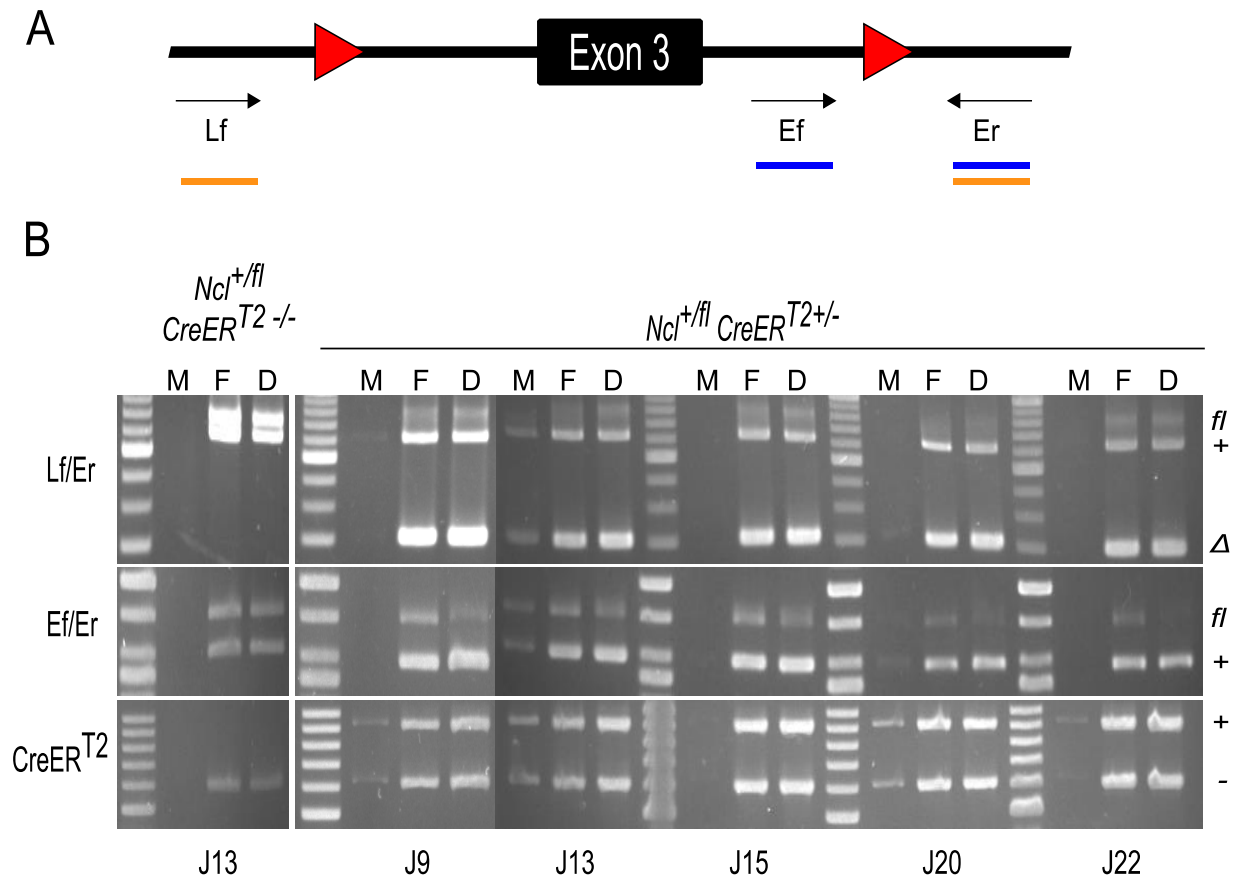


Figure 16 - Génotypage de différents tissus de souris *Ncl*^{+/fl} au cours du temps après injection de tamoxifène

(A) Schéma de positionnement des couples d'amorces utilisés pour déterminer les allèles de *Ncl*. (B) Identification des allèles du gène *Ncl* par PCR avec les couples d'amorces Lf/Er et Ef/Er sur différents organes (D : duodénum ; F : foie ; M : Muscle) de souris *Ncl*^{+/fl} traitées au tamoxifène et mises à mort à différents temps au cours de l'expérience. Le trio d'amorces *CreERT2* indiquent la présence (+) ou l'absence (-) du transgène *RosaCreERT2*. La souris à gauche est *CreERT2*^{-/-} et a reçu le tamoxifène.

L'ensemble de ces résultats montre que l'activation de la recombinase par le tamoxifène est relativement efficace et ubiquitaire car la délétion dans le locus *Ncl* est présente dans la majorité des organes analysés. Elle reste détectable jusqu'à 22 jours après le début de l'expérience chez les hétérozygotes, les cellules qui ont échappé à la recombinaison ne semblent devenir prédominantes.

3.4 La perte totale de *Ncl* entraîne une diminution de la quantité de NCL dans les organes

Le gène *Ncl* ayant subi la délétion de l'exon 3, il est attendu que l'ARNm de *Ncl* soit lui aussi modifié quantitativement et par conséquent que l'expression de la protéine soit également perturbée. Afin de vérifier cette hypothèse, des western blot ont été réalisés sur des lysats

protéiques de quelques organes afin d'évaluer la quantité de NCL présente dans chacun d'eux. La Figure 17 présente le résultat de cette analyse dans le cerveau, la rate et le foie de souris pour les trois génotypes d'intérêt $Ncl^{+/+}$; $Ncl^{+/fl}$ et $Ncl^{fl/fl}$ toutes $CreER^{T2+/-}$ après injections au tamoxifène à J10, J9 et J8 respectivement.

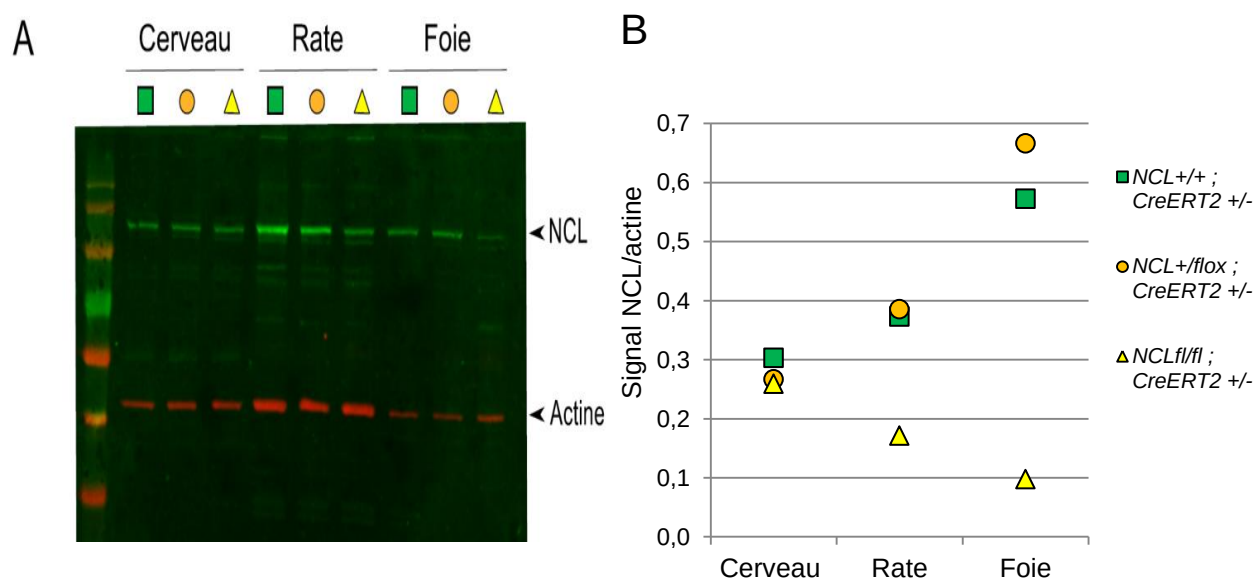


Figure 17 - Evaluation de la quantité de protéine NCL dans plusieurs organes après traitement au tamoxifène (A) et quantification du ratio NCL/actine (B).

(A) Détection par western blot de NCL dans le cerveau, la rate et le foie chez une souris sauvage $Ncl^{+/+}$ $CreER^{T2+/-}$ (carré vert) à J10, hétérozygote $Ncl^{+/fl}$ $CreER^{T2+/-}$ (rond orange) à J9 et $Ncl^{fl/fl}$ $CreER^{T2+/-}$ homozygote (triangle jaune) à J8. (B) Normalisation du signal NCL par le signal actine obtenu dans chaque organe.

L'analyse de la quantité de NCL indique que cette quantité est variable en fonction de l'organe chez la souris contrôle $Ncl^{+/+}$ $CreER^{T2+/-}$. Dans le cerveau, il n'y a pas de variation du niveau de NCL quel que soit le génotype des souris. Ce résultat n'est pas surprenant puisque l'efficacité de délétion est faible dans cet organe. La souris $Ncl^{fl/fl}$ $CreER^{T2+/-}$, quant à elle, présente une forte diminution, d'environ cinq fois, du niveau de NCL dans le foie et une diminution moins drastique dans la rate. La souris hétérozygote $Ncl^{+/fl}$ $CreER^{T2+/-}$ présente un taux de protéine NCL très proches de ceux du contrôle. La variation observée dans le foie est peut-être due à la variabilité individuelle ou technique, une seule souris par génotype ayant été analysée.

La délétion étant détectée chez les souris hétérozygotes $Ncl^{+/fl}$ $CreER^{T2+/-}$ jusqu'à J22, l'analyse de la quantité de NCL dans le foie a été réalisée à différents temps au cours de l'expérience. La Figure 18 présente les résultats obtenus par western blot et les quantifications associées.

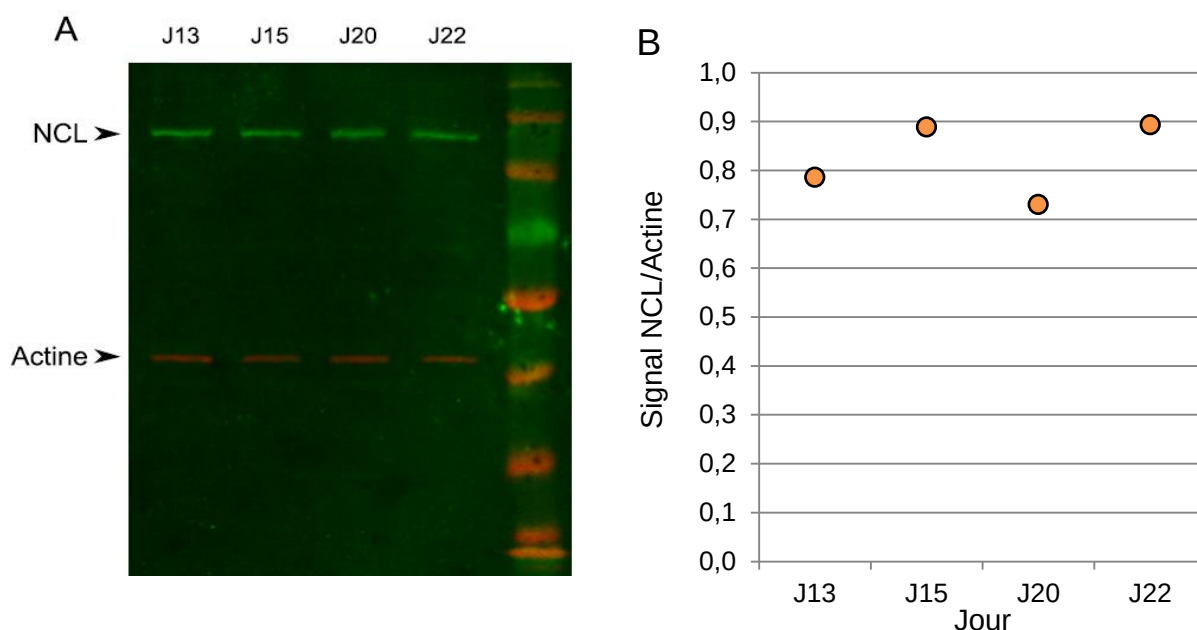


Figure 18 – Evaluation de la quantité de protéine NCL dans le foie après traitement au tamoxifène et au cours du temps chez les souris $Ncl^{+/fl} CreER^{T2+/-}$.

(A) Détection par western blot de NCL dans le foie de souris $Ncl^{+/fl} CreER^{T2+/-}$ au cours du temps. L'actine est utilisée comme contrôle interne (B) Quantification du western blot après normalisation du signal NCL par le signal actine obtenu pour chaque jour étudié.

Les résultats obtenus montrent que les ratios NCL/actine varient peu dans le temps après la fin de l'expérience. Cela signifie que, dans le foie, la quantité de NCL reste stable au cours du temps même si une copie du gène *Ncl* a été inactivée. Une seule souris a été analysée par jour étudié, augmenter le nombre d'individus analysés permettrait de confirmer ou non cette tendance. Il faudra également ajouter des mesures à J0.

L'ensemble de ces résultats montrent que l'inactivation des deux allèles provoque une diminution de la quantité de NCL d'un facteur six dans le foie et d'un facteur deux dans la rate, la perte est plus faible dans le cerveau.

3.5 D'éventuelles variations de cholestérolémie chez les souris mutantes sont masquées par l'effet du tamoxifène.

Une étude sur puce à ADN en cours dans l'équipe montre que, dans des cellules HeLa la diminution de la quantité de NCL induite par RNAi s'accompagne d'une diminution de l'expression de plusieurs gènes de biosynthèse du cholestérol. Afin de vérifier si *in vivo* l'inactivation de *Ncl* a un impact sur la cholestérolémie, le dosage du cholestérol a été réalisé sur du sérum de souris $Ncl^{+/+} CreER^{T2+/-}$ et $Ncl^{fl/fl} CreER^{T2+/-}$ avant (J1) et après injection de

tamoxifène (J8). Il n'a pas été possible de réaliser ce dosage à J5 car la réglementation impose une période de dix jours entre deux prélèvements de sang dans le sinus rétro-orbital.

La Figure 19 présente les concentrations de cholestérol total mesurées à J1 et J8 ainsi que les différences exprimées en pourcentages par rapport à J1.

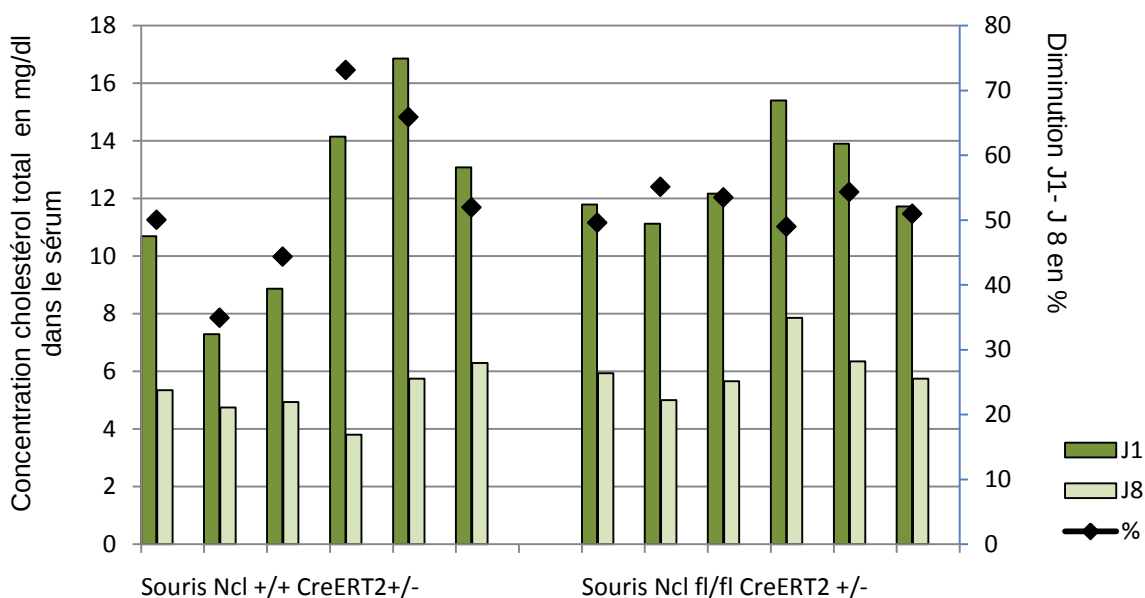


Figure 19 – Concentration du cholestérol total à J1 et J8 chez les souris contrôles et homozygotes, après injection de tamoxifène

Pour chaque souris, le dosage de cholestérol a été réalisé à J1 (histogramme vert foncé) puis à J8 (histogramme vert clair). Les différences de concentration entre J1 et J8 sont exprimées en % (losange noir). Les injections de tamoxifène ont eu lieu de J1 à J5.

La cholestérolémie mesurée huit jours après le début des injections de tamoxifène a baissé pour tous les animaux, y compris chez les animaux contrôles $Ncl^{+/+} CreER^{T2+/-}$. En moyenne, la diminution est identique pour les souris contrôles (53%) et les souris homozygotes (52%). Etant donné que la diminution est présente aussi chez les contrôles, on peut supposer un effet hypocholestérolémiant du tamoxifène lui-même. Cet effet est si puissant qu'il masque l'effet éventuel lié à la nucléoline.

Les expériences présentées jusqu'ici ont mis en évidence que l'inactivation ubiquitaire du gène *Ncl* chez les adultes provoque la mort des souris homozygotes $Ncl^{fl/fl} CreER^{T2+/-}$. Les causes de la mort de ces souris n'ont pas été élucidées. Lors de la nécropsie, aucune anomalie flagrante n'a été détectée. Une étude anatomopathologique systématique est nécessaire. La rapide perte de poids suggère un défaut d'absorption qui incite à analyser notamment les intestins. Les souris hétérozygotes ne semblent pas affectées ce qui suggère une adaptation transcriptionnelle et/ou traductionnelle qui doit être analysée en détail.

4. Effets de l'inactivation de *Ncl* au cours du développement

Les résultats présentés dans la partie précédente ne préjugent pas des effets que la perte d'un ou des deux allèles de *Ncl* pourrait avoir au cours du développement. La littérature suggère que NCL est importante pour l'ensemble des cellules. Nous avons tenté de réaliser la transmission germinale de la délétion pour étudier les animaux qui dès leur conception seraient mutants homo ou hétérozygotes de *Ncl*.

De plus, nous avons choisi de porter notre attention sur le système nerveux central puisque NCL semble y jouer un rôle particulier comme expliqué dans la partie introductive. Pour cela nous avons déclenché l'invalidation de *Ncl* spécifiquement dans le SNC au cours du développement.

L'utilisation des transgènes exprimant *Cre* sous le contrôle d'un promoteur dérivé du gène *Nestin*, permet *a priori* d'atteindre ces deux objectifs, puisqu'ils ont une expression forte dans le cerveau et la lignée germinale.

4.1 Etude de l'inactivation de *Ncl* dans la lignée « NCL Nestin-Cre »

Des souris *Ncl^{fl/fl}* ou *Ncl^{+/fl}* ont été croisées avec des souris *Nestin-Cre^{+/-}*, dans le but d'obtenir des souris mutantes hétérozygotes *Ncl^{+/-Δ}* ; *Nestin-Cre^{+/-}* haploinsuffisantes dans le cerveau. Ces souris seront ensuite croisées entre elles pour obtenir des mutants homozygotes dans le cerveau. Si cette délétion se met en place dans la lignée germinale, cette approche permet d'avoir des KO pour *Ncl* dès la conception à la génération suivante. Nous avons appliqué avec succès cette démarche au laboratoire dans le cadre de l'inactivation du gène *PC4* (Swaminathan et al., 2016).

4.1.1 Croisement pour l'obtention des souris hétérozygotes *Ncl^{+/-fl}* ; *Nestin-Cre^{+/-}*

Le Tableau III présente les résultats du croisement initial fait entre les lignées « NCL flox » et « Nestin-Cre » dans le but d'obtenir des souris porteuses de l'allèle *Ncl^{+/-fl}* et du transgène

Nestin-Cre. Ces souris devraient être porteuses hétérozygotes de la délétion dans le cerveau. Ce tableau ne tient compte que des souriceaux qui ont été identifiés par prélèvement des phalanges entre P8 et P10. Tous les autres, y compris les mort-nés, ne sont pas comptabilisés car non génotypés.

Tableau III - Fréquence des génotypes obtenus lors du croisement $Ncl^{fl/fl} \times Nestin-Cre^{+/-}$.

	Croisement : $NCL^{fl/fl} \times Nestin-Cre^{+/-}$		
	Naissances		
Génotypes	Nombre	%	% théoriques
$Ncl^{+/fl} ; Nestin-Cre^{-/-}$	76	47 %	50 %
$Ncl^{+/fl} ; Nestin-Cre^{+/-}$	2	1 %	50 %
$Ncl^{+/fl/\Delta} ; Nestin-Cre^{+/-}$	85	52 %	
Total	163	100 %	100 %

Comme attendu, les souris sont toutes hétérozygotes pour *Ncl*. La moitié des souris possèdent le transgène *Nestin-Cre* qui se transmet donc selon les proportions mendéliennes.

La grande majorité (98 %) des souris $Ncl^{+/fl} ; Nestin-Cre^{+/-}$ présentent aussi la délétion de l'exon 3 du gène *Ncl* et sont donc des mosaïques possédant trois allèles de *Ncl* : sauvage, floxé et délété ($Ncl^{+/fl/\Delta} Nestin-Cre^{+/-}$). Cet état mosaïque n'est pas associé à une mortalité particulière. La recombinaison est donc active dans les doigts chez presque tous les animaux. Il est probable que les deux animaux $Ncl^{+/fl} ; Nestin-Cre^{+/-}$, qui ne présentent pas la délétion, la présentent dans le cerveau puisque l'expression de *Cre* y est *a priori* plus forte.

L'analyse de ce premier croisement met en évidence qu'en présence du transgène *Nestin-Cre*, il est possible d'obtenir une majorité d'individus mosaïques viables pour lesquels une partie des cellules est hétérozygote $Ncl^{+/fl}$ et l'autre partie est *a priori* hétérozygote $Ncl^{+/fl/\Delta}$ en particulier dans les cellules du SNC.

4.1.2 L'haploinsuffisance de *Ncl* n'est pas viable.

Nous avons ensuite cherché à obtenir la transmission de la délétion vers la descendance *via* la lignée germinale. Pour cela, nous avons croisé des individus mosaïques avec des souris sauvages de même fond génétique. Cela permet aussi d'assainir le fond génétique provenant des cellules ES initialement utilisées pour l'obtention de l'allèle floxé et de prévenir la dérive génétique (Davis et al., 2012).

Le Tableau IV récapitule les naissances obtenues lors de ce croisement. L'Annexe 4 indique les génotypes possibles pour un tel croisement.

Tableau IV - Répartition des génotypes obtenus lors de croisements $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$ x $Ncl^{+/+}$.

Sur l'ensemble des naissances obtenues, aucune ne présente la délétion hormis les souris mosaïques $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$.

	Croisement : $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$ x $Ncl^{+/+}$	
	Naissances	
Génotypes	Nombre	%
$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	28	22 %
$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	23	18 %
$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	31	25 %
$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	4	3 %
$Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	39	31 %
$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	0	0 %
$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	0	0 %
Total	125	100 %

L'analyse de ces résultats montre que les souris $Ncl^{+/Δ}$ avec ou sans le transgène *Nestin-Cre* ne sont jamais observées. De plus, les proportions des génotypes obtenus sont plus proches des proportions théoriques lorsque $Ncl^Δ$ n'est pas présent dans la lignée germinale. Cela suggère que les gamètes $Ncl^Δ$; $Nestin-Cre^+$ et $Ncl^Δ$; $Nestin-Cre^-$ ne seraient pas produits. Une hypothèse alternative est que la présence de la délétion à l'état hétérozygote tôt dans le développement n'est pas viable. Toutefois, ce croisement a été réalisé et surveillé par les zootechniciens dans la zone d'élevage du PBES ce qui n'est pas propice à la détection d'éventuels souriceaux mort-nés et pourrait expliquer l'absence des génotypes manquants.

La perte précoce d'un allèle ou son absence initiale n'est donc pas viable. Seul un état de mosaïcisme est toléré.

4.1.3 L'haploinsuffisance de *Ncl* est compatible avec le développement *in utero*.

Dans le croisement précédent, seules les souris mutantes $Ncl^{+/Δ}$ pouvaient être potentiellement générées. Afin de tenter d'obtenir des mutants $Ncl^{fl/Δ}$ ou $Ncl^{Δ/Δ}$, des croisements avec des souris $Ncl^{fl/fl}$ ont aussi été réalisés. Toutefois, ce type de croisement ne permet pas d'avoir des contrôles $Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre^{+/-}$ dans les portées. Ce croisement a été réalisé en zone

expérimentale pour permettre une surveillance accrue des naissances et du devenir des portées.

Le Tableau V donne les génotypes obtenus et le pourcentage que chacun représente sur le nombre de naissances. L'Annexe 5 indique les génotypes potentiels des souris issues de ce type de croisement.

Tableau V – Répartition des génotypes obtenus lors de croisements $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$ x $Ncl^{fl/fl}$.
Les astérisques indiquent que tous les souriceaux sont mort-nés.

Croisement : $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$ x $Ncl^{fl/fl}$		
Naissances		
Génotypes	Nombre	%
$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	13	15 %
$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	1	1,2 %
$Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	30	36 %
$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	14	17 %
$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	1*	1,2 %
$Ncl^{fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	1*	1,2 %
$Ncl^{fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	24*	29 %
	84	100 %

Plusieurs constats peuvent être faits à partir de ces résultats. Les souris $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$ représentent un tiers de l'effectif total, ce qui confirme que la délétion à l'état mosaïque n'a pas d'impact majeur sur la viabilité.

De plus, les trois derniers groupes interpellent par leur génotype et par le fait qu'ils sont constitués d'individus mort-nés. Un souriceau mort-né de génotype $Ncl^{fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{-/-}$ a été identifié : il possède la délétion sans avoir le transgène *Nestin-Cre*. Cela signifie soit que la délétion est transmise germinalement par le parent mosaïque, soit qu'il s'agit d'un effet maternel où il y aurait transmission cytoplasmique de la protéine CRE sans transmission du gène *Cre*. Dans ce dernier cas, le stock maternel de recombinaison serait suffisant pour une délétion précoce de *Ncl*. Toutefois, pour ce souriceau c'est le père qui était de génotype mosaïque. Il est donc peu probable qu'il y ait eu transmission cytoplasmique de la protéine CRE mais plutôt transmission germinale de la délétion. Quel que soit le mode de transmission, ce génotype rare nous apprend qu'il semble possible d'avoir un développement jusqu'à la naissance en présence d'un unique allèle de *Ncl*.

Un tiers des naissances est constitué de souriceaux mort-nés de génotype $Ncl^{fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$. Ces souriceaux sont facilement identifiables car ils présentent tous une tête rouge à la naissance. Comme expliqué plus tard, ils sont anencéphaliques et le volume crânien est occupé par un liquide rouge clair qui semble être un mélange de sang et de liquide céphalorachidien. La difficulté avec ce groupe est qu'il est impossible de savoir si les souriceaux ont reçu la délétion par transmission germinale ou si la délétion se met en place au cours du développement. De même, on ne peut pas connaître le degré de mosaïcisme de ces animaux car les PCR de génotypage ne permettent pas de lever l'ambiguïté. Ces animaux sont notés $Ncl^{fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$ tout en ayant à l'esprit que ce sont des souris mosaïques sauf dans le SNC où ils sont KO pour Ncl , ce qui expliquerait l'absence de cerveau. Le génotype cérébral ne peut pas être vérifié puisqu'il n'y a pas de tissus à prélever.

Un souriceau mort-né a pour génotype $Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{+/-}$. Il serait attendu de détecter la délétion car le transgène $Nestin-Cre$ et les séquences $loxP$ sont présents. Or ce n'est pas le cas. De plus son développement jusqu'à la naissance semble normal, y compris pour le SNC. L'absence de la délétion ainsi que la mort de ce souriceau unique restent inexplicables.

En conclusion, ce nouveau croisement ouvre la possibilité d'une transmission germinale à faible fréquence et que l'inactivation d'un allèle de Ncl permet le développement *in utero* mais n'est pas viable. Il faut la présence de deux allèles Ncl fonctionnels (sauvage et/ou flox) pour que les animaux puissent vivre.

4.1.4 Le KO homozygote pour Ncl est incompatible avec le développement *in utero*

Afin d'augmenter la probabilité d'obtenir des mutants $Ncl^{\Delta/\Delta}$ tout en ayant les contrôles adaptés, et d'avoir une transmission germinale par rapport aux croisements précédents, des souris mosaïques $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$ ont été croisées entre elles. L'avantage de ce croisement est que tous les types de mutants peuvent potentiellement être présents mais un des inconvénients est l'impossibilité, avec notre approche de génotypage, de définir si le transgène $Nestin-Cre$ est à l'état hétérozygote $+/-$ ou homozygote $+/+$. Face à cette ambiguïté, il sera donc noté $Nestin-Cre^{+}$ pour signaler la présence du transgène.

Le Tableau VI résume le nombre de naissances par génotypes ainsi que les proportions que cela représente tandis que l'Annexe 6 indique les génotypes potentiels en fonction des gamètes produits.

Tableau VI - Répartition des génotypes obtenus lors de croisements $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$ x $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$.
Les astérisques indiquent que tous les souriceaux sont mort-nés.

Croisement : $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$ x $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$		
Naissances		
Génotypes	Nombre	%
$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	4	3%
$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre^{+}$	17	13%
$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	13	10%
$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{+}$	2	2%
$Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+}$	61	47%
$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	0	0%
$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{+}$	1*	0,7%
$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	7	5%
$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{+}$	0	0%
$Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	0	0%
$Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{+}$	25*	19%
$Ncl^{Δ/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	0	0%
$Ncl^{Δ/Δ}$; $Nestin-Cre^{+}$	0	0%
	130	100%

A partir de ce tableau, plusieurs remarques peuvent être faites. Toutes les souris viables ont soit deux allèles fonctionnels, soit possèdent la délétion seulement à l'état mosaïque. Cela confirme l'intolérance de l'haploinsuffisance de *Ncl*. Les souris de génotype $Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/-}$ sont présentes comme dans le croisement précédent. De plus, aucune souris $Ncl^{Δ/Δ}$ été observée à la naissance, y compris chez les mort-nés, ce qui montre que l'absence des deux allèles provoque un arrêt du développement *in utero*. Aucun souriceau $Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$ et $Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$ n'ont été détectés, confirmant que la transmission de $Ncl^{Δ}$ est soit très rare, soit incompatible avec le développement *in utero*. Les souris de génotype $Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{+}$ ne sont pas présentes car leur génotype devient probablement $Ncl^{Δ/Δ}$; $Nestin-Cre^{+}$ ou $Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{+}$. Enfin un souriceau mort-né de génotype $Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{+}$ est détecté. Il n'est pas possible de déterminer si la délétion provient d'une transmission germinale.

Les résultats de ce croisement confirment que le KO homozygote pour *Ncl* est incompatible avec le développement *in utero*. Ceci n'est guère surprenant compte tenu du caractère essentiel de *Ncl* (voir introduction) et cela est aussi mis en évidence avec les souris anencéphaliques.

4.1.5 L'inactivation de *Ncl* provoque des anomalies comportementales et cérébrales.

La protéine NCL était connue pour être requise pour des cellules en culture et nous avons retrouvé ce caractère vital au cours des croisements. De plus, des phénotypes inattendus ont été observés en particulier chez les animaux mosaïques *Ncl*^{+/*fl*/Δ}; *Nestin-Cre*^{+/-} adultes et les souriceaux mort-nés.

*4.1.5.1 L'haploinsuffisance de *Ncl* entraîne un comportement anormal*

Parmi les animaux ayant la délétion pour *Ncl*, seules les souris mosaïques *Ncl*^{+/*fl*/Δ}; *Nestin-Cre*^{+/+ ou +/-} sont viables. Vers 7-8 mois, elles commencent à trembler et présentent une anomalie dans leurs déplacements : elles titubent, leur train arrière s'affaisse de manière plus ou moins brusque lors de leur marche comme si elles avaient une perte d'équilibre ou une faiblesse musculaire. Leur queue est positionnée à la verticale et leurs pattes arrière semblent plus écartées que celles des souris contrôles. Elles paraissent moins actives dans leur cage et restent principalement dans les coins sans beaucoup bouger. Certaines présentent parfois des comportements de grande excitation, en particulier un comportement de heurt de la grille des cages par des sauts répétés.

*4.1.5.2 La viabilité requiert la présence des deux allèles sauvages de *Ncl*.*

Lors du suivi des naissances pour les croisements de souris *Ncl*^{+/*fl*/Δ}; *Nestin-Cre*^{+/-} entre elles ou avec des souris *Ncl*^{*fl/fl*}, des mort-nés ont été trouvés dans les portées. C'est un phénomène connu chez les souris et cela arrive régulièrement avec des proportions variables selon le fond génétique. Le Tableau VII est une synthèse des naissances, pour les croisements cités

précédemment, en incluant les morts nés identifiés. Les observations ont mis en évidence trois ensembles de génotypes.

Tableau VII – Synthèse des naissances de plusieurs croisements incluant les mort-nés pour chaque génotype.

Croisements utilisés : $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$ x $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$ et $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$ x $Ncl^{fl/fl}$. Les génotypes sont regroupés en fonction de leur viabilité.

	Naissances		
Génotypes observables à l'âge adulte	Nombre total	Dont mort-nés	% des mort-nés par génotype
$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	4	1	25%
$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre^{+/+}$ ou $+/-$	17	6	35%
$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	26	4	15%
$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{+/+}$ ou $+/-$	3	2	67%
$Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/+}$ ou $+/-$	91	19	21%
$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	21	4	19%
Total génotypes viables	162	36	22%

	Naissances		
Génotypes restreint des animaux mort-nés	Nombre total	Dont mort-nés	% des mort-nés par génotype
$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{+}$	1	1	100%
$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	1	1	100%
$Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	1	1	100%
$Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{+}$	49	49	100%
Total génotypes non viables	52	52	100%

Génotypes non observés
$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$
$Ncl^{Δ/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$
$Ncl^{Δ/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/+}$ ou $+/-$

Un premier groupe de souris a des génotypes compatibles avec le développement jusqu'à l'âge adulte même si quelques mort-nés sont présents dans chaque génotype.

Le deuxième groupe rassemble les génotypes qui ne sont observés que chez les souriceaux mort-nés. Tous se développent *in utero* avec un corps normal mais avec des phénotypes cérébraux différents selon les génotypes, ce point sera évoqué ci-après. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour déterminer à quel moment (au cours du développement ou à la naissance) ces souris meurent. Comme il n'y a qu'une seule souris concernée pour chacun des génotypes $Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{+}$, $Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{+}$ et $Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$, il est difficile de conclure.

Enfin le troisième ensemble contient les génotypes qui n'ont jamais été observés dans les portées. Il s'agit des souris KO pour *Ncl* et des souris hétérozygote (+/ Δ). Comme un mutant *Ncl^{fl/ Δ}* ; *Nestin-Cre^{-/-}* a été détecté, il est possible que le nombre de naissance n'était pas suffisant pour obtenir le mutant *Ncl^{+/ Δ}* ; *Nestin-Cre^{-/-}*.

4.1.5.3 *Ncl* à l'état hétérozygote est nécessaire au développement du système nerveux central.

Parmi les souris obtenues, deux groupes présentent des anomalies cérébrales plus ou moins sévères.

Les souris mosaïques *Ncl^{+/^{fl/ Δ}}* ; *Nestin-Cre^{+/-}* adultes ayant un comportement anormal, la question s'est posée de vérifier que le phénotype observé est dû à un problème nerveux comme attendu puisque *Cre* s'exprime principalement dans le système nerveux, ou si au contraire, ce phénotype était lié à un défaut musculaire, *Cre* s'exprimant aussi dans ce tissu. Lors de prélèvements d'organes dont le cerveau, nous avons pu constater que le cervelet de la souris mosaïque est plus petit que celui des souris contrôles. Ces anomalies sont retrouvées avec le transgène *Nestin-Cre* (FT) et seront détaillées dans la partie 4.2.

Parmi les souris mort-nées, les souris *Ncl^{fl/ Δ}* ; *Nestin-Cre⁺* présentent macroscopiquement une tête rouge œdématiée. A la dissection, la boîte crânienne est très fine et contient ce qui peut être un mélange de sang et de liquide céphalo-rachidien. Chez le mort-né de génotype contrôle *Ncl^{+/+}* ; *Nestin-Cre^{+/-}* le cerveau est visible et apparemment bien formé comme le montre la Figure 20. Les souris *Ncl^{fl/ Δ}* ; *Nestin-Cre^{+/+ ou +/-}* ont donc un développement du cerveau très limité voire inexistant.

Contrairement aux souriceaux mort-nés *Ncl^{fl/ Δ}* ; *Nestin-Cre⁺* qui sont des KO complets pour *Ncl* dans le cerveau, les souriceaux *Ncl^{+/ Δ}* ; *Nestin-Cre^{+/+ ou +/-}* et *Ncl^{fl/ Δ}* ; *Nestin-Cre^{-/-}*, également mort-nés, ne sont pas anencéphaliques. Un allèle sauvage est donc suffisant pour un développement du cerveau. Ce développement n'est sûrement pas normal étant donné que l'haploinsuffisance vue chez les souris mosaïques *Ncl^{+/^{fl/ Δ}}* ; *Nestin-Cre^{+/-}* entraîne des anomalies. Une étude histologique permettrait de vérifier cette hypothèse.

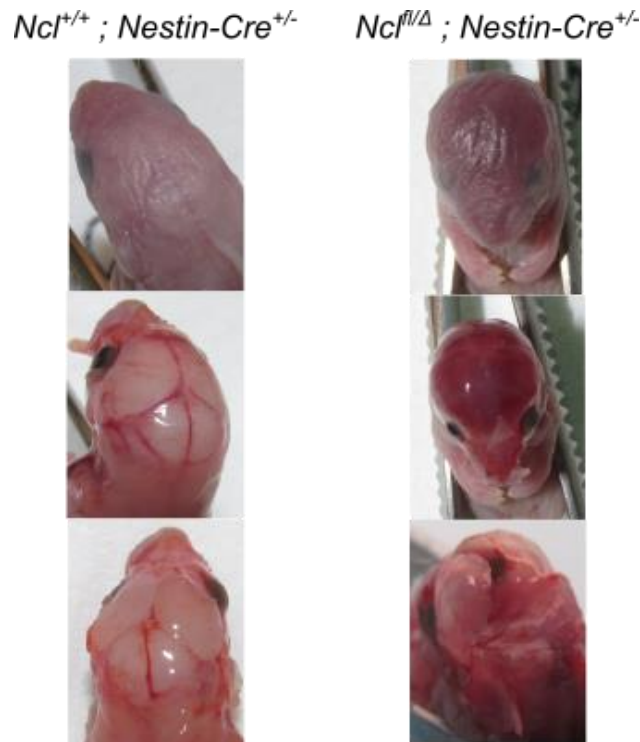


Figure 20 – Morphologie de la tête des mort-nés $Ncl^{+/+}; Nestin-Cre^{+/-}$ et $Ncl^{fl/\Delta}; Nestin-Cre^{+/-}$.

Les souris contrôles (gauche) possèdent un cerveau dans leur boîte crânienne tandis que les souris $Ncl^{fl/\Delta}$ (droite) ont un développement cérébral très restreint.

En résumé, la présence de la délétion n'est tolérée qu'à l'état mosaïque chez l'adulte, l'haploinsuffisance stricte conduisant à des souriceaux mort-nés. La perte d'un allèle dans le cerveau, au cours du développement, entraîne des anomalies de structures et de fonctions.

4.2 Etude de l'inactivation de Ncl dans la lignée « Ncl Nestin-Cre (FT) »

En cours de projet, voyant que la transmission germinale de Ncl^{Δ} est faible et qu'un phénotype cérébral a été détecté, des expériences avec des souris exprimant la recombinaison Cre sous le contrôle du promoteur *Nestin* (FT) sont initiées en parallèle. En effet, non seulement le transgène *Nestin-Cre* (FT) cible plus spécifiquement le cerveau mais il semble aussi faciliter la transmission d'un gène muté dans la lignée germinale. Cela a été effectivement observé dans notre laboratoire pour un projet similaire à celui-ci.

4.2.1 L'inactivation de *Ncl* par l'un ou l'autre des transgènes *Nestin-Cre* a des conséquences similaires.

La stratégie de croisements est identique à celle décrite dans la partie précédente.

Un premier croisement $Ncl^{fl/fl} \times Nestin-Cre (FT)^{+/-}$ a donné les souris mosaïques $Ncl^{+/fl/\Delta}; Nestin-Cre (FT)^{+/-}$. Les résultats sont donnés en Annexe 7. Le phénotype de ces souris est semblable à celui obtenu avec le transgène *Nestin-Cre* (tremblements, perte d'équilibre, etc.). La seule différence est l'âge auquel il apparaît. En effet, les problèmes de déplacement sont visibles dès onze jours après la naissance avec des tremblements plus ou moins forts selon les individus. Les souris se développent jusqu'à l'âge adulte et sont alors utilisées pour les croisements suivants : soit avec des souris $Ncl^{+/fl}$, soit entre elles. Afin de ne pas alourdir la lecture des résultats les Annexe 8 et Annexe 9 présentent respectivement les fréquences théoriques et les résultats obtenus pour chaque génotype lors du croisement $Ncl^{+/fl/\Delta}; Nestin-Cre (FT)^{+/-} \times Ncl^{+/fl}$. Les Annexe 6 et Annexe 10 concernent les croisements $Ncl^{+/fl/\Delta}; Nestin-Cre (FT)^{+/-} \times Ncl^{+/fl/\Delta}; Nestin-Cre (FT)^{+/-}$.

Comme observé avec le transgène *Nestin-Cre*, les souriceaux portant la délétion dans le gène *Ncl* sont tous mort-nés. Ainsi, pour le croisement $Ncl^{+/fl/\Delta}; Nestin-Cre (FT)^{+/-} \times Ncl^{+/fl}$, le Tableau VIII récapitule le nombre de naissances recensées avec le décompte des mort-nés dans chacun des génotypes mais aussi les fréquences des mort-nés calculées sur le nombre total de naissance et sur le nombre de naissances pour chaque génotype. Pour l'ensemble des croisements effectués, aucune différence qualitative dans les proportions des différents génotypes et la pénétrance des phénotypes n'est observée en fonction du sexe du parent qui amène le transgène *Cre*.

Tableau VIII - Répartition des génotypes et nombre de mort-nés obtenus lors de croisements $Ncl^{+/fl/\Delta}; Nestin-Cre(FT)^{+/-} \times Ncl^{+/fl}$

Génotypes	Croisement $Ncl^{+/fl/\Delta}; Nestin-Cre(FT)^{+/-} \times Ncl^{+/fl}$			
	Nombre de naissances		% mort-nés par rapport au nombre total de naissances	% mort-nés pour chaque génotype
	Total	dont mort-nés		
$Ncl^{+/+}; Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	29	2	1 %	7 %
$Ncl^{+/+}; Nestin-Cre(FT)^{+/-}$	28	1	< 1 %	4 %
$Ncl^{+/fl}; Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	54	0	0 %	0 %
$Ncl^{+/fl}; Nestin-Cre(FT)^{+/-}$	2	0	0 %	0 %
$Ncl^{+/fl/\Delta}; Nestin-Cre(FT)^{+/-}$	55	1	< 1 %	2 %
$Ncl^{+/ \Delta}; Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	3	3	1 %	100 %
$Ncl^{+/ \Delta}; Nestin-Cre(FT)^{+/-}$	6	6	3 %	100 %
$Ncl^{fl/fl}; Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	23	0	0 %	0 %
$Ncl^{fl/fl}; Nestin-Cre(FT)^{+/-}$	0	0	0 %	0 %
$Ncl^{fl/\Delta}; Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	2	2	1 %	100 %
$Ncl^{fl/\Delta}; Nestin-Cre(FT)^{+/-}$	11	11	5 %	100 %
	213	26	12 %	

Ces résultats indiquent que tous les génotypes sont présents dans les naissances hormis le génotype $Ncl^{fl/fl}; Nestin-Cre(FT)^{+/-}$. Ce génotype peut être converti en $Ncl^{fl/\Delta}$ ou en $Ncl^{\Delta/\Delta}$ et ces génotypes sont certainement comptabilisés dans ces catégories.

Il est à noter qu'un nouveau génotype jusqu'à présent non-observé est détecté : $Ncl^{+/ \Delta}; Nestin-Cre(FT)^{-/-}$. Comme dans le cas du mutant $Ncl^{fl/\Delta}; Nestin-Cre(FT)^{-/-}$, ces souris sont très probablement issues d'une transmission de Ncl^{Δ} par la lignée germinale. En effet, le transgène *Nestin-Cre (FT)* est absent, il n'y a pas de recombinaison possible. Le gène délété provient donc des gamètes d'un des parents. Ces mutants hétérozygotes se développent *in utero* mais sont mort-nés.

De plus, les souris $Ncl^{+/ \Delta}; Nestin-Cre(FT)^{+/-}$ sont plus nombreuses qu'avec le transgène *Nestin-Cre* et sont elles aussi mort-nées, ce qui laisse à penser que les phénotypes sont similaires même si l'on ne peut pas définir si la délétion est transmise par la lignée germinale. Les mutants mosaïques $Ncl^{fl/\Delta}; Nestin-Cre(FT)^{+/-}$ présentent les mêmes phénotypes que ceux obtenus avec le transgène *Nestin-Cre*.

Les résultats du croisement $Ncl^{+/f/\Delta}; Nestin-Cre (FT)^{+/-}$ x $Ncl^{+/f/\Delta}; Nestin-Cre (FT)^{+/-}$ sont présentés en Annexe 11. Malgré le peu de souris obtenues dans ce croisement et en plus des souris mosaïques $Ncl^{+/f/\Delta}; Nestin-Cre (FT)^{+/-}$, quatre souris portent la délétion hétérozygote dans le gène *Ncl* et toutes sont mort-nées. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus dans les précédents croisements.

Un de nos objectifs était d'obtenir une transmission germinale de la délétion, en utilisant les transgènes *Nestin-Cre*. Le transgène *Nestin-Cre (FT)* semble plus efficace pour cette transmission germinale puisque toutes les deux génotypes KO hétérozygotes possibles ($Ncl^{+/Δ}$ et $Ncl^{f/Δ}; Nestin-Cre (FT)^{-/-}$) pour *Ncl* ont été identifiées. Les résultats obtenus avec les deux transgènes sont similaires, notamment dans le fait qu'aucune souris KO $Ncl^{Δ/Δ}$ n'a été obtenue confirmant la nécessité de *Ncl* pour le développement de l'embryon.

4.2.2 Effets de l'inactivation de *Ncl* sur les paramètres biologiques des souris mosaïques adultes

Parmi les souris qui portent la délétion de *Ncl*, seules les souris mosaïques $Ncl^{+/f/\Delta}; Nestin-Cre (FT)^{+/-}$ atteignent l'âge adulte. Elles présentent des défauts moteurs et un cervelet anormalement petit. Dans le but de caractériser plus précisément ce phénotype, elles ont été étudiées sous divers aspects biologiques et biochimiques.

4.2.2.1 Les souris mosaïques ont un poids comparables aux souris contrôles.

Un groupe de souris mutantes et un groupe souris contrôles $Ncl^{+/+}; Nestin-Cre(FT)^{+/-}$ ont été constitués. Chaque groupe est composé de quinze mâles âgés de 90 à 97 jours. La Figure 21 montre que les poids des souris mutantes et contrôles sont comparables. Le groupe des mutants présente une plus grande dispersion des mesures. Cette dispersion est peut-être due au fait que ces animaux sont des chimères, ils ne sont donc pas strictement identiques.

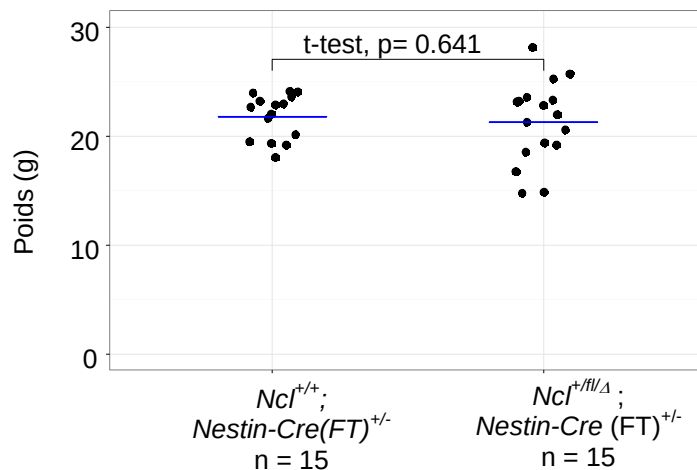


Figure 21 – Comparaison des poids des souris mâles contrôles et mutantes à l'âge adulte.

Deux groupes de 15 souris mâles sont pesés à l'âge adulte (de 90 à 97 jours). La barre bleue indique la moyenne de chaque groupe. L'étalement des mesures selon l'axe des abscisses est aléatoire pour bien distinguer les points des données. Un t-test a été réalisé.

4.2.2.2 La perte d'un allèle de *Ncl* provoque une hypoplasie du cervelet

Les cerveaux de mutants et de contrôles de la même portée ont été prélevés. Dès la dissection, il a été constaté que le cervelet des mutants est moins développé que celui des contrôles (Figure 22A). Les coupes sagittales de cerveaux (Figure 22C, D, E et F) ont été colorées au luxol bleu rapide (colorant de la gaine de myéline) et au rouge neutre (colorant des noyaux). La surface du cervelet (Figure 22B) a été quantifiée et a confirmé ce phénotype. Non seulement l'hypoplasie du cervelet est claire, mais le nombre de lobes est inférieur.

La perte d'un allèle de *Ncl* est associée à une anomalie de développement du cervelet. Ce dernier est un centre majeur de la coordination motrice dans le SNC : cette hypoplasie explique le comportement observé.

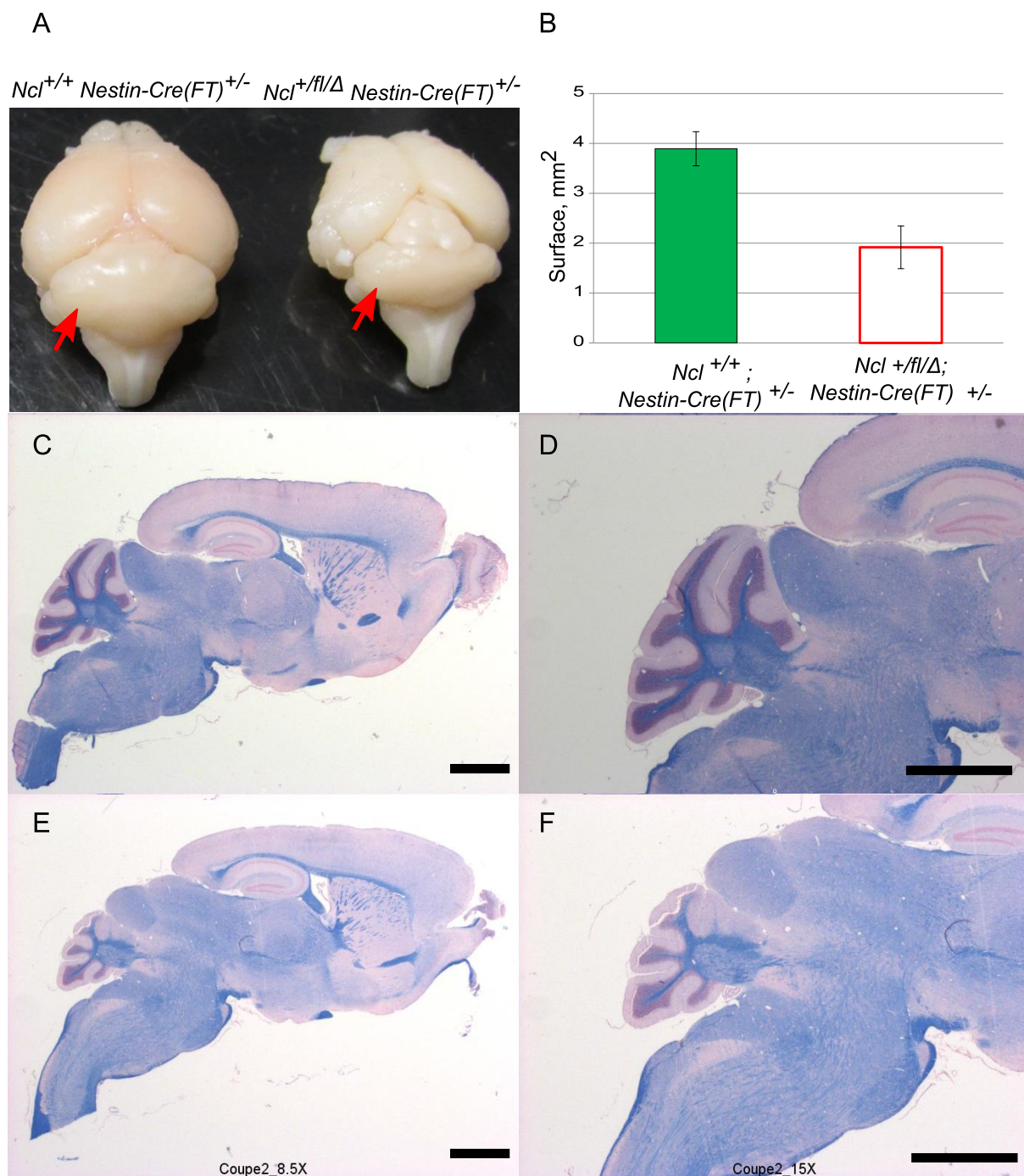


Figure 22 – Comparaison des cervelets des souris contrôle versus mutant.

(A) Vue dorsale des cerveaux disséqués. Les cervelets (flèche) sont différents macroscopiquement. (B) Quantification des surfaces des cervelets de trois souris contrôles (vert) et trois souris mutantes (rouge et blanc). Moyenne +/- écart-type. (C-D) Souris contrôle (E-F) Souris mosaïque (C-E) Coupes sagittales de cerveaux colorés au luxol bleu rapide et rouge nucléaire. Barre = 2 mm (D-F) Zoom sur le cervelet. Barre = 2 mm

4.2.2.3 L'haploinsuffisance de *Ncl* dans le cerveau provoque une diminution du taux de NCL.

Une analyse de la quantité de NCL dans le cerveau et le cervelet a été réalisée par western blot (Figure 23). La tubuline est utilisée comme contrôle interne de charge afin de normaliser

le signal NCL. Une diminution du taux de NCL, dans le cerveau et le cervelet, est constatée chez les souris mutantes par rapport aux souris contrôles.

Ce résultat signifie que l'inactivation de *Ncl* dans le SNC provoque une diminution d'environ 50 % de la quantité de NCL. Ce résultat n'est pas surprenant puisque les cellules du SNC sont majoritairement *Ncl*^{+/-}; *Nestin-Cre* (FT)^{+/-}, il n'y a pas de phénomène de compensation par l'allèle sauvage.

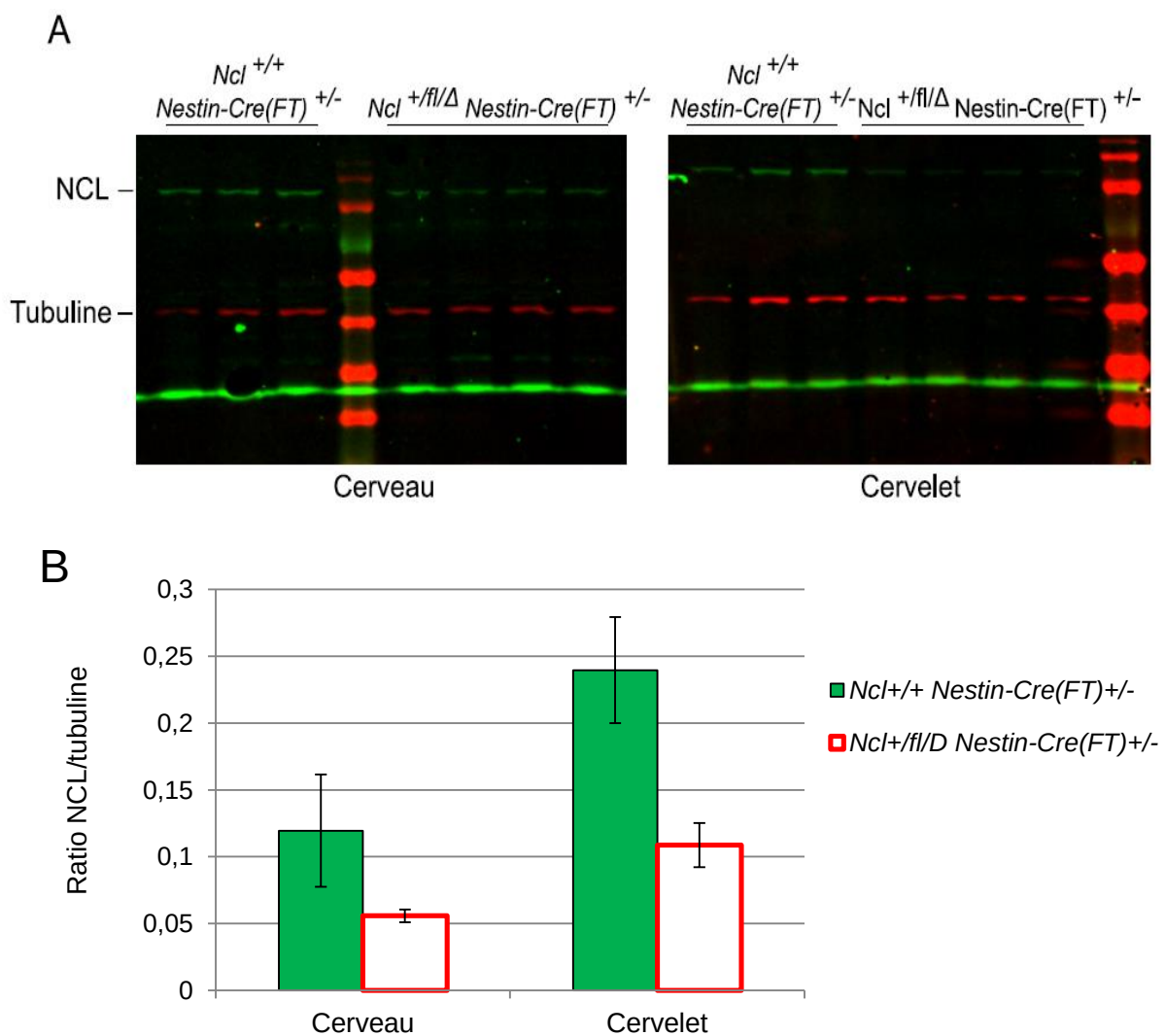


Figure 23 – Evaluation de la quantité de Ncl sur le cerveau et le cervelet de trois souris contrôles *Ncl*^{+/+}; *Nestin-Cre*(FT)^{+/-} (vert) et quatre souris mosaïques *Ncl*^{+/fl/D}; *Nestin-Cre*(FT)^{+/-} (rouge et blanc).

(A) Détection de Ncl par western blot dans le cerveau (gauche) et dans le cervelet (droite). (B) Quantification du ratio NCL/tubuline obtenu dans chaque tissu. Le signal Ncl est présenté comme la moyenne de 3 ou 4 répliquats biologiques +/- écart-type.

4.2.2.4 La perte d'un allèle de *Ncl* n'induit pas de défauts aux jonctions neuromusculaires.

Les souris mosaïques mutantes présentent des défauts d'équilibre et de motricité probablement dus aux défauts constatés dans le système nerveux central. Pour s'assurer que les jonctions neuromusculaires ne soient pas atteintes, une étude de leur structure par immunofluorescence a été effectuée sur le *tibialis anterior* situé sur la patte arrière.

La bungarotoxine est une protéine neurotoxique qui se lie de manière irréversible sur les récepteurs à l'acétylcholine (AChR). Elle est ici utilisée, couplée à un fluorochrome, pour analyser la distribution des récepteurs à l'acétylcholine. Le paramètre mesuré est la surface du signal produit par la bungarotoxine. La coloration simultanée de l'ADN par le DAPI permet de plus la visualisation et le comptage des noyaux cellulaires des muscles situés sous la jonction. Ces deux paramètres, surface de récepteurs et nombre de noyaux, diminuent lorsque les jonctions neuromusculaires perdent leur fonctionnalité. La Figure 24 montre qu'il n'y a pas de différence entre les souris contrôles et les souris mutantes mosaïques, ni dans la surface que recouvre les AChR, ni dans le nombre de noyaux par jonctions neuromusculaires.

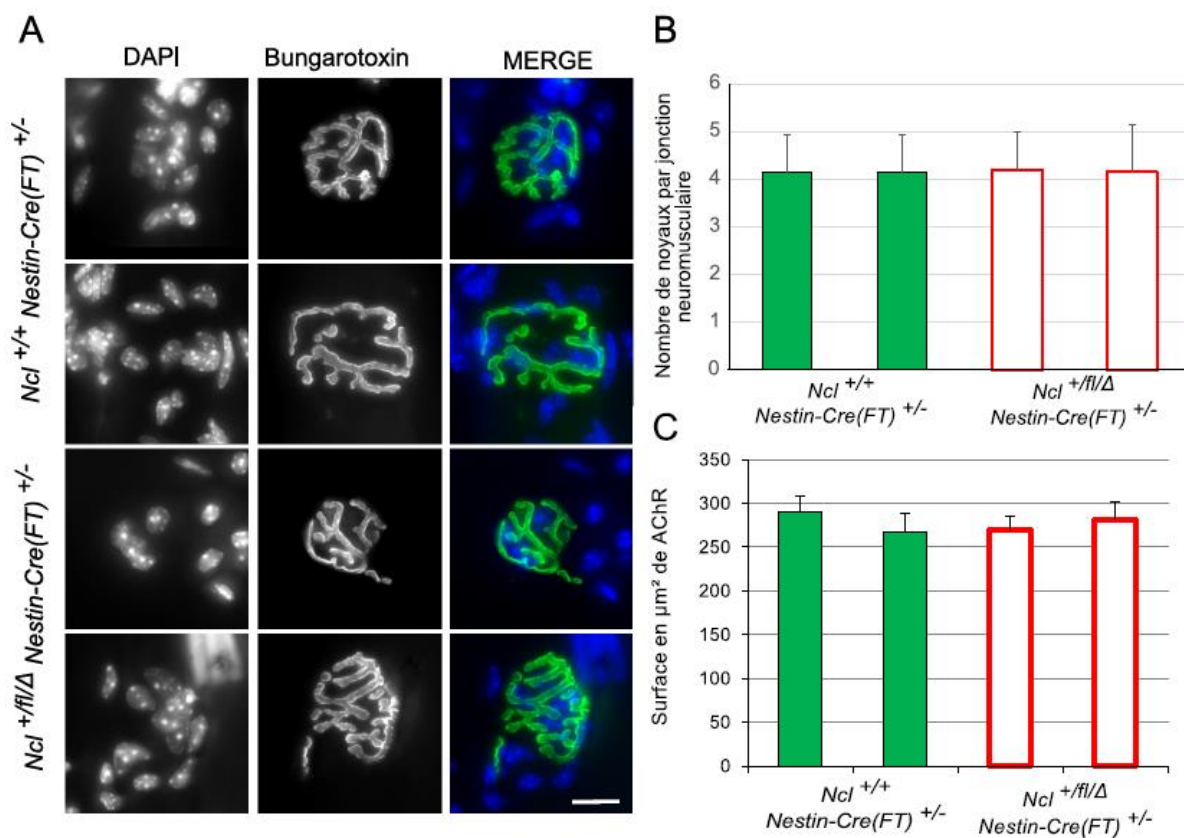


Figure 24 - Analyse des jonctions neuromusculaires sur des fibres musculaire du *tibialis anterior*.

(A) Des fibres musculaires du *tibialis anterior* de deux souris contrôles et deux souris mosaïques ont été individualisées et analysées par immunofluorescence. (B) Détermination du nombre de noyaux par jonctions neuromusculaires pour les souris contrôles (histogramme vert) et les souris mosaïques (histogramme rouge et blanc). (C) Détermination de la surface en µm² des récepteurs de l'acétylcholine (AChR) chez les souris contrôles et mosaïques. Moyennes +/- écart-type. 20 jonctions neuromusculaires ont été analysées par souris.

Cette expérience indique que le défaut de déplacement ne proviendrait pas d'un problème au niveau des synapses des jonctions neuromusculaires.

En résumé, l'inactivation de *Ncl* dans le SNC provoque chez les souris mosaïques une hypoplasie du cervelet dans lequel la quantité de NCL est réduite de deux fois. Cette inactivation ne modifie pas la masse corporelle et n'affecte pas la structure des jonctions neuromusculaires.

4.2.3 Effet de l'inactivation de *Ncl* sur le comportement des souris mosaïques.

Dans l'objectif de caractériser d'une manière plus quantitative les anomalies de comportement observées, plusieurs tests ont été réalisés sur des souris contrôles *Ncl*^{+/+}; *Nestin-Cre*(FT)^{+/-} et mosaïques *Ncl*^{+fl/Δ}; *Nestin-Cre* (FT)^{+/-}.

*4.2.3.1 La perte d'un allèle de *Ncl* dans le cerveau réduit l'activité exploratoire.*

Ce test consiste à suivre les déplacements de la souris dans l'exploration d'un nouvel espace à sa disposition.

Le logiciel d'analyse fournit une carte de densité de présence traduite par des variations de couleurs. La Figure 25 est une synthèse des résultats obtenus par chacune des sept souris contrôles et huit souris mutantes testées.

Les cartes obtenues indiquent que les souris contrôles explorent l'ensemble de l'espace disponible tandis que la majorité des souris mosaïques passent leurs temps dans les coins et contre les parois, une tendance appelée thigmotaxie. Toutefois, une variation au sein du groupe mutant est visible puisque trois animaux sur huit ont un comportement similaire aux contrôles alors que d'autres ne bougent que très peu hors des coins.

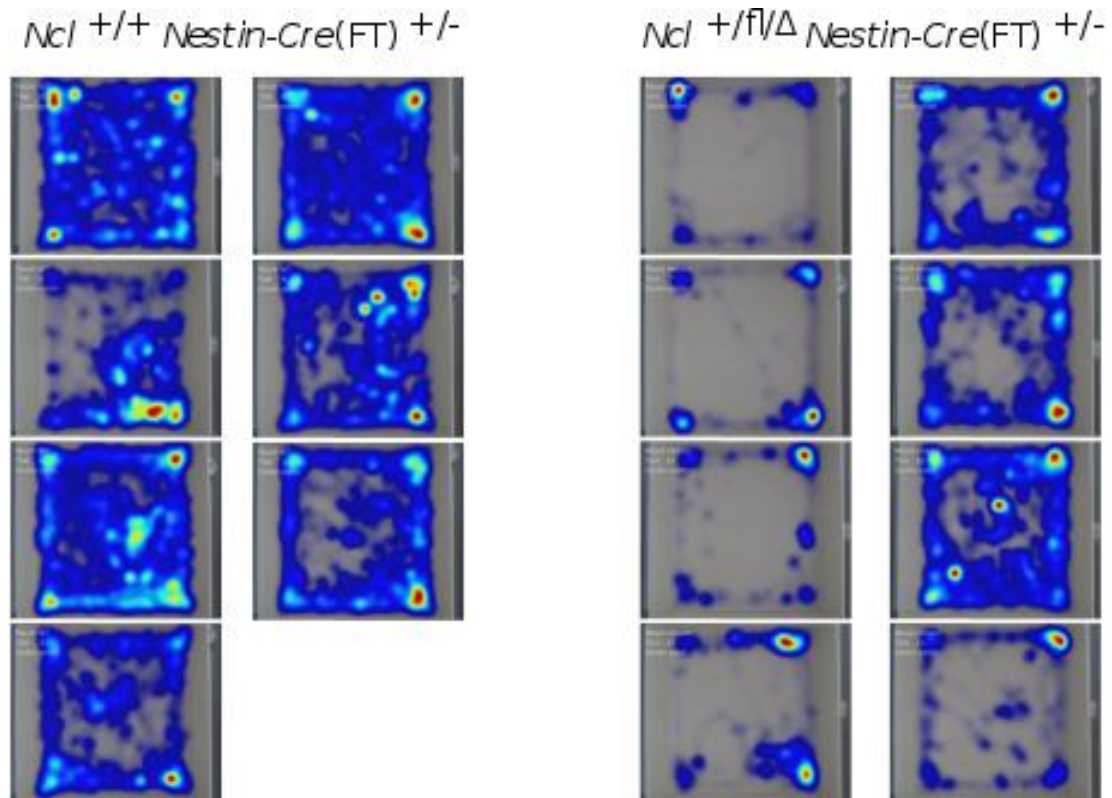


Figure 25 – Evaluation des déplacements des souris contrôles et mutantes dans l’exploration d’un nouvel espace. Test de l’open field.

Chaque carré correspond à une vue de dessus des déplacements d’une souris pendant 20 minutes. Les couleurs donnent une carte de densité de présence : les zones grises sont inexplorées tandis que les zones bleues, turquoise, jaunes et rouges sont des zones respectivement de plus en plus explorées au cours du temps. Sept souris contrôles (gauche) et de huit souris mosaïques (droite) sont testées.

Pour quantifier les mouvements de chaque groupe de souris, la surface disponible est subdivisée en quatre zones (Figure 26A) : les coins, les milieux latéraux, le centre, les murs. Le nombre de visites (Figure 26B) et le temps passé (Figure 26C) dans chacune des zones sont calculés. Les souris mosaïques visitent peu les zones définies : elles ont tendance à rester contre les murs et dans les coins (Figure 26C). Leur activité exploratoire est deux fois moins élevée que les contrôles. Cela peut s’expliquer soit par des problèmes moteurs, soit par des problèmes de stress et d’appréhension d’un nouvel environnement.

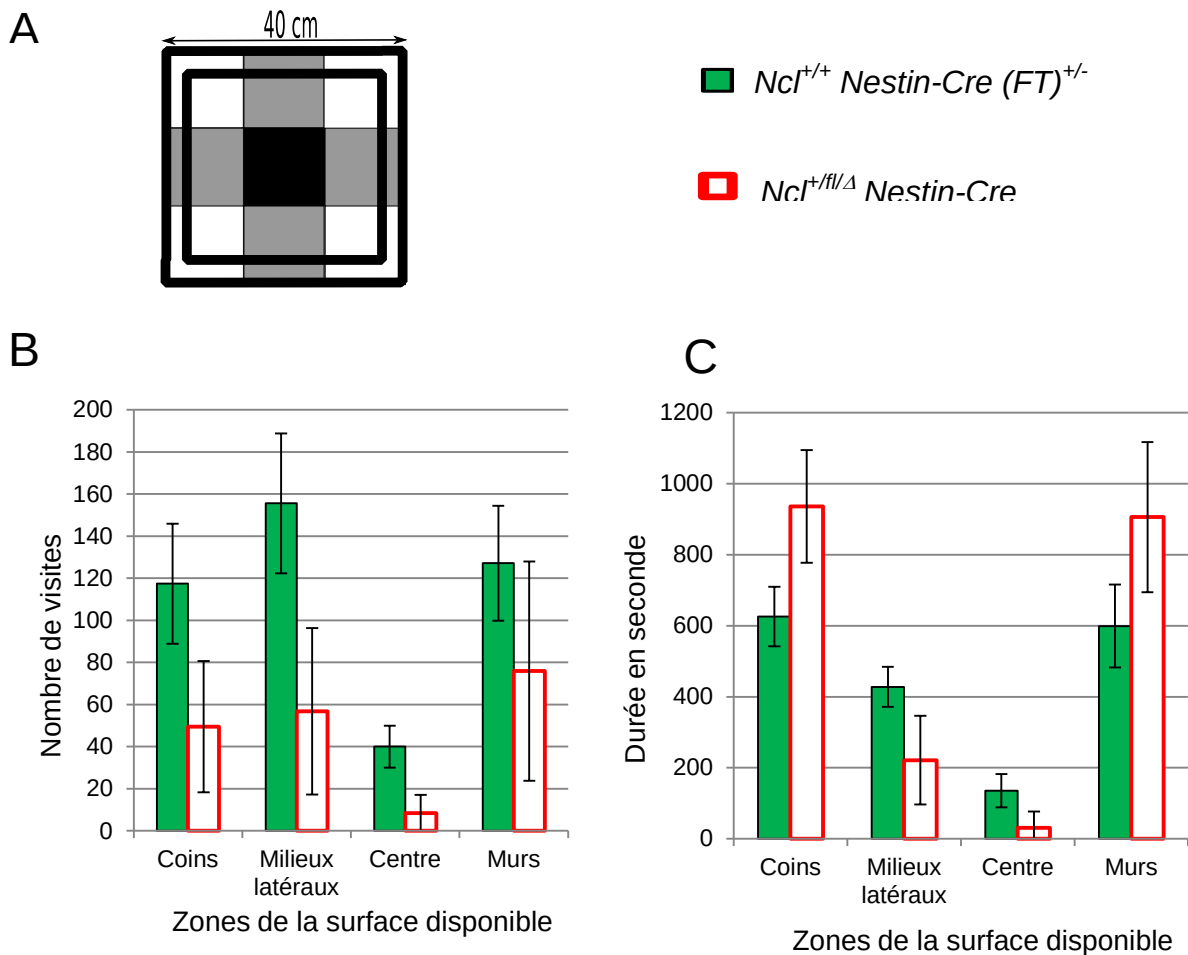


Figure 26 –Analyses du test de l’open field.

(A) Vue du dessus de la surface disponible, divisée en quatre zones : les coins (blanc), le centre (noir), les milieux latéraux (gris), les « murs » marqués par deux lignes noires tout autour de la boîte. (B) Nombre des visites de chaque zone. (C) Durée en seconde passée dans chaque zone par les souris des deux groupes. Les données sont les moyennes +/- écart-type. Sept souris contrôles (vert) et huit souris mutantes (blanc et rouge) ont été testées.

Ces différences de mobilité sont caractérisées notamment par la distance moyenne parcourue au cours des vingt minutes de test. Les souris *Ncl^{+fl/Δ} ; Nestin-Cre (FT)^{+/-}* parcourent une distance deux fois plus faible que celle des contrôles (~20 m vs ~40 m) (Figure 27 B). Cela est dû à la fois à une vitesse de déplacement plus lente (6 cm.sec⁻¹ vs 8 cm.sec⁻¹) (Figure 27A) et un temps passé à se déplacer plus court (300 sec vs. 500 sec) (Figure 27C).

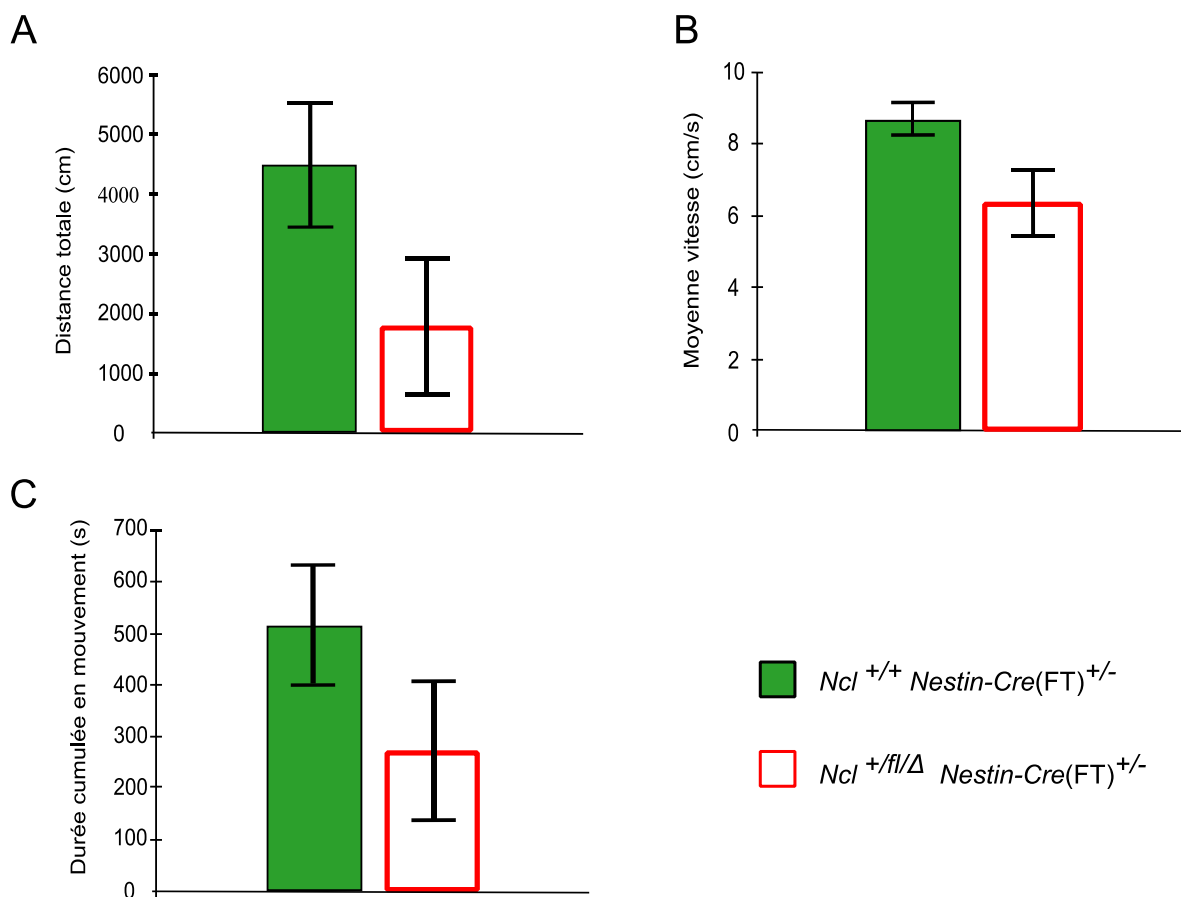


Figure 27 - Caractéristiques des mouvements des souris contrôles et mosaïques dans l'open field.

(A) Distance parcourue en cm par sept souris contrôle (histogramme vert) et huit souris mosaïques (histogramme rouge et blanc). (B) Vitesse moyenne en cm/s. (C) Durée cumulée en mouvement. Chaque histogramme est une moyenne $\pm$ écart-type.

Ce premier test indique que les souris mosaïques ont une activité exploratoire réduite et des déplacements perturbés, moins rapides que les souris contrôles.

4.2.3.2 Les souris mosaïques ne sont pas anxieuses.

Le test dure cinq minutes et permet d'évaluer l'anxiété et l'activité locomotrice des souris en observant leur comportement exploratoire dans un environnement avec obscurité et lumière (Figure 28A), sources de faibles stress. De manière innée, les rongeurs ont une aversion pour les zones illuminées et en même temps ont un comportement spontané d'exploration face à un nouvel environnement.

Une première observation est que les souris mutantes mettent en moyenne deux fois plus de temps (100 sec vs 50 sec) que les souris contrôles avant d'aller visiter la partie sombre (Figure 28B). De plus, elles passent moins de temps dans cette zone (75 sec vs 200 sec) et y retournent peu (1 fois vs 5 fois) (Figure 28C et D).

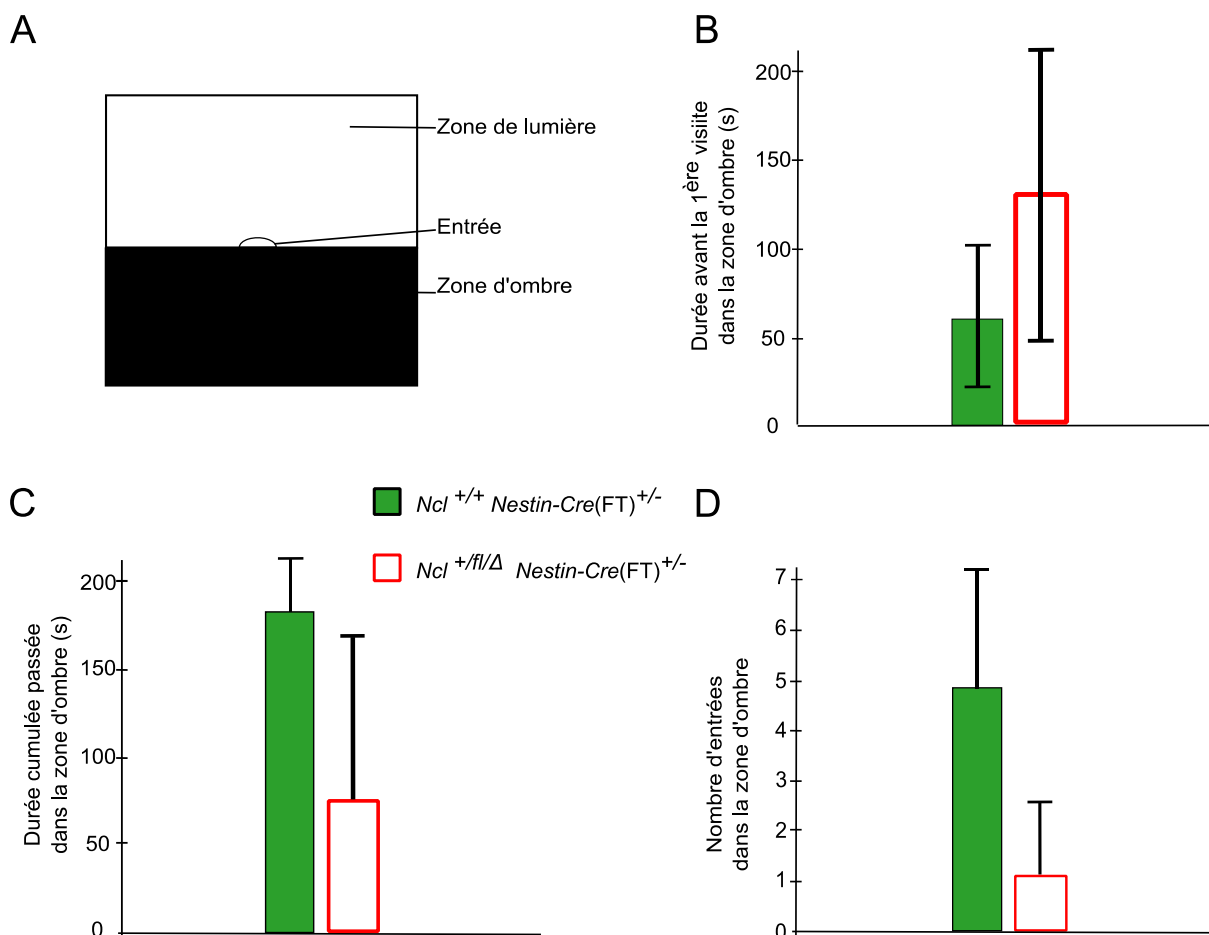


Figure 28 – Evaluation de l'anxiété et du comportement exploratoire des souris contrôles et mutantes. Light & dark box. (A) Vue de dessus du dispositif. L'espace disponible est composé d'une zone éclairée et d'une zone dans l'obscurité. Une ouverture permet le passage de la souris entre les deux zones. (B) Durée en seconde, avant la première visite dans la zone d'ombre. (C) Durée cumulée en seconde passée dans la zone d'ombre. (D) Nombre d'entrées d'entrée dans la zone d'ombre. Chaque histogramme est la moyenne $\pm$ écart-type des souris contrôles (vert) et mosaïques (rouge et blanc).

L'ensemble de ces résultats confirme qu'une inactivation de *Ncl* affecte le comportement exploratoire des souris mosaïques. Le temps de latence important avant l'entrée dans la zone obscure et la courte durée de présence dans cette zone semblent indiquer que leur anxiété est plus élevée que les souris contrôles. Ce serait essentiellement des problèmes moteurs qui modifieraient leur comportement exploratoire.

4.2.3.3 La perte d'un allèle de *Ncl* dans le cerveau affecte force et coordination.

Le test de la barre horizontale évalue d'une manière combinée la coordination et la force d'agrippement de la souris. Il permet ainsi de détecter des anomalies dans les fonctions neuromusculaires. Ce test consiste à faire agripper la souris par les pattes avant sur une barre métallique horizontale. Le score obtenu est proportionnel à la durée passée accrochée à la

barre et à leur capacité à atteindre une des extrémités (Figure 29A). Les souris mutantes ont un score inférieur (2,8 vs 4,9) aux souris contrôles. Ces résultats signifient qu'elles ont des problèmes de force et de coordination (Figure 29B) mais ce test ne permet pas de distinguer l'une de l'autre. L'utilisation d'un dynamomètre ou d'une série de poids croissants permettrait de mieux mesurer la force. Comme observé précédemment, les performances des souris mosaïques sont plus hétérogènes, cela traduit un degré d'atteinte différent selon les individus.

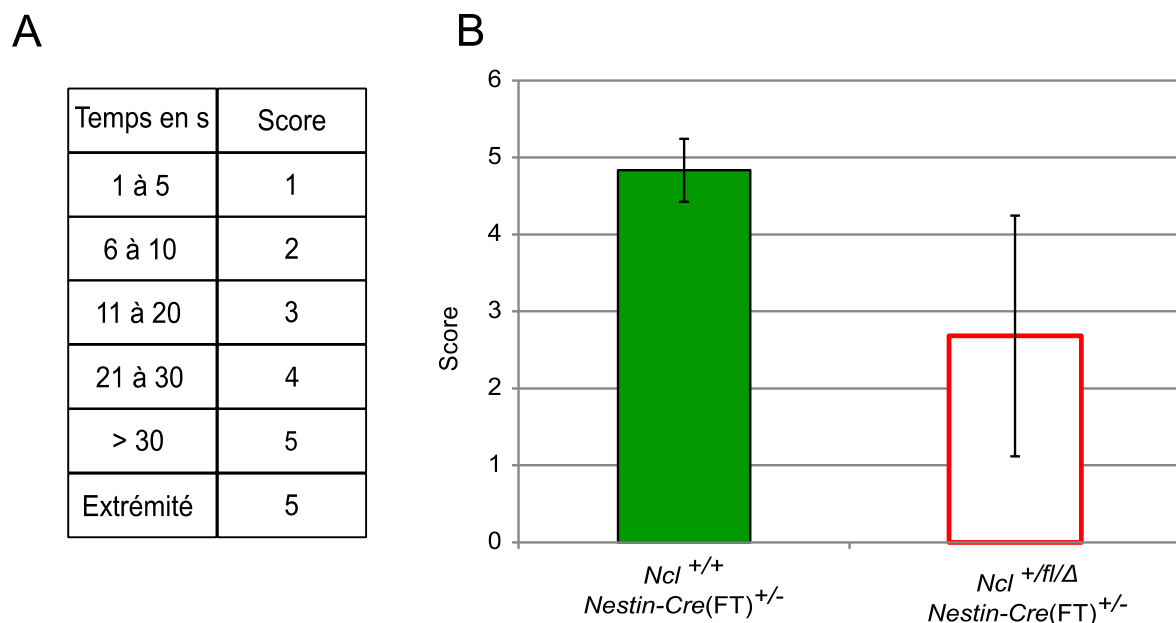


Figure 29 – Paramètres et analyse du test de la barre horizontale.

(A) Table de correspondance entre le temps de réalisation du test et le nombre de points attribué. (B) Comparaison des scores entre souris contrôles (vert) et mutantes (rouge et blanc). Les histogrammes représentent les moyennes +/- écart-type.

4.2.3.4 L'équilibre des souris mosaïques est atteint.

Le test des barres parallèles évalue la coordination motrice et l'équilibre de chaque animal. Les résultats obtenus en Figure 30 montrent que les souris mosaïques échouent très souvent à ce test (7 échecs vs 0 échec) (Figure 30A), elles passent plus deux fois de temps sur les barres que les contrôles (33 sec vs 16 sec) (Figure 30B), et ne parcourent qu'une faible distance (12 cm vs 42 cm) comparées aux souris contrôles. Une souris mosaïque seulement a atteint une des extrémités. Le test met bien en évidence les défauts d'équilibre et de coordination que nous avons observés dans les cages. De plus, la variation phénotypique entre les animaux mosaïques est à nouveau mise en évidence.

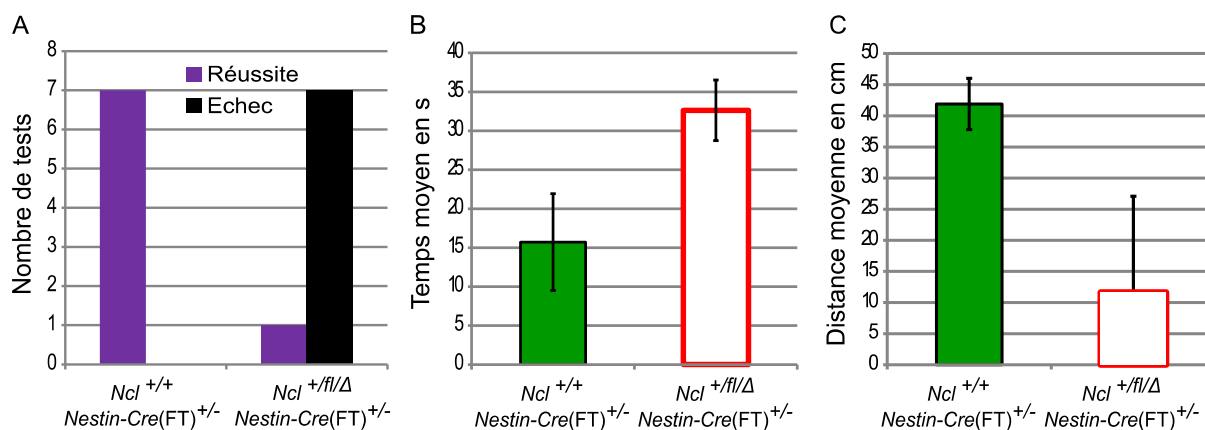


Figure 30 – Analyse du test des barres parallèles.

(A) Nombre de réussites (violet) et d'échecs (noir) pour les souris contrôles (droite) et mosaïques (gauche). (B) Temps moyen en secondes passé sur les barres parallèles par les souris contrôles (histogramme vert) et mosaïques (histogramme rouge et blanc). (C) Distance moyenne en centimètres parcourue sur les barres par chaque groupe. Moyennes +/- écart-type.

Tous ces résultats confirment qu'une diminution de NCL dans le SNC affecte l'équilibre, la coordination et la force d'agrippement des souris concernées.

4.2.3.5 La démarche des souris mosaïques est altérée

Le test des empreintes permet d'avoir des indications sur la démarche d'une souris. Les empreintes, faites avec de la peinture sur une feuille de papier, sont analysées et plusieurs paramètres sont calculés. La Figure 31 montre deux séries d'empreintes représentatives respectivement de souris $Ncl^{+/+}; Nestin-Cre(FT)^{+/-}$ et de souris $Ncl^{+/-\Delta}; Nestin-Cre(FT)^{+/-}$. Le test et les analyses sont réalisés sur dix souris contrôles et neuf souris mutantes. Bien que la longueur du pas soit identique pour les deux groupes de souris, les souris mosaïques ont une largeur d'appui plus importante. De plus, ces souris ont un coefficient d'alternance de 0,17 vs 0,1 ce qui indique que la démarche n'est pas régulièrement alternée. Quant à la mesure du mouvement linéaire, celle des souris mosaïques est légèrement plus élevée que celle des souris contrôles, signifiant une tendance à un mouvement sinueux.

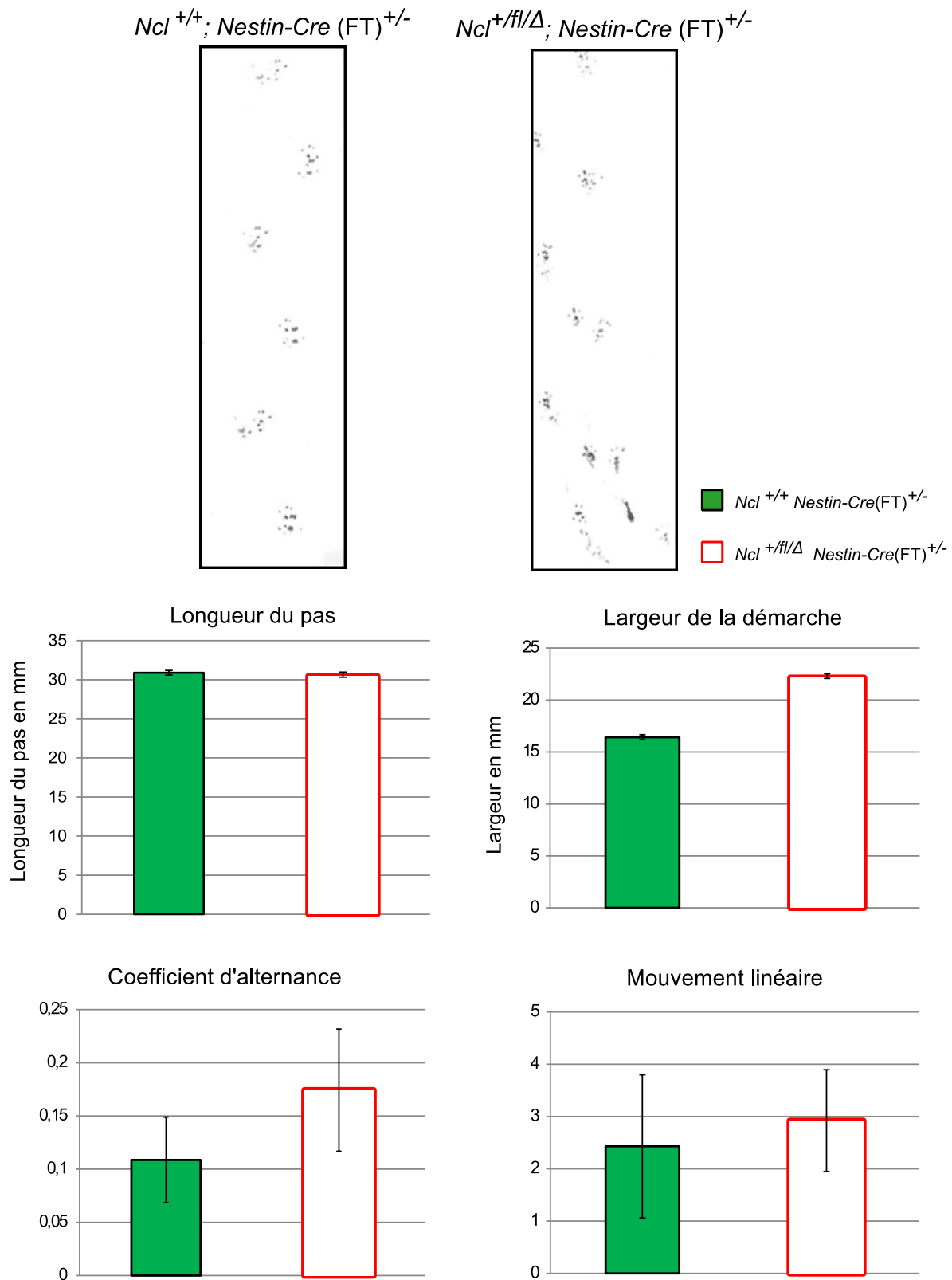


Figure 31 – Analyses par empreintes de la démarche de souris contrôles et mutantes.

L'empreinte de gauche est représentative d'une souris *Ncl*^{+/+}; *Nestin-Cre* (FT)^{+/-} et celle de droite d'une souris *Ncl*^{+fl/Δ}; *Nestin-Cre* (FT)^{+/-}. Le profil de chacune des empreintes est caractérisé par la longueur du pas, la largeur de la démarche, le coefficient d'alternance et le mouvement linéaire. Les histogrammes représentent les moyennes +/- écart-type.

L'ensemble des résultats obtenus démontrent que la perte de fonction d'un seul allèle du gène *Ncl* provoque un phénotype relativement sévère. Le phénotype est présent chez toutes les souris mutantes mais avec des degrés différents. L'origine de cette variabilité est peut-être le degré de mosaïcisme. Ces souris présentent une diminution de la production de la nucléoline, une hypoplasie du cervelet, une diminution d'activité exploratoire, une perte de leurs capacités motrices, en particulier une mauvaise coordination. Elles présentent aussi des tremblements qui n'ont pas été quantifiés.

4.2.4 Effet de l'inactivation de *Ncl* sur le cervelet en développement.

Chez les souris de la lignée « NCL Nestin-Cre (FT) » les anomalies comportementales débutent au cours de la deuxième semaine après la naissance, période pendant laquelle le cervelet termine son développement. Le cervelet est composé d'un vermis central avec des hémisphères latéraux. Il est subdivisé en une série de lobes très élaborés séparés par des fissures. Trois types de neurones sont caractéristiques de ces structures : les cellules granulaires, les cellules de Purkinje et les neurones profonds. Les lobes se mettent en place pendant les deux premières semaines après la naissance, ce qui s'accompagne d'une abondante prolifération des précurseurs des cellules granulaires dans la zone germinale externe (Leto et al., 2015). Ces cellules migrent ensuite vers l'intérieur du cervelet. Comme les souris mosaïques présente une hypoplasie de cet organe, nous avons voulu savoir quelle anomalie cellulaire pourrait expliquer ce phénomène. La prolifération, la migration et une mort cellulaire anormale peuvent expliquer le défaut des cellules granulaires.

Pour cela, des injections de bromodésoxyuridine (BrdU) ont été réalisées chez des souriceaux de onze jours (P11). Le BrdU, un analogue de la thymidine, s'incorpore uniquement dans l'ADN des cellules en cours de réplication pendant la phase S, à la place de la thymidine. Des immunomarquages sur des coupes de cerveaux d'animaux ayant reçu le BrdU, permettent d'identifier les cellules en cours de prolifération. La Figure 32 illustre le détail d'un lobule du cervelet d'une souris contrôle et d'une souris mosaïque. Les images sont obtenues par microscopie confocale.

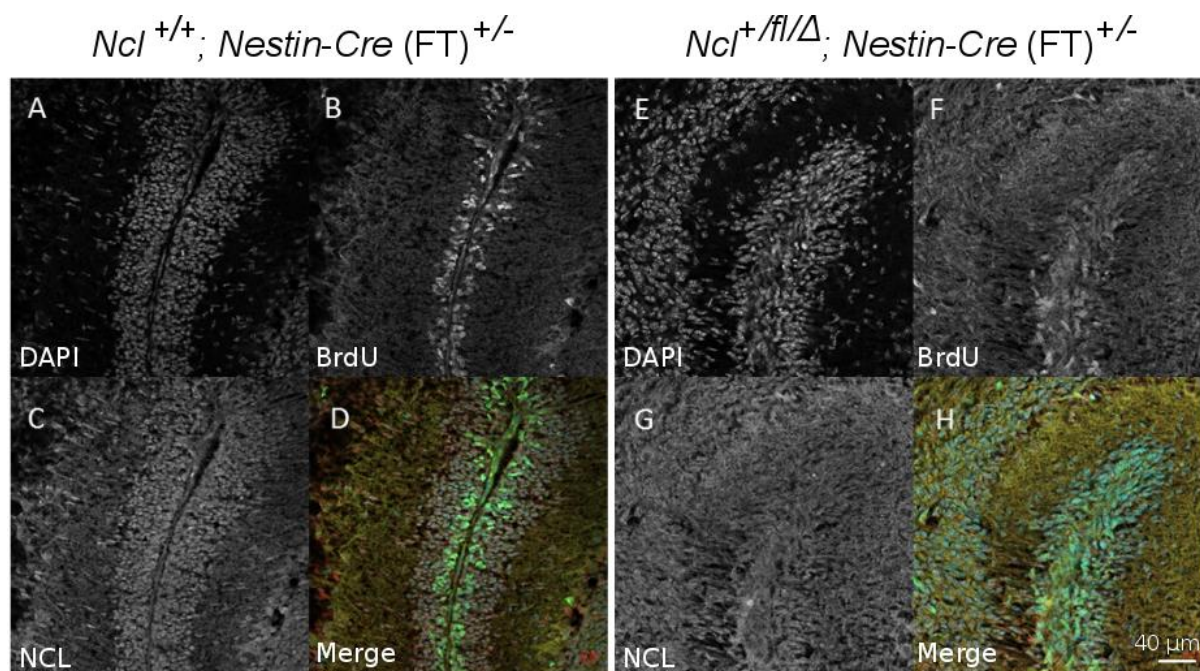


Figure 32 – Coupes confocales dans un cervelet de souriceau à P11 sauvage (A-D) ou mosaïque (E-H).

A et E : DAPI, B et F : BrdU, C et G : Ncl, D et H : superposition. Barre = 40 μ m

Le cervelet de la souris $Ncl^{+/-}; Nestin-Cre (FT)^{+/-}$ présente une structure plus anarchique et les cellules marquées au BrdU semblent moins nombreuses, dans la zone germinale externe, que chez la souris contrôle. Le marquage anti-NCL est diffus et doit être amélioré car il n'est pas dans le nucléole comme attendu.

L'inactivation d'une copie du gène *Ncl* provoque dans le cervelet une diminution de la quantité de NCL, comme vu par western blot, associée à une perturbation de la structure cellulaire des lobes. De plus, les cellules en prolifération semblent moins nombreuses et localisées de manière dispersée dans les lobes. Ceci suggère que la quantité de NCL est une variable cruciale pour le contrôle de la prolifération de ces cellules. La structure cytologique moins régulière de la zone germinale externe des mutants suggère un défaut de migration.

4.3 Etude de l'inactivation de *Ncl* dans les premiers stades de développement de l'embryon

L'absence de souriceaux KO homozygote pour *Ncl*, même mort-nés, nous a incités à identifier le point du développement pour lequel l'absence du gène devient critique. Deux approches complémentaires ont été adoptées. L'une consiste à analyser les génotypes

d'embryons à plusieurs stades de la gestation, et l'autre à suivre le développement précoce *in vitro*. L'état de nos travaux relatifs à la seconde approche est présenté ci-après.

La culture d'embryons *in vitro* permet d'atteindre le stade blastocyste (E4,5). *A priori* les transgènes *Nestin-Cre* ne s'expriment pas à ces stades. C'est pourquoi nous avons choisi de contrôler l'expression de *Cre* avec le tamoxifène en utilisant le transgène $CreER^{T2}$. En pratique, l'ovulation des femelles est déclenchée et synchronisée par injection d'hormones. Les femelles sont mises en accouplement, celles qui ont été fécondées sont sacrifiées à E1,5. Les embryons au stade deux cellules sont prélevés et mis en culture dans différentes conditions expérimentales décrites dans le Tableau IX.

Tableau IX - Conditions expérimentales pour la culture d'embryon +/- 1µM 4-OHT

Génotype des embryons	$Ncl^{+/+} CreER^{T2} +/-$		$Ncl^{+/fl} CreER^{T2} +/-$		$Ncl^{fl/fl} CreER^{T2} +/-$	
Concentration en µM de 4-OHT pendant 24 h	0	1	0	1	0	1
Nombre d'embryons par condition	n =3	n =3	n =3	n =4	n =4	n =3

La Figure 33 montre le développement des embryons au cours du temps selon leur génotype. En l'absence de 4-OHT, les embryons se développent normalement jusqu'au stade blastocyste, bien visible dans les colonnes trois et cinq de la figure. En présence de 4-OHT 1µM pendant les 24 premières heures de culture, l'ensemble des embryons meurent entre E3,5 et E4,5 en formant des amas dans lesquels les cellules meurent. Etant donné que même les embryons contrôles meurent, la concentration et/ou la durée d'exposition au 4-OHT semble trop importante pour les cellules. A titre de comparaison, un calcul grossier considérant une souris de 25g et une dose de tamoxifène injectée de 5mg donne une concentration de tamoxifène d'environ 530 µM, en posant l'hypothèse que le tamoxifène diffuse de manière homogène dans toute la masse de la souris. Ce calcul est peu informatif puisque ce n'est pas le tamoxifène, mais son métabolite le 4-OHT, qui est la substance active sur la recombinase $CreER^{T2}$. Nous reconduirons ces expériences de culture d'embryons avec une modification majeure. Les embryons posséderont en plus du *Ncl* et du transgène exprimant *Cre*, le transgène rapporteur *Rosa-CAG-LSL-tdTomato-WPRE*. Ce transgène permet l'expression de la protéine fluorescente tomato conditionnée par l'excision d'une cassette stop flanquée de site *loxP*. Il nous permettra de visualiser les embryons dans lesquels $CreER^{T2}$ est active et nous facilitera la détermination des doses minimales de 4-OHT à utiliser.

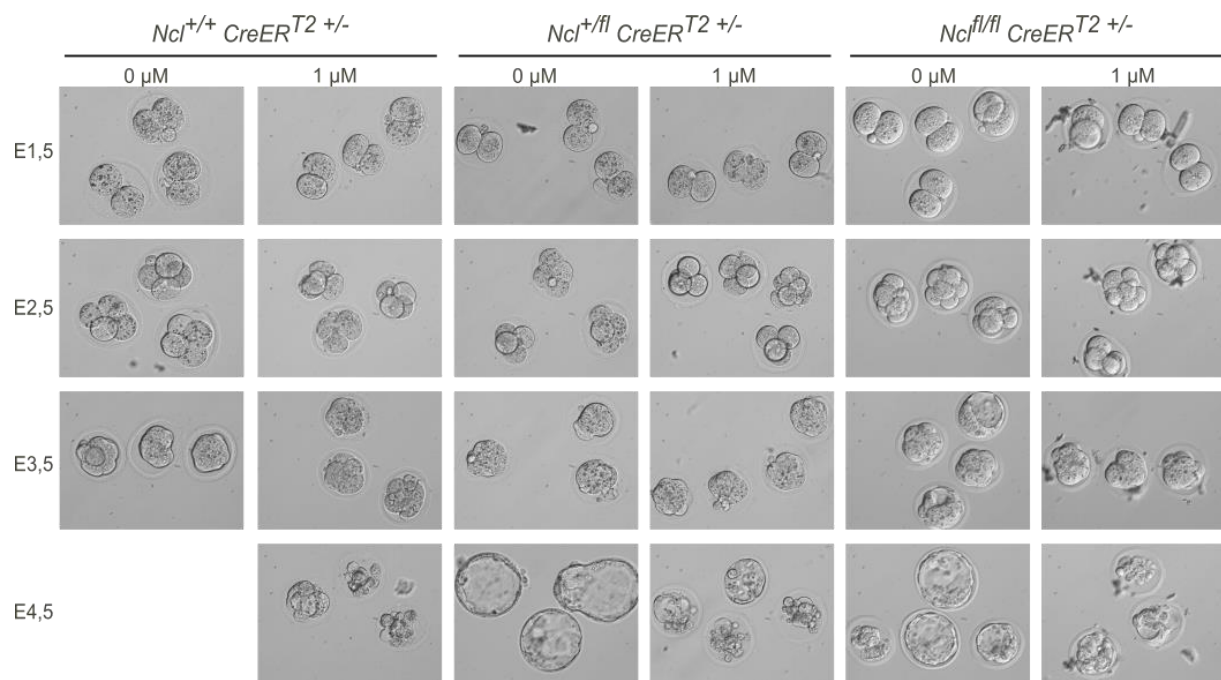


Figure 33 - Culture d'embryons de différents génotypes +/- tamoxifène 1 μ M.

Les embryons sont observés du stade deux cellules (E1,5) au stade blastocyste (E4,5).

Discussion

La nucléoline est une protéine ubiquitaire et multifonctionnelle. Son rôle est étudié dans un contexte pathologique humain : cancers, maladies neurodégénératives, et même infections virales (Abdelmohsen and Gorospe, 2012; Berger et al., 2015). Ces études sont souvent descriptives et lorsqu'il y a une démarche expérimentale elle est toujours mise en œuvre sur des modèles cellulaires en culture. L'objectif de ce projet était de générer et de caractériser le premier modèle murin permettant l'inactivation (KO) conditionnelle du gène *Ncl*. Ce modèle autorise, entre autre, l'étude de *Ncl* au cours du développement, indispensable pour compléter les connaissances acquises sur des modèles plus simples. Il permet aussi d'étudier l'implication de NCL lors des processus pathologiques, par exemple la néovascularisation tumorale.

1. La transmission germinale de la délétion est un événement rare.

Une stratégie classique pour étudier l'effet d'une mutation conditionnelle médiée par le système Cre-*LoxP* chez la souris consiste à obtenir des animaux porteurs de la mutation à l'état hétérozygote, puis à la génération suivante, des animaux homozygotes. Cette approche a par exemple été utilisée avec succès pour étudier les fonctions du gène codant TIF-IA, une protéine qui intervient avec NCL dans la régulation de la transcription par l'ARN polymérase I. Pour obtenir des animaux hétérozygotes, la recombinaison induite par Cre doit avoir eu lieu dans la lignée germinale pour être transmise à la descendance. Dans ce projet, les constructions *Nestin-Cre* et *Nestin-Cre(FT)*, ont été utilisées pour exprimer Cre dans la lignée germinale des souris mutantes conditionnelles pour *Ncl* et ainsi créer l'invalidation. Ces constructions ont en effet en commun d'utiliser, pour contrôler l'expression de Cre, un promoteur dérivé de celui du gène *Nestin* de rat. Ce promoteur permet une bonne expression de la recombinase dans le système nerveux dès le jour E10,5. Il autorise aussi une expression dans de nombreux autres tissus, à des niveaux variables mais globalement faibles (voir <http://www.informatics.jax.org/allele/key/6206>). En présence de ces transgènes, une activité recombinogène est détectée entre autres dans le système reproducteur, rendant ces transgènes utilisables pour permettre la production de gamètes mutants chez les animaux. Ainsi avons nous, dans un projet différent visant à étudier le rôle de la protéine PC4, utilisé avec succès les souris *Nestin-Cre(FT)* pour induire la transmission germinale de la délétion.

La transmission de l'allèle délété *Ncl*^Δ par la lignée germinale signifie que les embryons issus de ces gamètes sont mutants dans toutes leurs cellules. A contrario, une souris sera mosaïque si la délétion a lieu dans seulement une partie des cellules, au gré de l'expression du transgène

codant *Cre*. Un moyen d'être sûrs que cette transmission germinale a lieu est de vérifier l'absence de *Cre* dans les embryons présentant une délétion.

Une première observation est qu'aucun embryon *Ncl*^{Δ/Δ} n'a été identifié ; et ceci dans tous les types de croisements dans lesquels nous pouvions en attendre. L'absence d'embryon *Ncl*^{Δ/Δ} indique qu'un KO homozygote de *Ncl* est incompatible avec le développement *in utero* ou que ces embryons ne sont jamais conçus car les gamètes porteurs de l'allèle délété ne sont pas produits. Nous avons des arguments pour réfuter cette dernière hypothèse. Tout d'abord, nous savons grâce à un projet différent que la recombinaison fonctionne dans la lignée germinale lorsque l'on utilise le transgène *Nestin-Cre* (FT) (Swaminathan et al., 2016) et surtout nous avons obtenu sept souriceaux mort-nés *Ncl*^{+/-Δ} et *Ncl*^{fl/Δ} qui ne possédaient de transgène *Nestin-Cre*. Il convient probablement d'ajouter à ces sept souriceaux, neuf souriceaux de génotype *Ncl*^{+/-Δ} *Nestin-Cre*⁺, pour lesquels l'allèle flox n'est pas détecté. Les gamètes *Ncl*^Δ sont donc produits à une fréquence que nous ignorons et l'absence d'animaux *Ncl*^{Δ/Δ} indique que l'absence totale de *Ncl* n'est donc pas viable.

Ces résultats ne sont pas surprenants et sont en accord avec le fait que NCL est requise pour la prolifération et la survie cellulaire dans des cellules de poulet (Storck et al., 2009) et des fibroblastes humains (Ugrinova et al., 2007). Ils sont également en accord avec les résultats obtenus par l'invalidation d'autres gènes qui jouent un rôle lié aux fonctions de NCL. Par exemple, le KO de *Tif-IA*, un facteur de transcription de l'ARN polymérase I (RNAPI), est incompatible avec le développement, qui avorte autour du jour E9.5 (Yuan et al., 2005). TIF-IA joue un rôle important dans l'initiation de la transcription par RNAPI (Zhao et al., 2016). TIF-IA associé avec RNAPI, interagit avec le complexe SL1 comprenant TBP (TATA box Binding Protein) au niveau du promoteur des gènes ribosomiques. Il participe ainsi à la formation du complexe de pré-initiation. UBF (Upstream Binding Factor) est autre facteur participant à la formation de ce complexe, et l'invalidation d'*Ubf* entraîne la mort des embryons mutants homozygotes au stade morula (Hamdane et al., 2014). Notre équipe a montré que la répression de l'expression de *Ncl* par RNAi provoque une diminution du recrutement d'UBF au niveau de la chromatine des gènes ribosomiques.

La différence entre les invalidations de *Ncl*, d'*Ubf* et *TIF-IA*, est que l'état hétérozygote de *Ncl* s'accompagne d'effets phénotypiques importants contrairement aux mutants nuls hétérozygotes d'*Ubf* et *TIF-IA* qui ne présentent aucun phénotype particulier en terme de développement, de pathogenèse, de fertilité. (Yuan et al., 2005; Parlato et al., 2008; Hamdane et al., 2014). Les souriceaux KO hétérozygotes meurent tous à la naissance, ou même avant. Ceci indique que la présence des deux allèles fonctionnels de *Ncl* est requise pour le

développement prénatal normal et pour la viabilité post-natale. La cause de l'intolérance à l'haploinsuffisance de *Ncl* reste à déterminer. Des analyses histologiques et moléculaires des embryons au cours du développement apporteront des réponses. On peut penser que la plus grande dépendance vis-à-vis de *Ncl* est liée aux multiples fonctions de *Ncl*, tandis qu'*Ubf* et *Tif-IA* ont un rôle plus circonscrit dans la régulation de l'expression des gènes ribosomiques.

2. L'inactivation totale de *Ncl* dans le système nerveux central provoque une anencéphalie.

Il existe une nette différence de développement entre deux groupes de souriceaux, tous mort-nés. Les individus du premier groupe, de génotype *Ncl^{fl/Δ}; Nestin-Cre^{+/-}*, se développent tout en étant anencéphaliques : le crâne de ces souriceaux contient du sang et du liquide céphalorachidien. Cela peut s'expliquer par le fait que les cellules du cerveau subissent un KO total des deux allèles (*Ncl^{Δ/Δ}*) dès que la recombinaison s'exprime (vers E10), or les cellules dépourvues de nucléoline ne sont pas viables.

Les individus du second groupe, de génotype *Ncl^{fl/Δ}; Nestin-Cre^{-/-}* et *Ncl^{+/-}; Nestin-Cre⁺* ou -, semblent se développer normalement jusqu'à leur mort périnatale : à l'examen visuel lors de la nécropsie, leur cerveau paraît sans anomalie. L'étude détaillée du système nerveux central de ces mutants n'a cependant pas été réalisée, aussi nous ne pouvons pas conclure sur une éventuelle anomalie dans cette structure. Il y a tout lieu de croire que le développement du cervelet est anormal, comme constaté chez les souris mosaïques qui présentent une hypoplasie de cet organe. La cause de la mort de ces souriceaux reste inconnue. Un défaut pulmonaire pourrait expliquer cette inadaptation à la vie extra-utérine.

3. Le niveau d'expression de *Ncl* est critique pour le développement du système nerveux.

Les souris mosaïques *Ncl^{+/-fl/Δ} Nestin-Cre⁺* sont les seules souris portant la délétion à être viables. Ces souris vivent jusqu'à l'âge adulte, avec une croissance et un poids normaux. Chez ces souris, seules certaines cellules subissent la délétion en fonction de l'expression de *Cre*. L'expression de *Nestin-Cre* est maximale dans le système nerveux, et par conséquent, le taux de cellules affectées aussi ce qui explique que les souris y présentent un défaut. Le

cervelet est la structure qui semble la plus atteinte (Figure 22, Figure 32) : elle apparaît hypoplasique et désorganisée cytologiquement et histologiquement. La plus grande sensibilité du cervelet pourrait s'expliquer par la très forte cellularité de cette structure. En effet les différents neurones du cervelet représentent les trois quarts du nombre total de neurones du cerveau (Stackman, 2005). La très forte prolifération de ces cellules, en particulier des précurseurs des cellules granulaires durant les premiers jours post-nataux, requiert probablement la présence de quantité non limitante de NCL. En effet, de nombreuses études ont montré une corrélation entre prolifération et quantité de NCL (Durut and Sáez-Vásquez, 2015). Par ailleurs, la réduction expérimentale de NCL s'accompagne de l'arrêt de la prolifération (Ugrinova et al., 2007; Storck et al., 2009). Aussi, il est possible que les précurseurs des cellules granulaires soient les plus affectées par l'inactivation de *Ncl* chez ces souris. Nos résultats préliminaires qui montrent une baisse sensible de la prolifération à P11 vont en ce sens (Figure 32). A ce stade de nos investigations, des défauts moins visibles dans le reste du cerveau ne peuvent pas être exclus et seront à rechercher d'une manière systématique.

Les phénotypes comportementaux anormaux observés chez les souris mosaïques sont probablement dus à l'hypoplasie du cervelet que nous observons. En effet, le cervelet est un centre majeur de la coordination motrice du système nerveux central. Il est également impliqué dans d'autres fonctions comme les processus d'apprentissage, les comportements affectifs et émotionnels, le sommeil et l'attention (Becker and Stoodley, 2013). Afin de confirmer que les cellules granulaires sont principalement atteintes par l'haploinsuffisance de *Ncl*, nous envisageons de créer des mutants conditionnels qui n'exprimeraient pas *Ncl* dans ces cellules en utilisant le transgène *Otx2Cre-ER^{T2}* (Fauquier et al., 2014).

Le Tableau X ci-après résume les effets observés au cours du développement.

Tableau X - Tableau récapitulatif des effets observés suite à l'inactivation de *Ncl* au cours du développement.

Le génotype indiqué pour les zygotes ne tient pas compte de l'action de la recombinaise Cre. Le point d'interrogation indique que le système nerveux central est présent mais n'a pas été analysé dans le détail ; croix rouge = non/absence ; trait vert = oui/présence.

Gamète <i>Ncl</i>	+	+	+	fl	+	Δ	fl	fl	fl	Δ	Δ	Δ
Zygote	+/+		+/fl		+/ Δ		fl/fl		fl/ Δ		Δ/Δ	
Ncre	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Génotype corps	+/+	+/+	+/fl ou +/ Δ ↓ Mosaïque	+/fl	+/ Δ	+/ Δ	fl/fl ou fl/ Δ ou Δ/Δ ↓ Mosaïque	fl/fl	fl/fl ou fl/ Δ ou Δ/Δ ↓ Mosaïque	fl/ Δ	Δ/Δ	Δ/Δ
Génotype cerveau	+/+	+/+	+/ Δ	+/fl	+/ Δ	+/ Δ	Δ/Δ	fl/fl	Δ/Δ	fl/ Δ	Δ/Δ	Δ/Δ
Dévelop- pement embryon- naire	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗	✗
Viabilité	✓	✓	✓	✓	✗	✗	✗	✓	✗	✗	✗	✗
Système nerveux central	✓	✓	Hypoplasie cervelet	✓	?	?	Anencé- phalie	✓	Anencé- phalie	?	✗	✗

4. La perte d'un allèle *Ncl* est tolérée chez l'adulte.

L'étude pilote sur l'induction de la délétion dans les stades précoces du développement n'a pas été concluante. Etant donné que tous les embryons, même les contrôles, sont morts avec 1 μ M de 4-OHT, la toxicité du 4-OHT sur les cellules serait la cause de leur mort. Donc, soit la concentration est trop importante, soit la durée de contact est trop longue. Trouver les conditions expérimentales optimales permettrait d'identifier le stade auquel les embryons *Ncl* ^{Δ/Δ} meurent et si les embryons *Ncl*^{+/ Δ} se développent normalement. De même, l'analyse de la cholestérolémie des mutants induits par le tamoxifène s'est heurtée aux effets non-génomiques de cette drogue, qui par elle-même induit des perturbations métaboliques et une chute du taux de cholestérol (Dnistrian et al., 1993). Ces analyses pourront être tentées à nouveau chez les souris *Nestin-Cre*, en particulier dans le cerveau pour pouvoir se passer de l'utilisation du tamoxifène. Nous mettons en place d'autres modèles de souris transgéniques qui permettraient de localiser l'expression de la recombinaise et d'évaluer le taux de recombinaison. Ces souris portent le transgène rapporteur *Rosa-CAG-LSL-tdTomato-WPRE* codant la protéine fluorescente Tomato. Dans cette construction, le cadre de lecture de

Tomato est interrompu par une cassette stop floxée. La délétion de cette cassette par Cre permet l'expression de Tomato.

L'utilisation du système de recombinaise Cre inducible par le tamoxifène a montré que l'inactivation des deux allèles de *Ncl* est létale chez les souris adultes. La mort des souris mutantes survient 3 à 4 jours après la dernière injection de tamoxifène, suite à une perte catastrophique de poids. A ce stade des expériences, le mécanisme induisant la mort des souris adultes n'est pas expliqué et il est difficile de spéculer tant les mécanismes cellulaires impliquant NCL sont nombreux. Suite à l'activation de CreER^{T2}, *Ncl* est rapidement délété et la quantité de NCL chute sévèrement dans les organes. On peut supposer que la quantité de protéine restante n'est pas suffisante pour assurer le maintien en vie des cellules. En effet, NCL étant notamment impliquée dans la synthèse des ribosomes, éléments indispensables pour la production des protéines, quand elle n'est plus produite, la synthèse protéique n'a probablement pas lieu faute de ribosomes et la cellule meurt. On pense que les cellules à renouvellement rapide sont les plus touchées puisque la prolifération est liée à la quantité de NCL. Parmi ces cellules il y a celles de l'épithélium intestinal, ce qui pourrait expliquer la perte de poids. Les résultats obtenus avec l'inactivation ubiquitaire et totale chez l'adulte sont cohérents avec nos études au cours du développement dans lesquelles aucun embryon KO n'a été observé. De même, le KO de *Ncl* dans le cerveau provoque la naissance de souriceaux anencéphaliques. L'absence de nucléoline dans les cellules est donc incompatible avec la prolifération.

En revanche, la perte d'un seul allèle chez les adultes hétérozygotes *Ncl*^{+/-} n'engendre aucune anomalie détectable par nos protocoles. Bien que la délétion soit présente jusqu'à au moins 22 jours après le début de l'expérience, les souris survivent. Une supposition serait qu'un mécanisme de compensation soit mis en place par les cellules. L'inactivation d'une copie du gène serait compensée par l'utilisation de la copie sauvage de manière intensive pour la transcription et/ou la traduction, tolérant la perte de fonction de l'autre allèle. Cette hypothèse est soutenue par nos résultats de western blot (Figure 18) qui vont en ce sens puisque la quantité de NCL reste stable au moins dans le foie. Nous devons confirmer toutefois ces résultats dans d'autres organes.

D'une manière étonnante, cette compensation ne semble pas exister dans le cerveau des souris mosaïques *Ncl*^{+/-} *Nestin-Cre*⁺ puisqu'une diminution nette de la quantité de protéine est observée (Figure 23). Il est possible que la régulation de la biogenèse et de la dégradation de NCL ne soit pas identique dans tous les types cellulaires.

5. Conclusion

Que ce soit chez l'adulte ou au cours du développement, l'inactivation totale de *Ncl* est létale.

La perte de fonction d'un allèle, lorsqu'elle est induite chez l'adulte, est tolérée. Induite au cours du développement, elle permet, à une très faible fréquence, le développement embryonnaire de vrais mutants (*i.e.* non mosaïques : *Ncl*^{fl/Δ} ou *Ncl*^{+/Δ}) mais ne permet pas leur viabilité. Cela suggère qu'il existe un mécanisme d'adaptation chez l'adulte qui ne serait pas effectif pendant l'embryogenèse. L'hypothèse la plus simple serait que la régulation de l'expression de *Ncl* est plus critique dans l'embryon, tandis que l'adulte pourrait supporter des niveaux anormalement bas de NCL.

La perte d'un allèle *Ncl* sauvage chez les souris mosaïques est viable mais provoque une hypoplasie du cervelet associée à des tremblements, des troubles du comportement exploratoire, de l'équilibre, de la coordination.

Nos résultats confirment le rôle essentiel de la nucléoline dans un modèle vivant. Ils montrent également que la régulation de l'expression de la nucléoline est strictement contrôlée par un mécanisme qui reste à déterminer, puisque la perte d'un seul allèle n'est pas tolérable, à la différence de la plupart des gènes (Wilkie, 1994; Huang et al., 2010).

Bibliographie

- Abdelmohsen, K., Gorospe, M., 2012. RNA-binding protein nucleolin in disease. *RNA Biol.* 9, 799–808. doi:10.4161/rna.19718
- Abdelmohsen, K., Tominaga, K., Lee, E.K., Srikantan, S., Kang, M.-J., Kim, M.M., Selimyan, R., Martindale, J.L., Yang, X., Carrier, F., Zhan, M., Becker, K.G., Gorospe, M., 2011. Enhanced translation by Nucleolin via G-rich elements in coding and non-coding regions of target mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 39, 8513–8530. doi:10.1093/nar/gkr488
- Allain, F.H.-T., Bouvet, P., Dieckmann, T., Feigon, J., 2000. Molecular basis of sequence-specific recognition of pre-ribosomal RNA by nucleolin. *EMBO J.* 19, 6870–6881. doi:10.1093/emboj/19.24.6870
- Alvarez, M., Quezada, C., Navarro, C., Molina, A., Bouvet, P., Krauskopf, M., Vera, M.I., 2003. An increased expression of nucleolin is associated with a physiological nucleolar segregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 152–158. doi:10.1016/S0006-291X(02)02978-9
- Andersen, J.S., Wilkinson, C.J., Mayor, T., Mortensen, P., Nigg, E.A., Mann, M., 2003. Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* 426, 570–574. doi:10.1038/nature02166
- Angelov, D., Bondarenko, V.A., Almagro, S., Menoni, H., Mongéard, F., Hans, F., Mietton, F., Studitsky, V.M., Hamiche, A., Dimitrov, S., Bouvet, P., 2006. Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *EMBO J.* 25, 1669–1679. doi:10.1038/sj.emboj.7601046
- Becker, E.B.E., Stoodley, C.J., 2013. Autism spectrum disorder and the cerebellum. *Int. Rev. Neurobiol.* 113, 1–34. doi:10.1016/B978-0-12-418700-9.00001-0
- Belenguer, P., Baldin, V., Mathieu, C., Prats, H., Bensaid, M., Bouche, G., Amalric, F., 1989. Protein kinase NII and the regulation of rDNA transcription in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 17, 6625.
- Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Labbé, J.C., Dorée, M., Amalric, F., 1990. Mitosis-specific phosphorylation of nucleolin by p34cdc2 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 10, 3607–3618. doi:10.1128/MCB.10.7.3607
- Berger, C.M., Gaume, X., Bouvet, P., 2015. The roles of nucleolin subcellular localization in cancer. *Biochimie* 113, 78–85. doi:10.1016/j.biochi.2015.03.023
- Betz, U.A.K., Voßhenrich, C.A.J., Rajewsky, K., Müller, W., 1996. Bypass of lethality with mosaic mice generated by Cre-loxP-mediated recombination. *Curr. Biol.* 6, 1307–1316. doi:10.1016/S0960-9822(02)70717-3
- Biosciences, T., n.d. CreERT2 - Model 10471 [WWW Document]. URL <http://www.taconic.com/mouse-model/creert2> (accessed 9.6.16).
- Biterge, B., Schneider, R., 2014. Histone variants: key players of chromatin. *Cell Tissue Res.* 356, 457–466. doi:10.1007/s00441-014-1862-4
- Bourbon, H.M., Lapeyre, B., Amalric, F., 1988. Structure of the mouse nucleolin gene. The complete sequence reveals that each RNA binding domain is encoded by two independent exons. *J. Mol. Biol.* 200, 627–638.
- Bouvet, P., Diaz, J.-J., Kindbeiter, K., Madjar, J.-J., Amalric, F., 1998. Nucleolin Interacts with Several Ribosomal Proteins through Its RGG Domain. *J. Biol. Chem.* 273, 19025–19029. doi:10.1074/jbc.273.30.19025
- Bouvet, P., Jain, C., Belasco, J.G., Amalric, F., Erard, M., 1997. RNA recognition by the joint action of two nucleolin RNA-binding domains: genetic analysis and structural modeling. *EMBO J.* 16, 5235–5246. doi:10.1093/emboj/16.17.5235
- Bugler, B., Caizergues-Ferrer, M., Bouche, G., Bourbon, H., Amalric, F., 1982. Detection and localization of a class of proteins immunologically related to a 100-kDa nucleolar protein. *Eur. J. Biochem. FEBS* 128, 475–480.
- Bunimov, N., Smith, J.E., Gosselin, D., Laneuville, O., 2007. Translational regulation of PGHS-1 mRNA: 5′ untranslated region and first two exons conferring negative

- regulation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* 1769, 92–105. doi:10.1016/j.bbaexp.2007.01.004
- Caizergues-Ferrer, M., Belenguer, P., Lapeyre, B., Amalric, F., Wallace, M.O., Olson, M.O., 1987. Phosphorylation of nucleolin by a nucleolar type NII protein kinase. *Biochemistry (Mosc.)* 26, 7876–7883.
- Caizergues-Ferrer, M., Mariottini, P., Curie, C., Lapeyre, B., Gas, N., Amalric, F., Amaldi, F., 1989. Nucleolin from *Xenopus laevis*: cDNA cloning and expression during development. *Genes Dev.* 3, 324–333. doi:10.1101/gad.3.3.324
- Callebaut, C., Blanco, J., Benkirane, N., Krust, B., Jacotot, E., Guichard, G., Seddiki, N., Svab, J., Dam, E., Muller, S., Briand, J.-P., Hovanessian, A.G., 1998. Identification of V3 Loop-binding Proteins as Potential Receptors Implicated in the Binding of HIV Particles to CD4+Cells. *J. Biol. Chem.* 273, 21988–21997. doi:10.1074/jbc.273.34.21988
- Carpentier, M., Morelle, W., Coddeville, B., Pons, A., Masson, M., Mazurier, J., Legrand, D., 2005. Nucleolin Undergoes Partial N- and O-Glycosylations in the Extranuclear Cell Compartment. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 5804–5815. doi:10.1021/bi047831s
- Chan, C.-M., Chu, H., Zhang, A.J., Leung, L.-H., Sze, K.-H., Kao, R.Y.-T., Chik, K.K.-H., To, K.K.-W., Chan, J.F.-W., Chen, H., Jin, D.-Y., Liu, L., Yuen, K.-Y., 2016. Hemagglutinin of influenza A virus binds specifically to cell surface nucleolin and plays a role in virus internalization. *Virology* 494, 78–88. doi:10.1016/j.virol.2016.04.008
- Chan, H.Y.E., 2014. RNA-mediated pathogenic mechanisms in polyglutamine diseases and amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 431. doi:10.3389/fncel.2014.00431
- Chen, J., Guo, K., Kastan, M.B., 2012. Interactions of Nucleolin and Ribosomal Protein L26 (RPL26) in Translational Control of Human p53 mRNA. *J. Biol. Chem.* 287, 16467–16476. doi:10.1074/jbc.M112.349274
- Clark, H.B., Burright, E.N., Yunis, W.S., Larson, S., Wilcox, C., Hartman, B., Matilla, A., Zoghbi, H.Y., Orr, H.T., 1997. Purkinje Cell Expression of a Mutant Allele of SCA1 in Transgenic Mice Leads to Disparate Effects on Motor Behaviors, Followed by a Progressive Cerebellar Dysfunction and Histological Alterations. *J. Neurosci.* 17, 7385–7395.
- Cong, R., Das, S., Douet, J., Wong, J., Buschbeck, M., Mongelard, F., Bouvet, P., 2014. macroH2A1 histone variant represses rDNA transcription. *Nucleic Acids Res.* 42, 181–192. doi:10.1093/nar/gkt863
- Cong, R., Das, S., Ugrinova, I., Kumar, S., Mongelard, F., Wong, J., Bouvet, P., 2012. Interaction of nucleolin with ribosomal RNA genes and its role in RNA polymerase I transcription. *Nucleic Acids Res.* 40, 9441–9454. doi:10.1093/nar/gks720
- Cooper, G.M., 2000. *The Cell*, 2nd ed. Sinauer Associates.
- Das, S., Cong, R., Shandilya, J., Senapati, P., Moindrot, B., Monier, K., Delage, H., Mongelard, F., Kumar, S., Kundu, T.K., Bouvet, P., 2013. Characterization of nucleolin K88 acetylation defines a new pool of nucleolin colocalizing with pre-mRNA splicing factors. *FEBS Lett.* 587, 417–424. doi:10.1016/j.febslet.2013.01.035
- Davis, J., Maillet, M., Miano, J.M., Molkentin, J.D., 2012. Lost in Transgenesis: A Users guide for Genetically Manipulating the Mouse in Cardiac Research. *Circ. Res.* 111, 761–777. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.262717
- Deacon, R.M.J., 2013. Measuring motor coordination in mice. *J. Vis. Exp. JoVE* e2609. doi:10.3791/2609
- DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Gilmer, H.F., Adamson, J., Kouri, N., Wojtas, A., Sengdy, P., Hsiung, G.-Y.R., Karydas, A., Seeley, W.W., Josephs, K.A., Coppola, G., Geschwind, D.H., Wszolek, Z.K., Feldman, H., Knopman, D., Petersen, R., Miller,

- B.L., Dickson, D., Boylan, K., Graff-Radford, N., Rademakers, R., 2011. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in non-coding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 72, 245–256. doi:10.1016/j.neuron.2011.09.011
- Dennis J. Selkoe, 2001. Alzheimer's disease results from the cerebral accumulation and cytotoxicity of amyloid β -protein. *J. Alzheimers Dis.* 3, 75–80.
- Derenzini, M., Sirri, V., Pession, A., Trerè, D., Roussel, P., Ochs, R.L., Hernandez-Verdun, D., 1995. Quantitative Changes of the Two Major AgNOR Proteins, Nucleolin and Protein B23, Related to Stimulation of rDNA Transcription. *Exp. Cell Res.* 219, 276–282. doi:10.1006/excr.1995.1228
- Di Segni, A., Farin, K., Pinkas-Kramarski, R., 2008. Identification of Nucleolin as New ErbB Receptors- Interacting Protein. *PLoS ONE* 3, e2310. doi:10.1371/journal.pone.0002310
- Dnistrian, A.M., Schwartz, M.K., Greenberg, E.J., Smith, C.A., Schwartz, D.C., 1993. Effect of tamoxifen on serum cholesterol and lipoproteins during chemohormonal therapy. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* 223, 43–52.
- Durut, N., Abou-Ellail, M., Pontvianne, F., Das, S., Kojima, H., Ukai, S., Bures, A. de, Comella, P., Nidelet, S., Rialle, S., Merret, R., Echeverria, M., Bouvet, P., Nakamura, K., Sáez-Vásquez, J., 2014. A Duplicated NUCLEOLIN Gene with Antagonistic Activity Is Required for Chromatin Organization of Silent 45S rDNA in Arabidopsis. *Plant Cell* 26, 1330–1344. doi:10.1105/tpc.114.123893
- Durut, N., Sáez-Vásquez, J., 2015. Nucleolin: dual roles in rDNA chromatin transcription. *Gene* 556, 7–12. doi:10.1016/j.gene.2014.09.023
- Egyhazi, E., Pigon, A., Chang, J.H., Ghaffari, S.H., Dreesen, T.D., Wellman, S.E., Case, S.T., Olson, M.O., 1988. Effects of anti-C23 (nucleolin) antibody on transcription of ribosomal DNA in *Chironomus* salivary gland cells. *Exp. Cell Res.* 178, 264–272.
- Erard, M.S., Belenguer, P., Caizergues-Ferrer, M., Pantaloni, A., Amalric, F., 1988. A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1. *Eur. J. Biochem. FEBS* 175, 525–530.
- Fähling, M., Steege, A., Perlewitz, A., Nafz, B., Mrowka, R., Persson, P.B., Thiele, B.J., 2005. Role of nucleolin in posttranscriptional control of MMP-9 expression. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* 1731, 32–40. doi:10.1016/j.bbaexp.2005.08.005
- Farin, K., Schokoroy, S., Haklai, R., Cohen-Or, I., Elad-Sfadia, G., Reyes-Reyes, M.E., Bates, P.J., Cox, A.D., Kloog, Y., Pinkas-Kramarski, R., 2011. Oncogenic Synergism between ErbB1, Nucleolin, and Mutant Ras. *Cancer Res.* 71, 2140–2151. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2887
- Fauquier, T., Chatonnet, F., Picou, F., Richard, S., Fossat, N., Aguilera, N., Lamonerie, T., Flamant, F., 2014. Purkinje cells and Bergmann glia are primary targets of the TR α 1 thyroid hormone receptor during mouse cerebellum postnatal development. *Dev. Camb. Engl.* 141, 166–175. doi:10.1242/dev.103226
- Forni, P.E., Scuoppo, C., Imayoshi, I., Taulli, R., Dastrù, W., Sala, V., Betz, U.A.K., Muzzi, P., Martinuzzi, D., Vercelli, A.E., Kageyama, R., Ponzetto, C., 2006. High Levels of Cre Expression in Neuronal Progenitors Cause Defects in Brain Development Leading to Microencephaly and Hydrocephaly. *J. Neurosci.* 26, 9593–9602. doi:10.1523/JNEUROSCI.2815-06.2006
- Galzio, R., Rosati, F., Benedetti, E., Cristiano, L., Aldi, S., Mei, S., D'Angelo, B., Gentile, R., Laurenti, G., Cifone, M. g., Giordano, A., Cimini, A., 2012. Glycosilated nucleolin as marker for human gliomas. *J. Cell. Biochem.* 113, 571–579. doi:10.1002/jcb.23381
- Gaume, X., Monier, K., Argoul, F., Mongelard, F., Bouvet, P., 2011. In vivo Study of the Histone Chaperone Activity of Nucleolin by FRAP. *Biochem. Res. Int.* 2011, 187624. doi:10.1155/2011/187624

- Gaume, X., Place, C., Delage, H., Mongelard, F., Monier, K., Bouvet, P., 2016. Expression of Nucleolin Affects Microtubule Dynamics. *PLOS ONE* 11, e0157534. doi:10.1371/journal.pone.0157534
- Gaume, X., Tassin, A.-M., Ugrinova, I., Mongelard, F., Monier, K., Bouvet, P., 2015. Centrosomal nucleolin is required for microtubule network organization. *Cell Cycle* 14, 902–919. doi:10.1080/15384101.2014.1000197
- Ghisolfi, L., Joseph, G., Amalric, F., Erard, M., 1992. The glycine-rich domain of nucleolin has an unusual supersecondary structure responsible for its RNA-helix-destabilizing properties. *J. Biol. Chem.* 267, 2955–2959.
- Ghisolfi-Nieto, L., Joseph, G., Puvion-Dutilleul, F., Amalric, F., Bouvet, P., 1996. Nucleolin is a Sequence-specific RNA-binding Protein: Characterization of Targets on Pre-ribosomal RNA. *J. Mol. Biol.* 260, 34–53. doi:10.1006/jmbi.1996.0380
- Ginisty, H., Amalric, F., Bouvet, P., 2001. Two different combinations of RNA-binding domains determine the RNA binding specificity of nucleolin. *J. Biol. Chem.* 276, 14338–14343. doi:10.1074/jbc.M011120200
- Ginisty, H., Amalric, F., Bouvet, P., 1998. Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *EMBO J.* 17, 1476–1486. doi:10.1093/emboj/17.5.1476
- Ginisty, H., Serin, G., Ghisolfi-Nieto, L., Roger, B., Libante, V., Amalric, F., Bouvet, P., 2000. Interaction of Nucleolin with an Evolutionarily Conserved Pre-ribosomal RNA Sequence Is Required for the Assembly of the Primary Processing Complex. *J. Biol. Chem.* 275, 18845–18850. doi:10.1074/jbc.M002350200
- Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B., Bouvet, P., 1999. Structure and functions of nucleolin. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 6), 761–772.
- Giusti, S.A., Vercelli, C.A., Vogl, A.M., Kolarz, A.W., Pino, N.S., Deussing, J.M., Refojo, D., 2014. Behavioral phenotyping of Nestin-Cre mice: Implications for genetic mouse models of psychiatric disorders. *J. Psychiatr. Res.* 55, 87–95. doi:10.1016/j.jpsychires.2014.04.002
- Goldstein, M., Derheimer, F.A., Tait-Mulder, J., Kastan, M.B., 2013. Nucleolin mediates nucleosome disruption critical for DNA double-strand break repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 16874–16879. doi:10.1073/pnas.1306160110
- González, V., Hurley, L.H., 2010. The C-Terminus of Nucleolin Promotes the Formation of the c- MYC G-Quadruplex and Inhibits c- MYC Promoter Activity. *Biochemistry (Mosc.)* 49, 9706–9714. doi:10.1021/bi100509s
- Grinstein, E., Wernet, P., Snijders, P.J.F., Rösl, F., Weinert, I., Jia, W., Kraft, R., Schewe, C., Schwabe, M., Hauptmann, S., Dietel, M., Meijer, C.J.L.M., Royer, H.-D., 2002. Nucleolin as Activator of Human Papillomavirus Type 18 Oncogene Transcription in Cervical Cancer. *J. Exp. Med.* 196, 1067–1078. doi:10.1084/jem.20011053
- Gulli, M.P., Girard, J.P., Zabetakis, D., Lapeyre, B., Melese, T., Caizergues-Ferrer, M., 1995. gar2 is a nucleolar protein from *Schizosaccharomyces pombe* required for 18S rRNA and 40S ribosomal subunit accumulation. *Nucleic Acids Res.* 23, 1912–1918.
- Guo, A., Gu, H., Zhou, J., Mulhern, D., Wang, Y., Lee, K.A., Yang, V., Aguiar, M., Kornhauser, J., Jia, X., Ren, J., Beausoleil, S.A., Silva, J.C., Vemulapalli, V., Bedford, M.T., Comb, M.J., 2014. Immunoaffinity Enrichment and Mass Spectrometry Analysis of Protein Methylation. *Mol. Cell. Proteomics* 13, 372–387. doi:10.1074/mcp.O113.027870
- Hamdane, N., Stefanovsky, V.Y., Tremblay, M.G., Németh, A., Paquet, E., Lessard, F., Sanij, E., Hannan, R., Moss, T., 2014. Conditional Inactivation of Upstream Binding Factor Reveals Its Epigenetic Functions and the Existence of a Somatic Nucleolar Precursor Body. *PLoS Genet.* 10, e1004505. doi:10.1371/journal.pgen.1004505
- Hay, R.T., 2005. SUMO: A History of Modification. *Mol. Cell* 18, 1–12. doi:10.1016/j.molcel.2005.03.012

- Hendriks, I.A., D'Souza, R.C.J., Yang, B., Verlaan-de Vries, M., Mann, M., Vertegaal, A.C.O., 2014. Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 927–936. doi:10.1038/nsmb.2890
- Hernández-Ortega, K., Garcia-Esparcia, P., Gil, L., Lucas, J.J., Ferrer, I., 2015. Altered Machinery of Protein Synthesis in Alzheimer's: From the Nucleolus to the Ribosome. *Brain Pathol.* n/a-n/a. doi:10.1111/bpa.12335
- Hirai, Y., Louvet, E., Oda, T., Kumeta, M., Watanabe, Y., Horigome, T., Takeyasu, K., 2013. Nucleolar scaffold protein, WDR46, determines the granular compartmental localization of nucleolin and DDX21. *Genes Cells* 18, 780–797. doi:10.1111/gtc.12077
- Hofker, M.H., van Deursen, J. (Eds.), 2011. *Transgenic Mouse Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Hofmann, B.T., Schlüter, L., Lange, P., Mercanoglu, B., Ewald, F., Fölster, A., Picksak, A.-S., Harder, S., Gammal, A.T.E., Grupp, K., Güngör, C., Drenckhan, A., Schlüter, H., Wagener, C., Izicki, J.R., Jücker, M., Bockhorn, M., Wolters-Eisfeld, G., 2015. COSMC knockdown mediated aberrant O-glycosylation promotes oncogenic properties in pancreatic cancer. *Mol. Cancer* 14, 1. doi:10.1186/s12943-015-0386-1
- Hovanessian, A.G., Puvion-Dutilleul, F., Nisole, S., Svab, J., Perret, E., Deng, J.-S., Krust, B., 2000. The Cell-Surface-Expressed Nucleolin Is Associated with the Actin Cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* 261, 312–328. doi:10.1006/excr.2000.5071
- Huang, N., Lee, I., Marcotte, E.M., Hurles, M.E., 2010. Characterising and Predicting Haploinsufficiency in the Human Genome. *PLoS Genet.* 6. doi:10.1371/journal.pgen.1001154
- Khurts, S., Masutomi, K., Delgermaa, L., Arai, K., Oishi, N., Mizuno, H., Hayashi, N., Hahn, W.C., Murakami, S., 2004. Nucleolin Interacts with Telomerase. *J. Biol. Chem.* 279, 51508–51515. doi:10.1074/jbc.M407643200
- Kim, K., Dimitrova, D.D., Carta, K.M., Saxena, A., Daras, M., Borowiec, J.A., 2005. Novel Checkpoint Response to Genotoxic Stress Mediated by Nucleolin-Replication Protein A Complex Formation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 2463–2474. doi:10.1128/MCB.25.6.2463-2474.2005
- Kimelberg, H.K., 2008. Tamoxifen as a powerful neuroprotectant in experimental stroke and implications for human stroke therapy. *Recent Patents CNS Drug Discov.* 3, 104–108.
- Kondo, K., Inouye, M., 1992. Yeast NSR1 protein that has structural similarity to mammalian nucleolin is involved in pre-rRNA processing. *J. Biol. Chem.* 267, 16252–16258.
- Lapeyre, B., Amalric, F., Ghaffari, S.H., Rao, S.V., Dumbbar, T.S., Olson, M.O., 1986. Protein and cDNA sequence of a glycine-rich, dimethylarginine-containing region located near the carboxyl-terminal end of nucleolin (C23 and 100 kDa). *J. Biol. Chem.* 261, 9167–9173.
- Lapeyre, B., Bourbon, H., Amalric, F., 1987. Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells: an unusual protein structure revealed by the nucleotide sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 1472–1476.
- Leitinger, N., Wesierska-Gadek, J., 1993. ADP-ribosylation of nucleolar proteins in HeLa tumor cells. *J. Cell. Biochem.* 52, 153–158. doi:10.1002/jcb.240520207
- Leto, K., Arancillo, M., Becker, E.B.E., Buffo, A., Chiang, C., Ding, B., Dobyns, W.B., Dusart, I., Haldipur, P., Hatten, M.E., Hoshino, M., Joyner, A.L., Kano, M., Kilpatrick, D.L., Koibuchi, N., Marino, S., Martinez, S., Millen, K.J., Millner, T.O., Miyata, T., Parmigiani, E., Schilling, K., Sekerková, G., Sillitoe, R.V., Sotelo, C., Uesaka, N., Wefers, A., Wingate, R.J.T., Hawkes, R., 2015. Consensus Paper: Cerebellar Development. *The Cerebellum* 1–40. doi:10.1007/s12311-015-0724-2
- Lischwe, M.A., Roberts, K.D., Yeoman, L.C., Busch, H., 1982. Nucleolar specific acidic phosphoprotein C23 is highly methylated. *J. Biol. Chem.* 257, 14600–14602.

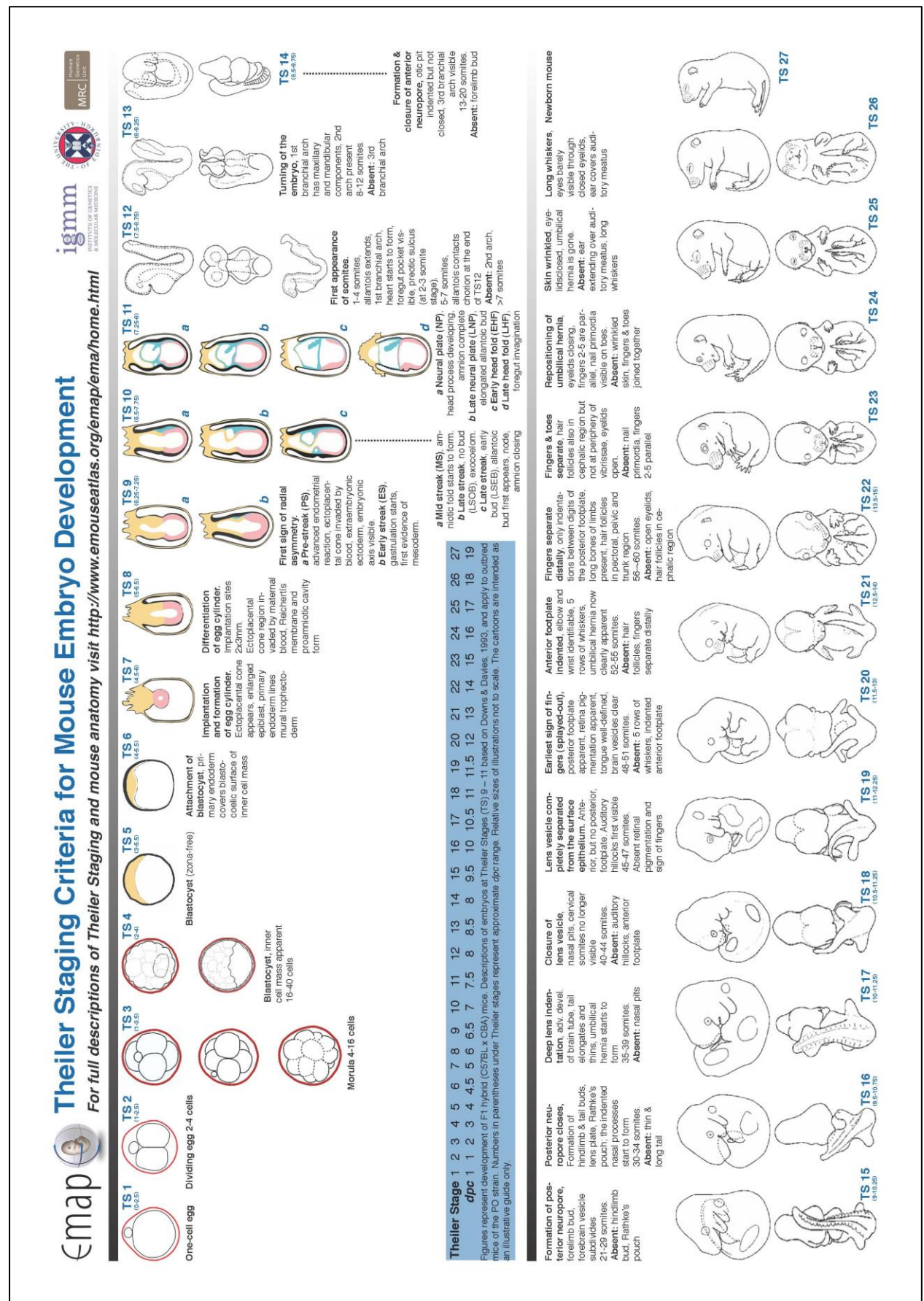
- Loonstra, A., Vooijs, M., Beverloo, H.B., Allak, B.A., Drunen, E. van, Kanaar, R., Berns, A., Jonkers, J., 2001. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 9209–9214. doi:10.1073/pnas.161269798
- Losfeld, M.-E., Khoury, D.E., Mariot, P., Carpentier, M., Krust, B., Briand, J.-P., Mazurier, J., Hovanessian, A.G., Legrand, D., 2009. The cell surface expressed nucleolin is a glycoprotein that triggers calcium entry into mammalian cells. *Exp. Cell Res.* 315, 357–369. doi:10.1016/j.yexcr.2008.10.039
- Ma, N., Matsunaga, S., Takata, H., Ono-Maniwa, R., Uchiyama, S., Fukui, K., 2007. Nucleolin functions in nucleolus formation and chromosome congression. *J. Cell Sci.* 120, 2091–2105. doi:10.1242/jcs.008771
- Mamrack, M.D., Olson, M.O., Busch, H., 1979. Amino acid sequence and sites of phosphorylation in a highly acidic region of nucleolar nonhistone protein C23. *Biochemistry (Mosc.)* 18, 3381–3386.
- Messmer, B., Dreyer, C., 1993. Requirements for nuclear translocation and nucleolar accumulation of nucleolin of *Xenopus laevis*. *Eur. J. Cell Biol.* 61, 369–382.
- Naiche, L.A., Papaioannou, V.E., 2007. Cre activity causes widespread apoptosis and lethal anemia during embryonic development. *Genes. N. Y. N* 2000 45, 768–775. doi:10.1002/dvg.20353
- Nalabothula, N., Indig, F.E., Carrier, F., 2010. The Nucleolus Takes Control of Protein Trafficking Under Cellular Stress. *Mol. Cell. Pharmacol.* 2, 203–212.
- Nicoloso, M., Caizergues-Ferrer, M., Michot, B., Azum, M.C., Bachellerie, J.P., 1994. U20, a novel small nucleolar RNA, is encoded in an intron of the nucleolin gene in mammals. *Mol. Cell. Biol.* 14, 5766–5776.
- O'Rourke, J.G., Bogdanik, L., Muhammad, A.K.M.G., Gendron, T.F., Kim, K.J., Austin, A., Cady, J., Liu, E.Y., Zarrow, J., Grant, S., Ho, R., Bell, S., Carmona, S., Simpkinson, M., Lall, D., Wu, K., Daugherty, L., Dickson, D.W., Harms, M.B., Petrucelli, L., Lee, E.B., Lutz, C.M., Baloh, R.H., 2015. C9orf72 BAC Transgenic Mice Display Typical Pathologic Features of ALS/FTD. *Neuron* 88, 892–901. doi:10.1016/j.neuron.2015.10.027
- Orrick, L.R., Olson, M.O., Busch, H., 1973. Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 1316–1320.
- Otake, Y., Soundararajan, S., Sengupta, T.K., Kio, E.A., Smith, J.C., Pineda-Roman, M., Stuart, R.K., Spicer, E.K., Fernandes, D.J., 2007. Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA. *Blood* 109, 3069–3075. doi:10.1182/blood-2006-08-043257
- Ozawa, D., Nakamura, T., Koike, M., Hirano, K., Miki, Y., Beppu, M., 2013. Shuttling protein nucleolin is a microglia receptor for amyloid beta peptide 1-42. *Biol. Pharm. Bull.* 36, 1587–1593.
- Parlato, R., Kreiner, G., Erdmann, G., Rieker, C., Stotz, S., Savenkova, E., Berger, S., Grummt, I., Schutz, G., 2008. Activation of an Endogenous Suicide Response after Perturbation of rRNA Synthesis Leads to Neurodegeneration in Mice. *J. Neurosci.* 28, 12759–12764. doi:10.1523/JNEUROSCI.2439-08.2008
- Perry, R.B.-T., Rishal, I., Doron-Mandel, E., Kalinski, A.L., Medzihradzsky, K.F., Terenzio, M., Alber, S., Koley, S., Lin, A., Rozenbaum, M., Yudin, D., Sahoo, P.K., Gomes, C., Shinder, V., Geraisy, W., Huebner, E.A., Woolf, C.J., Yaron, A., Burlingame, A.L., Twiss, J.L., Fainzilber, M., 2016. Nucleolin-Mediated RNA Localization Regulates Neuron Growth and Cycling Cell Size. *Cell Rep.* 16, 1664–1676. doi:10.1016/j.celrep.2016.07.005
- Pickering, B.F., Yu, D., Van Dyke, M.W., 2011. Nucleolin Protein Interacts with Microprocessor Complex to Affect Biogenesis of MicroRNAs 15a and 16. *J. Biol. Chem.* 286, 44095–44103. doi:10.1074/jbc.M111.265439

- Quezada, C., Navarro, C., San Martín, R., Alvarez, M., Molina, A., Vera, M.I., 2006. Genomic organization of nucleolin gene in carp fish: evidence for several genes. *Biol. Res.* 39, 353–365. doi:/S0716-97602006000200017
- Rebane, A., Metspalu, A., 1999. U82, a novel snoRNA identified from the fifth intron of human and mouse nucleolin gene1. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* 1446, 426–430. doi:10.1016/S0167-4781(99)00093-7
- Reis, S.D., Pinho, B.R., Oliveira, J.M.A., 2016. Modulation of Molecular Chaperones in Huntington's Disease and Other Polyglutamine Disorders. *Mol. Neurobiol.* 1–26. doi:10.1007/s12035-016-0120-z
- Rickards, B., Flint, S.J., Cole, M.D., LeRoy, G., 2007. Nucleolin is required for RNA polymerase I transcription in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 27, 937–948. doi:10.1128/MCB.01584-06
- Roger, B., Moisand, A., Amalric, F., Bouvet, P., 2002. Repression of RNA Polymerase I Transcription by Nucleolin Is Independent of the RNA Sequence That Is Transcribed. *J. Biol. Chem.* 277, 10209–10219. doi:10.1074/jbc.M106412200
- Roussel, P., Belenguer, P., Amalric, F., Hernandez-Verdun, D., 1992. Nucleolin is an Ag-NOR protein; this property is determined by its amino-terminal domain independently of its phosphorylation state. *Exp. Cell Res.* 203, 259–269.
- Sarkar, A., Irwin, M., Singh, A., Riccetti, M., Singh, A., 2016. Alzheimer's disease: the silver tsunami of the 21st century. *Neural Regen. Res.* 11, 693–697. doi:10.4103/1673-5374.182680
- Sato, H., Kusumoto-Matsuo, R., Ishii, Y., Mori, S., Nakahara, T., Shinkai-Ouchi, F., Kawana, K., Fujii, T., Taketani, Y., Kanda, T., Kukimoto, I., 2009. Identification of nucleolin as a protein that binds to human papillomavirus type 16 DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387, 525–530. doi:10.1016/j.bbrc.2009.07.055
- Sauer, B., Henderson, N., 1988. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5166–5170.
- Schmidt-Zachmann, M.S., Nigg, E.A., 1993. Protein localization to the nucleolus: a search for targeting domains in nucleolin. *J. Cell Sci.* 105, 799–806.
- Schneider, H.R., Issinger, O.-G., 1989. Growth-dependent modulation of casein kinase II and its substrate nucleolin in primary human cell cultures and HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1014, 98–100. doi:10.1016/0167-4889(89)90246-2
- Seibler, J., Zevnik, B., Küter-Luks, B., Andreas, S., Kern, H., Hennek, T., Rode, A., Heimann, C., Faust, N., Kauselmann, G., Schoor, M., Jaenisch, R., Rajewsky, K., Kühn, R., Schwenk, F., 2003. Rapid generation of inducible mouse mutants. *Nucleic Acids Res.* 31, e12.
- Sengupta, T.K., Bandyopadhyay, S., Fernandes, D.J., Spicer, E.K., 2004. Identification of Nucleolin as an AU-rich Element Binding Protein Involved in bcl-2 mRNA Stabilization. *J. Biol. Chem.* 279, 10855–10863. doi:10.1074/jbc.M309111200
- Serin, G., Joseph, G., Faucher, C., Ghisolfi, L., Bouche, G., Amalric, F., Bouvet, P., 1996. Localization of nucleolin binding sites on human and mouse pre-ribosomal RNA. *Biochimie* 78, 530–538. doi:10.1016/0300-9084(96)84759-6
- Serin, G., Joseph, G., Ghisolfi, L., Bauzan, M., Erard, M., Amalric, F., Bouvet, P., 1997. Two RNA-binding Domains Determine the RNA-binding Specificity of Nucleolin. *J. Biol. Chem.* 272, 13109–13116. doi:10.1074/jbc.272.20.13109
- Shang, Y., Kakinuma, S., Nishimura, M., Kobayashi, Y., Nagata, K., Shimada, Y., 2012. Interleukin-9 receptor gene is transcriptionally regulated by nucleolin in T-Cell lymphoma cells. *Mol. Carcinog.* 51, 619–627. doi:10.1002/mc.20834
- Srivastava, M., Fleming, P.J., Pollard, H.B., Burns, A.L., 1989. Cloning and sequencing of the human nucleolin cDNA. *FEBS Lett.* 250, 99–105.

- Srivastava, M., Fleming, P.J., Pollard, H.B., Burns, A.L., 1989. Cloning and sequencing of the human nucleolin cDNA. *FEBS Lett.* 250, 99–105. doi:10.1016/0014-5793(89)80692-1
- Srivastava, M., Pollard, H.B., 1999. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J.* 13, 1911–1922.
- Stackman, J., Robert W., 2005. *The Synaptic Organization of the Brain*. Fifth Edition. Edited by Gordon M Shepherd. *Q. Rev. Biol.* 80, 502–502. doi:10.1086/501315
- Storck, S., Thiry, M., Bouvet, P., 2009. Conditional knockout of nucleolin in DT40 cells reveals the functional redundancy of its RNA-binding domains. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* 101, 153–167. doi:10.1042/BC20080054
- Swaminathan, A., Delage, H., Chatterjee, S., Belgarbi-Dutron, L., Cassel, R., Martinez, N., Cosquer, B., Kumari, S., Mongelard, F., Lannes, B., Cassel, J.-C., Boutillier, A.-L., Bouvet, P., Kundu, T.K., 2016. Transcriptional Coactivator and Chromatin Protein PC4 Is Involved in Hippocampal Neurogenesis and Spatial Memory Extinction. *J. Biol. Chem.* 291, 20303–20314. doi:10.1074/jbc.M116.744169
- Takagi, M., Absalon, M.J., McLure, K.G., Kastan, M.B., 2005. Regulation of p53 Translation and Induction after DNA Damage by Ribosomal Protein L26 and Nucleolin. *Cell* 123, 49–63. doi:10.1016/j.cell.2005.07.034
- Tayyari, F., Marchant, D., Moraes, T.J., Duan, W., Mastrangelo, P., Hegele, R.G., 2011. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nat. Med.* 17, 1132–1135. doi:10.1038/nm.2444
- Tg(Nes-cre)1Kln Transgene Detail MGI Mouse (MGI:2176173) [WWW Document], n.d. URL <http://www.informatics.jax.org/allele/key/6206> (accessed 10.26.16).
- Trerè, D., 2000. AgNOR staining and quantification. *Micron* 31, 127–131. doi:10.1016/S0968-4328(99)00069-4
- Tronche, F., Kellendonk, C., Kretz, O., Gass, P., Anlag, K., Orban, P.C., Bock, R., Klein, R., Schütz, G., 1999. Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. *Nat. Genet.* 23, 99–103. doi:10.1038/12703
- Tsoi, H., Lau, T.C.-K., Tsang, S.-Y., Lau, K.-F., Chan, H.Y.E., 2012. CAG expansion induces nucleolar stress in polyglutamine diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 13428–13433. doi:10.1073/pnas.1204089109
- Turner, A.J., Knox, A.A., Prieto, J.-L., McStay, B., Watkins, N.J., 2009. A Novel Small-Subunit Processome Assembly Intermediate That Contains the U3 snoRNP, Nucleolin, RRP5, and DBP4. *Mol. Cell. Biol.* 29, 3007–3017. doi:10.1128/MCB.00029-09
- Tuteja, N., Huang, N.W., Skopac, D., Tuteja, R., Hrvatic, S., Zhang, J., Pongor, S., Joseph, G., Faucher, C., Amalric, F., 1995. Human DNA helicase IV is nucleolin, an RNA helicase modulated by phosphorylation. *Gene* 160, 143–148.
- Tyler, J.K., 2002. Chromatin assembly. *Eur. J. Biochem.* 269, 2268–2274. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.02890.x
- Ugrinova, I., Monier, K., Ivaldi, C., Thiry, M., Storck, S., Mongelard, F., Bouvet, P., 2007. Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication. *BMC Mol. Biol.* 8, 66. doi:10.1186/1471-2199-8-66
- Uribe, D.J., Guo, K., Shin, Y.-J., Sun, D., 2011. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and nucleolin as transcriptional activators of the vascular endothelial growth factor promoter through interaction with secondary DNA structures. *Biochemistry (Mosc.)* 50, 3796–3806. doi:10.1021/bi101633b
- Wilkie, A.O., 1994. The molecular basis of genetic dominance. *J. Med. Genet.* 31, 89–98.
- Wise, J.F., Berkova, Z., Mathur, R., Zhu, H., Braun, F.K., Tao, R.-H., Sabichi, A.L., Ao, X., Maeng, H., Samaniego, F., 2013. Nucleolin inhibits Fas ligand binding and suppresses Fas-mediated apoptosis in vivo via a surface nucleolin-Fas complex. *Blood* 121, 4729–4739. doi:10.1182/blood-2012-12-471094

- Wojciechowska, M., Krzyzosiak, W.J., 2011. Cellular toxicity of expanded RNA repeats: focus on RNA foci. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3811–3821. doi:10.1093/hmg/ddr299
- Xiao, S., Caglar, E., Maldonado, P., Das, D., Nadeem, Z., Chi, A., Trinité, B., Li, X., Saxena, A., 2014. Induced Expression of Nucleolin Phosphorylation-Deficient Mutant Confers Dominant-Negative Effect on Cell Proliferation. *PLOS ONE* 9, e109858. doi:10.1371/journal.pone.0109858
- Yang, C., 2009. Nucleolin Binds to the Proliferating Cell Nuclear Antigen and Inhibits Nucleotide Excision Repair. *Mol. Cell. Pharmacol.* 1, 130–137. doi:10.4255/mcpharmacol.09.17
- Ying, G.-G., Proost, P., Damme, J. van, Bruschi, M., Introna, M., Golay, J., 2000. Nucleolin, a Novel Partner for the Myb Transcription Factor Family That Regulates Their Activity. *J. Biol. Chem.* 275, 4152–4158. doi:10.1074/jbc.275.6.4152
- Yuan, X., Zhou, Y., Casanova, E., Chai, M., Kiss, E., Gröne, H.-J., Schütz, G., Grummt, I., 2005. Genetic Inactivation of the Transcription Factor TIF-IA Leads to Nucleolar Disruption, Cell Cycle Arrest, and p53-Mediated Apoptosis. *Mol. Cell* 19, 77–87. doi:10.1016/j.molcel.2005.05.023
- Zaidi, S.H.E., Malter, J.S., 1995. Nucleolin and Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein C Proteins Specifically Interact with the 3'-Untranslated Region of Amyloid Protein Precursor mRNA. *J. Biol. Chem.* 270, 17292–17298. doi:10.1074/jbc.270.29.17292
- Zhang, D., Liang, Y., Xie, Q., Gao, G., Wei, J., Huang, H., Li, J., Gao, J., Huang, C., 2015. A novel post-translational modification of nucleolin, SUMOylation at Lys-294, mediates arsenite-induced cell death by regulating gadd45 α mRNA stability. *J. Biol. Chem.* 290, 4784–4800. doi:10.1074/jbc.M114.598219
- Zhang, L., Lin, J., Ye, K., 2013. Structural and functional analysis of the U3 snoRNA binding protein Rrp9. *RNA* 19, 701–711. doi:10.1261/rna.037580.112
- Zhao, J., Nassar, M.A., Gavazzi, I., Wood, J.N., 2006. Tamoxifen-inducible NaV1.8-CreERT2 recombinase activity in nociceptive neurons of dorsal root ganglia. *genesis* 44, 364–371. doi:10.1002/dvg.20224
- Zhao, Z., Dammert, M.A., Hoppe, S., Bierhoff, H., Grummt, I., 2016. Heat shock represses rRNA synthesis by inactivation of TIF-IA and lncRNA-dependent changes in nucleosome positioning. *Nucleic Acids Res.* gkw496. doi:10.1093/nar/gkw496
- Zheng, B., Sage, M., Sheppard, E.A., Jurecic, V., Bradley, A., 2000. Engineering Mouse Chromosomes with Cre-loxP: Range, Efficiency, and Somatic Applications. *Mol. Cell. Biol.* 20, 648–655.

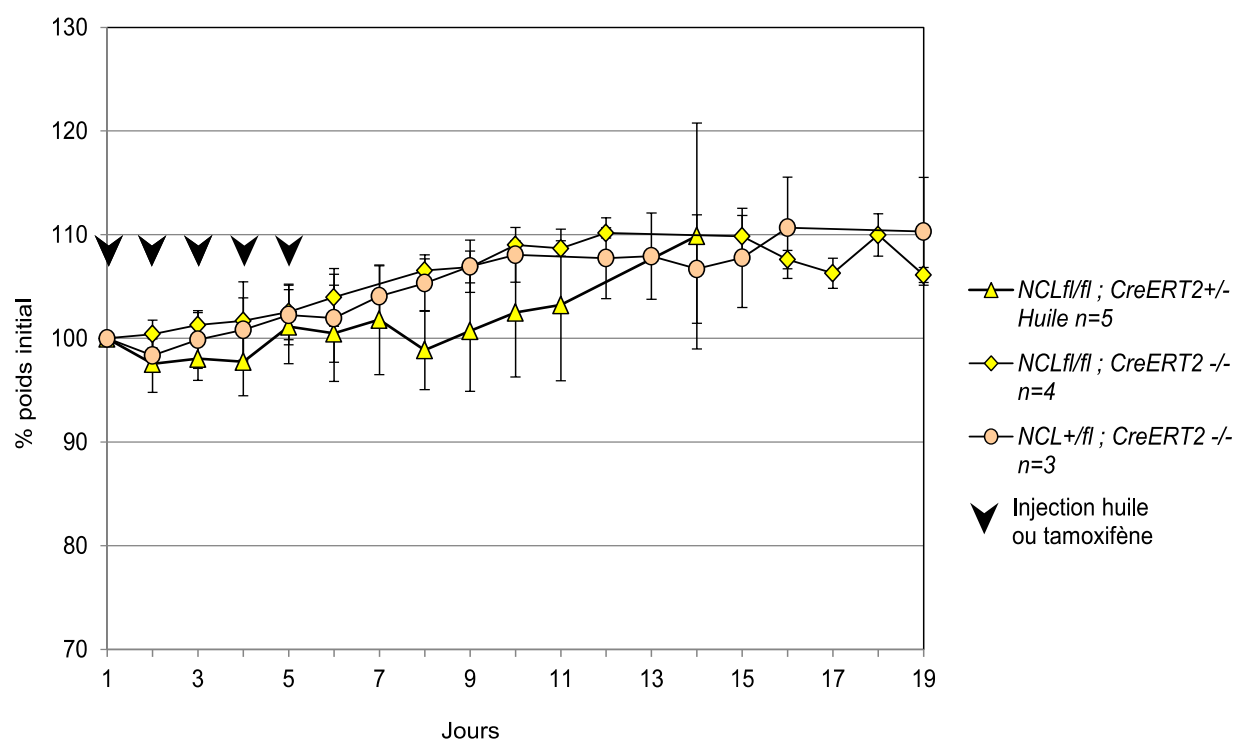
Annexes



Annexe 2 – PCR de géotypage : paramètres et amorces utilisées

Amorce	Séquence 5'- 3'	Dénaturation	Hybridation	Elongation	Nombre de cycles
Nucléoline					
Lf 4783	GGAGTAGTACATAGTGAAACCTTGTCT	95°C	62°C	72°C	35
Er 4784	TCCTCCTCAGCCACACTCTTGGC	30 sec	30 sec	2 min	
Ef 4785	GGGTACTGCATGTACATTCCCTC	95°C	62°C	72°C	35
Er 4784	TCCTCCTCAGCCACACTCTTGGC	30 sec	30 sec	1 min	
Lf 4788	TTCCTTCCTTCCTTCCTTCCTTCTGC	95°C	62°C	72°C	34
Lr 4789	ACCCTGAAATAAGGAGACATGGCTTTC	30 sec	30 sec	1 min	
Lf 4786	CTTCCTTCCTTCTGCAAGACAGTCG	95°C	62°C	72°C	34
Lxr 4787	CATACATTATACGAAGTTATCTGCAGGTC	30 sec	30 sec	1 min	
Nestin-Cre					
Cre 531	CGATGCAACGAGTGATGAGG	95°C 30 sec	58°C 30 sec	72°C 1 min	35
Cre 819	GCATTGCTGTCACTTGGTCGT				
CD8 S	GGTGCATTCTCACTCTGAGTTCC				
CD8AS	GCAGACAGAGCTGATTTCTATGTG				
Rosa-CreER ^{T2}					
R26F2	AAA-GTC-GCT-CTG-AGT-TGT-TAT	95°C 20 sec	62°C 15 sec	72°C 30 sec	35
R26R	GGA-GCG-GGA-GAA-ATG-GAT-ATG				
CreER	CCT-GAT-CCT-GGC-AAT-TTC-G				

Annexe 3 - Evolution du poids des souris des sous-groupes contrôles après injection de tamoxifène ou d'huile



Annexe 4 - Génotypes possibles des embryons pour un croisement $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$ x $Ncl^{+/+}$ et fréquence de chaque génotype selon si la délétion est présente ou non dans les gamètes.

Les génotypes écrits sont ceux du zygote avant toute action de la recombinaison au cours du développement. Si 100 % des gamètes qui ont l'allèle flox sont délétés, certains génotypes ne sont pas obtenus, ces derniers sont indiqués par des astérisques.

Parent 1		$Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$					
Parent 2	Gamètes potentiellement produits	Ncl^{+} $Nestin-Cre^{-}$	Ncl^{+} $Nestin-Cre^{+}$	Ncl^{fl} $Nestin-Cre^{-}$	Ncl^{fl} $Nestin-Cre^{+}$	Ncl^{Δ} $Nestin-Cre^{-}$	Ncl^{Δ} $Nestin-Cre^{+}$
$Ncl^{+/+}$	Ncl^{+}	$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/-}$
	% embryons si Δ absent des gamètes	25 %	25 %	25 %	25 %	0 %	0 %
	% embryons si Δ présent dans les gamètes	25 %	25 %	0 – 25 % *	0 – 25 % *	0 – 25 %	0 – 25 %

Annexe 5 - Génotypes possibles des embryons pour un croisement $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$ x $Ncl^{fl/fl}$ et fréquence de chacun des génotypes selon si la délétion est présente ou non dans les gamètes.

Les génotypes écrits sont ceux du zygote avant toute action de la recombinaison au cours du développement. Si 100 % des gamètes qui ont l'allèle flox sont délétés, certains génotypes ne sont pas obtenus, ces derniers sont indiqués par des astérisques.

Parent 1		$Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$					
Parent 2	Gamètes potentiellement produits	Ncl^{+} ; $Nestin-Cre^{-}$	Ncl^{+} ; $Nestin-Cre^{+}$	Ncl^{fl} ; $Nestin-Cre^{-}$	Ncl^{fl} ; $Nestin-Cre^{+}$	Ncl^{Δ} ; $Nestin-Cre^{-}$	Ncl^{Δ} ; $Nestin-Cre^{+}$
$Ncl^{fl/fl}$	Ncl^{fl}	$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	$Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/-}$
	% embryons si Δ absent des gamètes	25 %	25 %	25 %	25 %	0 %	0 %
	% embryons si Δ présent dans les gamètes	25 %	25 %	0 - 25 % *	0 - 25 % *	0 - 25 %	0 - 25 %

Annexe 6 - Répartition des génotypes possibles pour les embryons théorique pour un croisement $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$ x $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$ et fréquence de chaque embryon

(A) Les génotypes écrits sont ceux du zygote avant toute action de la recombinaison au cours du développement. (B) Fréquence de chaque génotype possible. Si 100 % des gamètes qui ont l'allèle flox sont délétés, certains génotypes ne sont pas obtenus, ces derniers sont indiqués par des astérisques

A

Parent 1		$Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$					
Parent 2	Gamètes potentiellement produits	Ncl^{+} ; $Nestin-Cre^{-}$	Ncl^{+} ; $Nestin-Cre^{+}$	Ncl^{fl} ; $Nestin-Cre^{-}$	Ncl^{fl} ; $Nestin-Cre^{+}$	Ncl^{Δ} ; $Nestin-Cre^{-}$	Ncl^{Δ} ; $Nestin-Cre^{+}$
$Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	Ncl^{+} ; $Nestin-Cre^{-}$	$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/-}$
	Ncl^{+} ; $Nestin-Cre^{+}$	$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre^{+/+}$	$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{+/+}$	$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/+}$
	Ncl^{fl} ; $Nestin-Cre^{-}$	$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	$Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/-}$
	Ncl^{fl} ; $Nestin-Cre^{+}$	$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{+/+}$	$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{+/+}$	$Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/+}$
	Ncl^{Δ} ; $Nestin-Cre^{-}$	$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	$Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{Δ/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	$Ncl^{Δ/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/-}$
	Ncl^{Δ} ; $Nestin-Cre^{+}$	$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/+}$	$Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/+}$	$Ncl^{Δ/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{Δ/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/+}$

B

Génotypes	% embryons si Δ absent des gamètes	% embryons si Δ présent dans les gamètes
$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	6,25 %	6,25 %
$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	18,75 %	18,75 %
$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre^{+/+}$		
$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	12,5 %	0 - 12,5 % *
$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	37,5 %	0 - 37,5 % *
$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{+/+}$		
$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	0 %	0 - 12,5 %
$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/-}$		0 - 37,5 %
$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/+}$		
$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	6,25 %	0 - 6,25 % *
$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	18,75 %	0 - 18,75 % *
$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{+/+}$		
$Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	0 %	0 - 12,5 % *
$Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/-}$		0 - 37,5 % *
$Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/+}$		
$Ncl^{Δ/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$		0 - 6,25 %
$Ncl^{Δ/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/-}$		0 - 18,75 %
$Ncl^{Δ/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/+}$		
	100%	

Annexe 7 - Répartition des génotypes obtenus lors de croisements $Ncl^{fl/fl}$ x $Nestin-Cre(FT)^{+/-}$

Génotypes obtenus	Croisement : $NCL^{fl/fl}$ x $Nestin-Cre(FT)^{+/-}$	
	Nombre de naissances	%
$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	43	42%
$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre(FT)^{+/-}$	2	2%
$Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre(FT)^{+/-}$	57	56%
Total	102	100%

Annexe 8 - Répartition des génotypes possibles des embryons pour un croisement $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre(FT)^{+/-}$ x $Ncl^{+/fl}$ et fréquence pour un chaque génotype.

A

(A) Les génotypes écrits sont ceux du zygote avant toute action de la recombinaison au cours du développement. (B) Fréquence de chaque génotype possible. Si 100 % des gamètes qui ont l'allèle flox sont délétés, certains génotypes ne sont pas obtenus, ces derniers sont indiqués par des astérisques

Parent 1		$Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre^{+/-}$					
Parent 2	Gamètes potentiellement produits	Ncl^{+} ; $Nestin-Cre^{-}$	Ncl^{+} ; $Nestin-Cre^{+}$	Ncl^{fl} ; $Nestin-Cre^{-}$	Ncl^{fl} ; $Nestin-Cre^{+}$	Ncl^{Δ} ; $Nestin-Cre^{-}$	Ncl^{Δ} ; $Nestin-Cre^{+}$
$Ncl^{+/fl}$	Ncl^{+}	$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/-}$
	Ncl^{fl}	$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	$Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	$Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/-}$

B

Génotype	% embryons si Δ absent des gamètes	% embryons si Δ présent dans les gamètes
$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	12,5 %	12,5 %
$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	12,5 %	12,5 %
$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	25 %	0 – 12,5 %
$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	25 %	0 – 12,5 %
$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	0 %	0 – 12,5 %
$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	0 %	0 – 12,5 %
$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	12,5 %	0 – 12,5 % *
$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	12,5 %	0 – 12,5 % *
$Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{-/-}$	0 %	0 – 12,5 %
$Ncl^{fl/Δ}$; $Nestin-Cre^{+/-}$	0 %	0 – 12,5 %
	100%	

Annexe 9 - Répartition des génotypes obtenus lors de croisements $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre(FT)^{+/-}$ x $Ncl^{+/fl}$

Génotypes obtenus	Croisement $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre(FT)^{+/-}$ x $Ncl^{+/fl}$	
	Nombre total de naissances	%
$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	29	14%
$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre(FT)^{+/-}$	28	13%
$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	54	25%
$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre(FT)^{+/-}$	2	1%
$Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre(FT)^{+/-}$	55	26%
$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	3	1%
$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre(FT)^{+/-}$	6	3%
$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	23	11%
$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cr(FT)^{+/-}$	0	0%
$Ncl^{fl/\Delta}$; $Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	2	1%
$Ncl^{fl/\Delta}$; $Nestin-Cre(FT)^{+/-}$	11	5%
	213	100%

Annexe 10 - Répartition des génotypes obtenus lors de croisements $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre(FT)^{+/-}$ x $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre(FT)^{+/-}$.

Génotypes	Croisement $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre(FT)^{+/-}$ x $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre(FT)^{+/-}$	
	Naissances	
	Nombre total	%
$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	0	0%
$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre(FT)^{+}$	5	23%
$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	1	5%
$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre(FT)^{+}$	0	0%
$Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre(FT)^{+}$	12	55%
$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	0	0%
$Ncl^{+/Δ}$; $Nestin-Cre(FT)^{+}$	2	9%
$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	0	0%
$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre(FT)^{+}$	0	0%
$Ncl^{fl/\Delta}$; $Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	1	5%
$Ncl^{fl/\Delta}$; $Nestin-Cre(FT)^{+}$	1	5%
$Ncl^{Δ/Δ}$; $Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	0	0%
$Ncl^{Δ/Δ}$; $Nestin-Cre(FT)^{+}$	0	0%
	22	100%

Annexe 11 - Répartition des génotypes et nombre de mort-nés obtenus lors de croisements $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre(FT)^{+/-}$ x $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre(FT)^{+/-}$

Génotypes	Croisement $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre(FT)^{+/-}$ x $Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre(FT)^{+/-}$			
	Nombre de naissances		% mort-nés par rapport au nombre total de naissances	% mort-nés pour chaque génotype
	Total	dont mort-nés		
$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	0	0	0%	0%
$Ncl^{+/+}$; $Nestin-Cre(FT)^{+}$	5	0	0%	0%
$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	1	0	0%	0%
$Ncl^{+/fl}$; $Nestin-Cre(FT)^{+}$	0	0	0%	0%
$Ncl^{+/fl/\Delta}$; $Nestin-Cre(FT)^{+}$	12	2	9%	17%
$Ncl^{+/A}$; $Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	0	0	0%	0%
$Ncl^{+/A}$; $Nestin-Cre(FT)^{+}$	2	2	9%	100%
$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	0	0	0%	0%
$Ncl^{fl/fl}$; $Nestin-Cre(FT)^{+}$	0	0	0%	0%
$Ncl^{fl/\Delta}$; $Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	1	1	5%	100%
$Ncl^{fl/\Delta}$; $Nestin-Cre(FT)^{+}$	1	1	5%	100%
$Ncl^{A/A}$; $Nestin-Cre(FT)^{-/-}$	0	0	0%	0%
$Ncl^{A/A}$; $Nestin-Cre(FT)^{+}$	0	0	0%	0%
	22	6	27%	

ETUDE FONCTIONNELLE DE LA NUCLEOLINE CHEZ LA SOURIS
Mise en place et caractérisation d'un modèle Knock-Out conditionnel

Hélène Delage

Résumé

La nucléoline (NCL) est une protéine ubiquitaire (noyau, nucléole, cytoplasme, membrane cellulaire), impliquée dans de nombreux processus cellulaires (transcription d'ADNr, biogenèse des ribosomes, maturation des ARNr, métabolisme des ARNm, *etc.*). L'inhibition expérimentale de l'expression de NCL entraîne l'arrêt de la prolifération et la mort cellulaire par apoptose.

Bien que NCL soit largement étudiée au niveau fondamental et pour son implication dans de nombreuses pathologies (cancers, infections virales, syndromes neurodégénératifs), de très nombreuses questions restent en suspens. Le laboratoire a initié la création du premier modèle murin d'inactivation conditionnelle de *Ncl*. La présente étude vise à caractériser les effets de l'inactivation du *Ncl* par une stratégie *Cre/loxP*, chez l'adulte et au cours du développement.

Une délétion dans les deux allèles du gène *Ncl*, induite de manière quasi ubiquitaire chez des souris adultes à l'aide d'une recombinaison *Cre* activable, entraîne chez les souris, une diminution de l'expression de *Ncl* dans la plupart de leurs organes, une perte de poids très importante et une mort rapide. Nous n'avons pas pu déterminer le(s) mécanisme(s) menant à la mort. Par ailleurs, l'état hétérozygote induit chez l'adulte, semble dans nos conditions expérimentales, viable. Ces résultats indiquent un besoin différentiel de NCL au cours du développement et à l'âge adulte.

Nous avons aussi étudié le rôle de NCL dans le développement en invalidant *Ncl* grâce au transgène *Nestin-Cre* exprimé fortement dans le système nerveux central. Il apparaît que seules les souris porteuses de la délétion à l'état mosaïque ($Ncl^{+/fl\Delta}$) sont viables, tout en présentant une hypoplasie du cervelet et des défauts comportementaux sérieux. La transmission de Ncl^{Δ} via la lignée germinale est rare. Les souris mutantes hétérozygotes se développent *in utero* mais meurent de façon périnatale. Les souris KO dans le système nerveux central se développent mais sont anencéphaliques et mort-nées.

En conclusion, *Ncl* est vital chez l'adulte comme au cours du développement puisqu'aucun mutant $Ncl^{\Delta/\Delta}$ n'a été observé. Si les adultes survivent avec un seul allèle fonctionnel, cet état d'haploinsuffisance entraîne de sérieux troubles du développement.

Mots-clés : Nucléoline, modèle murin, KO conditionnel, *Cre/loxP*, nestin, tamoxifène, système nerveux central