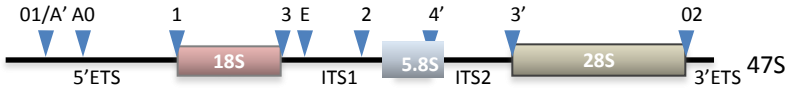
Dynamique fonctionnelle du Noyau et Transport des ARN (P.E. Gleizes)
Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote

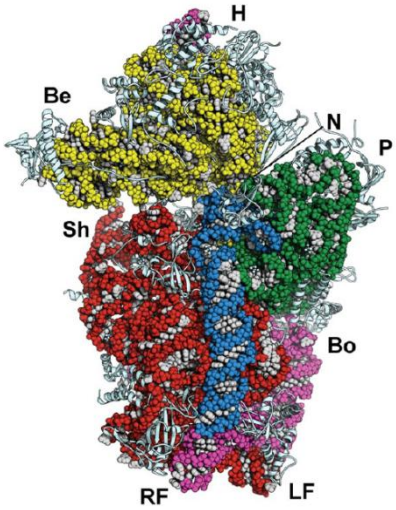
Week-end des familles de l'AFMBD : l'étude ARNAB - quoi de neuf en 2013?

En collaboration avec T. Leblanc and L. Da Costa, Hôpital Robert Debré, Paris)

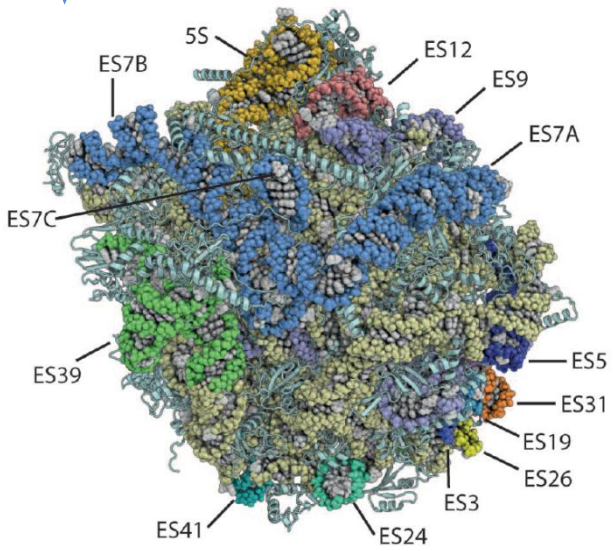
La production des 2 sous-unités du ribosome est un processus très complexe



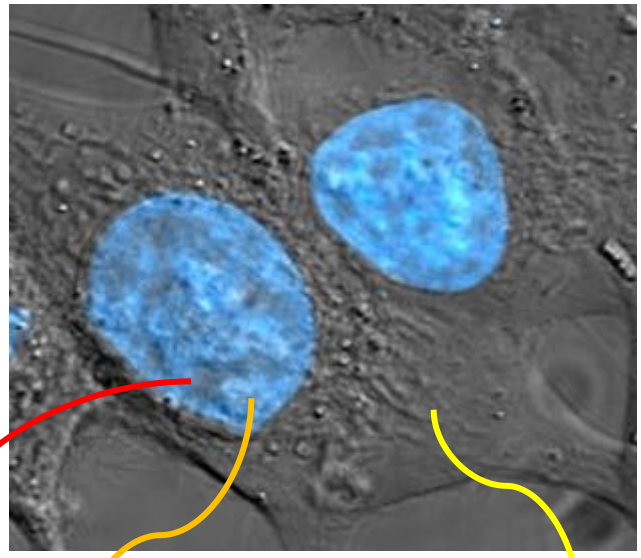
79 protéines ribosomiques (RPS, RPL)
>200 facteurs pré-ribosomiques
+ snoRNPs



petite sous-unité
(ARN 18S + 33 RPS)



grande sous-unité
(ARN 5S, 5.8S, 28S + 46 RPL)



noyau

cytoplasme

pré-60S

90S

32S,
12S

5.8S
+28S
+5S

5.8S+28S+5S

60S

45S, 41S,
30S?

pré-40S

30S, 21S, 18S-E

18S-E

18S

40S

Etude des mécanismes moléculaires de l'ADB (ARNAB)

En collaboration avec T. Leblanc and L. Da Costa, Hôpital Robert Debré, Paris)

La question

- Est-il possible de mettre au point un test diagnostic?
(- Peut-on "prédire" la mutation à partir d'un échantillon de sang?)

Les échantillons de sang

Lot n°1 (partie déjà réalisée)

- 35 patients: 8 rps19$^{+/-}$, 6 rps26+/-, 3 rpl5+/-, 3 rpl11+/-
- 99 échantillons contrôles

Lot n°2 (vos prélèvements; analyse en cours)

- 28 patients (dont 10 avec leurs parents)
- 17 parents
- 37 échantillons contrôles

Etude des mécanismes moléculaires de l'ADB (ARNAB)

En collaboration avec T. Leblanc and L. Da Costa, Hôpital Robert Debré, Paris)

La question

- Est-il possible de mettre au point un test diagnostic?
- Peut-on "prédire" la maladie/la mutation à partir d'un échantillon de sang?

Plusieurs cas

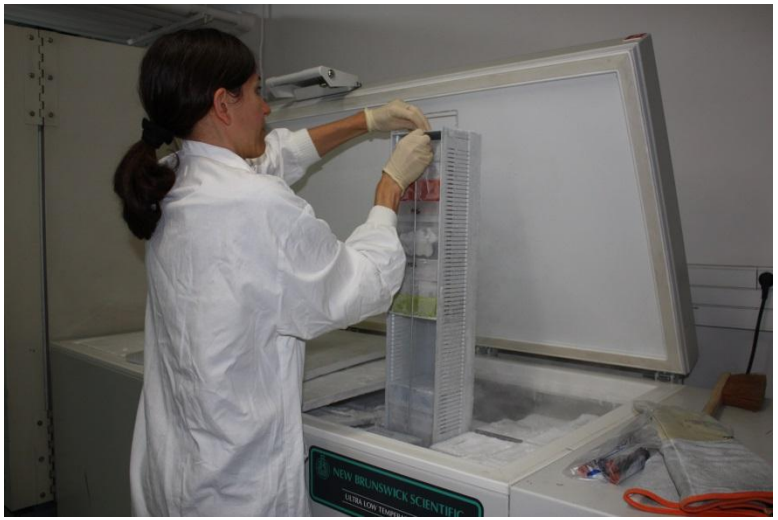
- Le gène muté est connu
- Le gène muté reste à déterminer
- S'agit-il d'un patient ADB (patient + parents + fratrie)?

Que sont devenus les prélèvements de l'an passé?

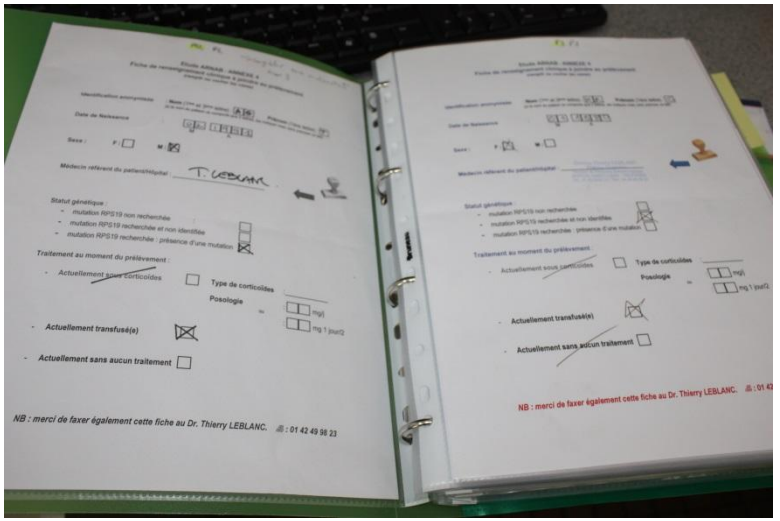
Les préparatifs: les échantillons arrivent au laboratoire par Chronopost

1- Les tubes sont congelés à -20°C

2- Ils sont transférés et stockés à -80°C



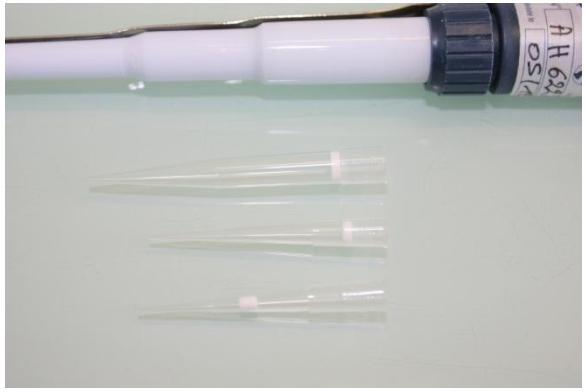
Les fiches et les consentements sont répertoriées

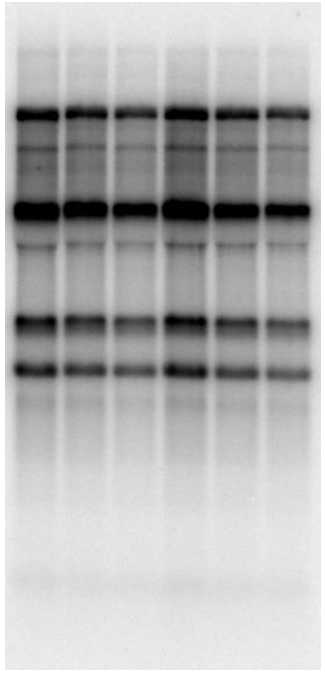


3- Et maintenant, on attend...
… d'avoir suffisamment d'échantillons

Une expérience test est réalisée

4- Les échantillons et les réactifs sont préservés de la contamination

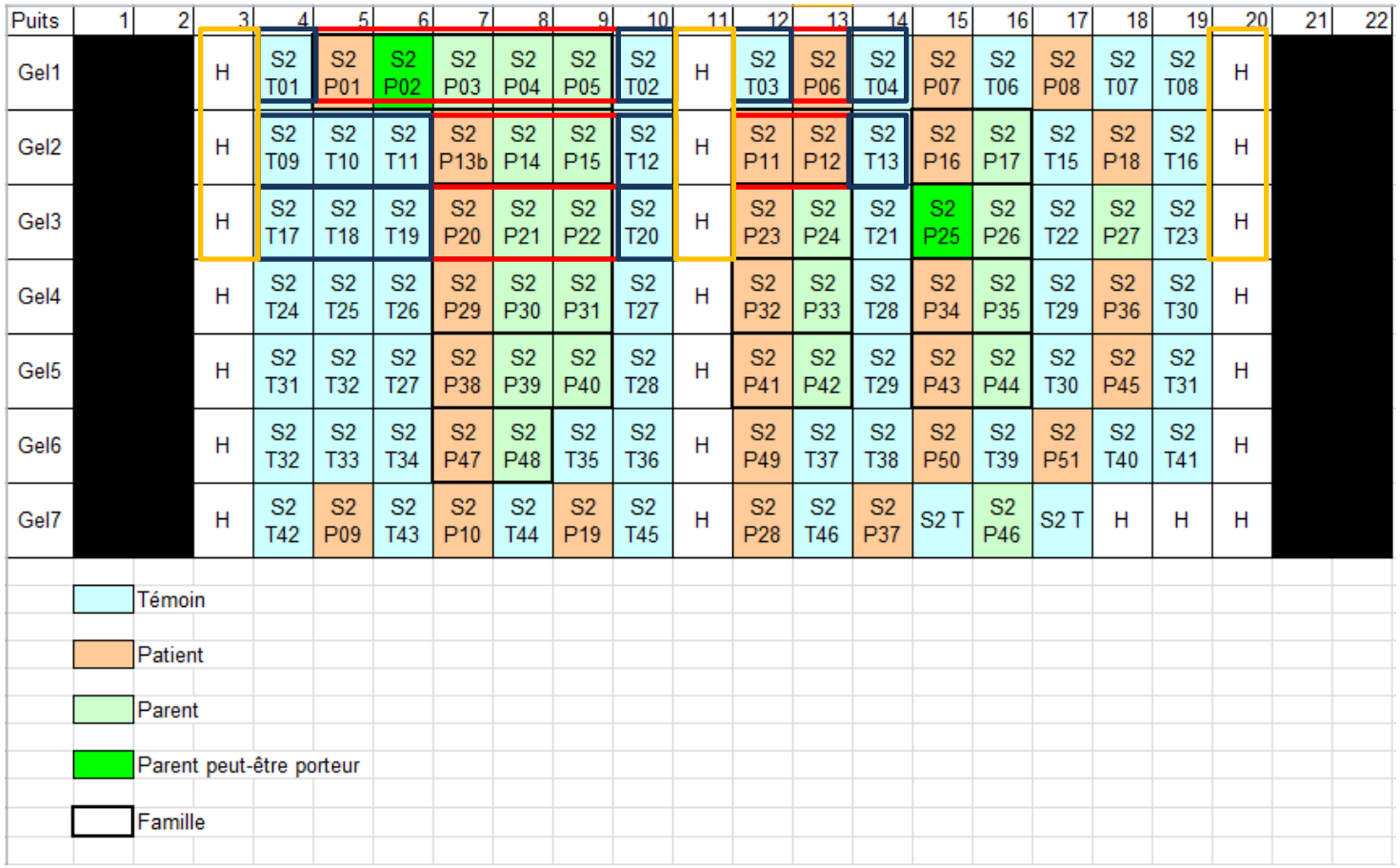




6- Des ARN extraits de cellules humaines en culture sont analysés

5- La qualité de tous les réactifs est contrôlée sur des échantillons de sang « témoin »

Enfin, l'analyse des échantillons est planifiée…



Puits	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
Gel1			H	S2 T01	S2 P01	S2 P02	S2 P03	S2 P04	S2 P05	S2 T02	H	S2 T03	S2 P06	S2 T04	S2 P07	S2 T06	S2 P08	S2 T07	S2 T08	H		
Gel2			H	S2 T09	S2 T10	S2 T11	S2 P13b	S2 P14	S2 P15	S2 T12	H	S2 P11	S2 P12	S2 T13	S2 P16	S2 P17	S2 T15	S2 P18	S2 T16	H		
Gel3			H	S2 T17	S2 T18	S2 T19	S2 P20	S2 P21	S2 P22	S2 T20	H	S2 P23	S2 P24	S2 T21	S2 P25	S2 P26	S2 T22	S2 P27	S2 T23	H		
Gel4			H	S2 T24	S2 T25	S2 T26	S2 P29	S2 P30	S2 P31	S2 T27	H	S2 P32	S2 P33	S2 T28	S2 P34	S2 P35	S2 T29	S2 P36	S2 T30	H		
Gel5			H	S2 T31	S2 T32	S2 T27	S2 P38	S2 P39	S2 P40	S2 T28	H	S2 P41	S2 P42	S2 T29	S2 P43	S2 P44	S2 T30	S2 P45	S2 T31	H		
Gel6			H	S2 T32	S2 T33	S2 T34	S2 P47	S2 P48	S2 T35	S2 T36	H	S2 P49	S2 T37	S2 T38	S2 P50	S2 T39	S2 P51	S2 T40	S2 T41	H		
Gel7			H	S2 T42	S2 P09	S2 T43	S2 P10	S2 T44	S2 P19	S2 T45	H	S2 P28	S2 T46	S2 P37	S2 T	S2 P46	S2 T	H	H	H		

Témoin

Patient

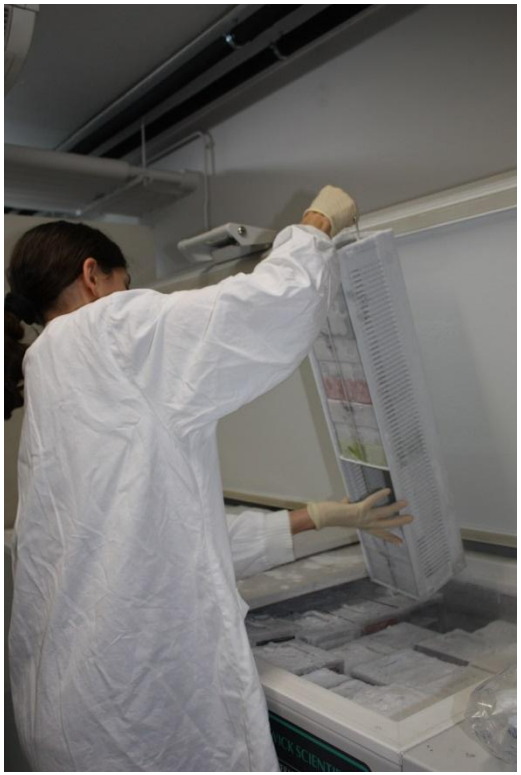
Parent

Parent peut-être porteur

Famille

L’extraction des ARN à partir des tubes de sang peut commencer!

1- Les échantillons sont décongelés (6 par 6)

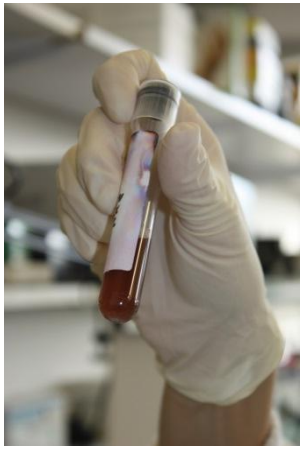


2- Les tubes sont centrifugés

3- Le surnageant est éliminé

4- Les culots sont rincés

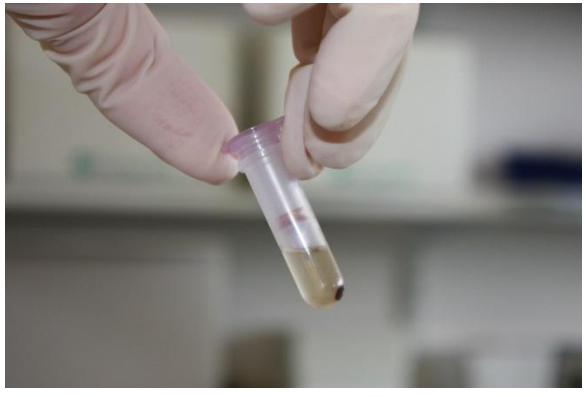
5- Les tubes sont de nouveau centrifugés

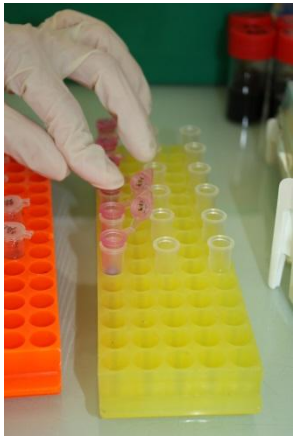


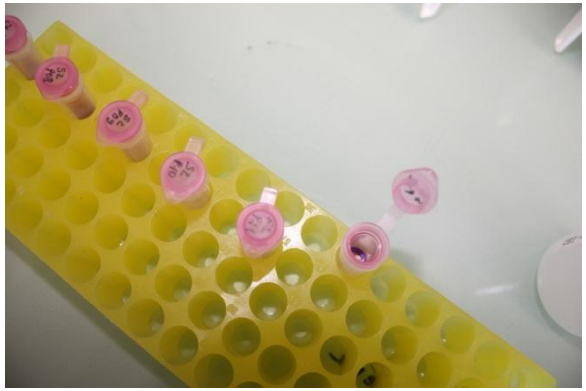
6- Les protéines sont digérées

7- Les extraits sont purifiés sur des colonnes

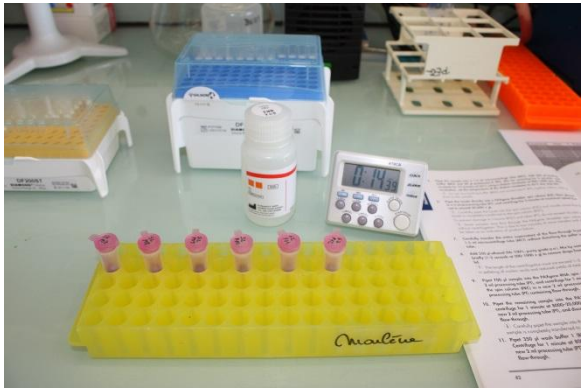
8- Les filtrats sont récupérés et déposés sur de nouvelles colonnes







9- L'ADN est digéré

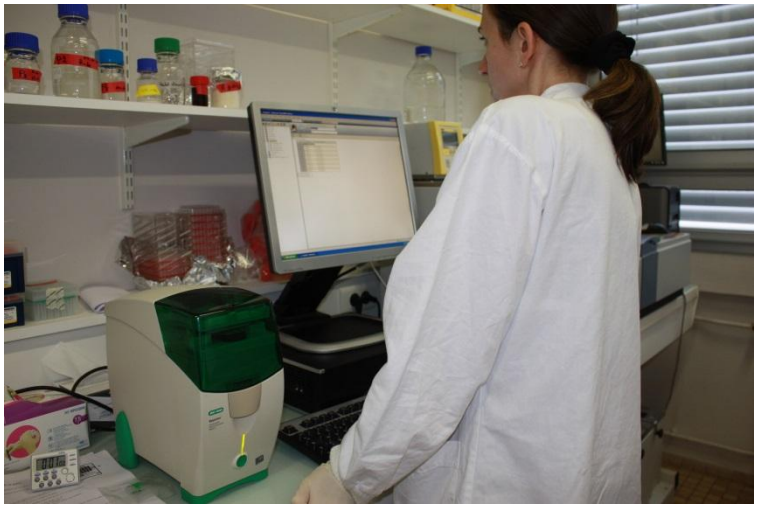


10- Après quelques rinçages, les ARN sont décrochés du support et élués

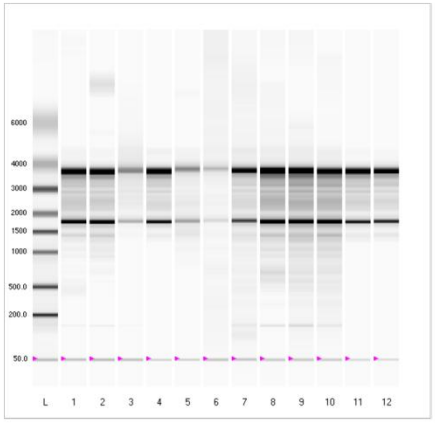
Les ARN totaux sont analysés

1- Les solutions d'ARN sont dénaturées par la chaleur

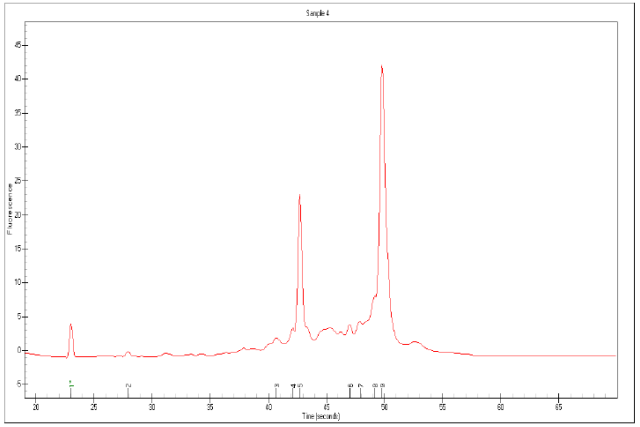
2- Une fraction très faible (1 µl) est utilisée pour mesurer la concentration de la solution



3- Un 2ème contrôle-qualité est réalisé sur une puce



Well# 4 Sample 4



4

Well# 4 Sample 4

Fragment Number	Fragment Name	Start Time	End Time	Area	% of Total Area
1	18S	42.26	43.97	21.04	11.48
2	28S	48.87	51.29	49.49	27.01

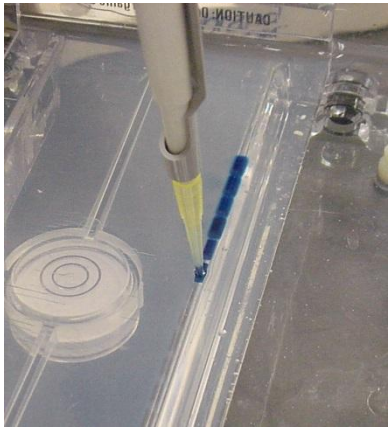
RNA Area: 183.22
RNA Concentration: 117.31 ng/µl
Ratio[28S/18S]: 2.35

RQI: 10.0

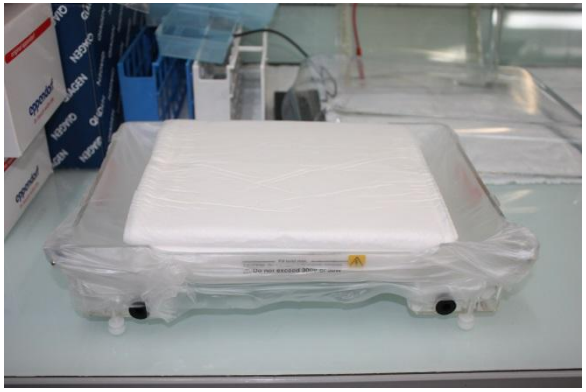
Les ARN pré-ribosomiques sont analysés

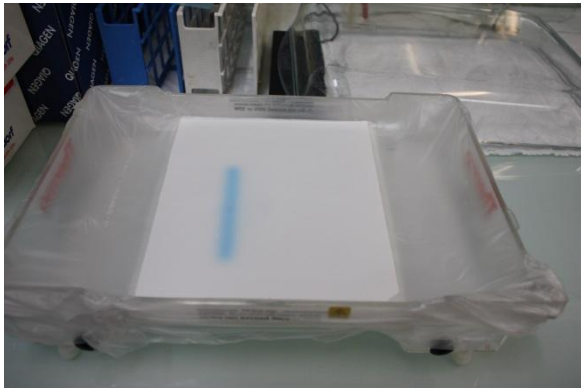
1- Un gel d'agarose est coulé sur un support horizontal

2- Les échantillons d'ARN sont déposés dans les puits



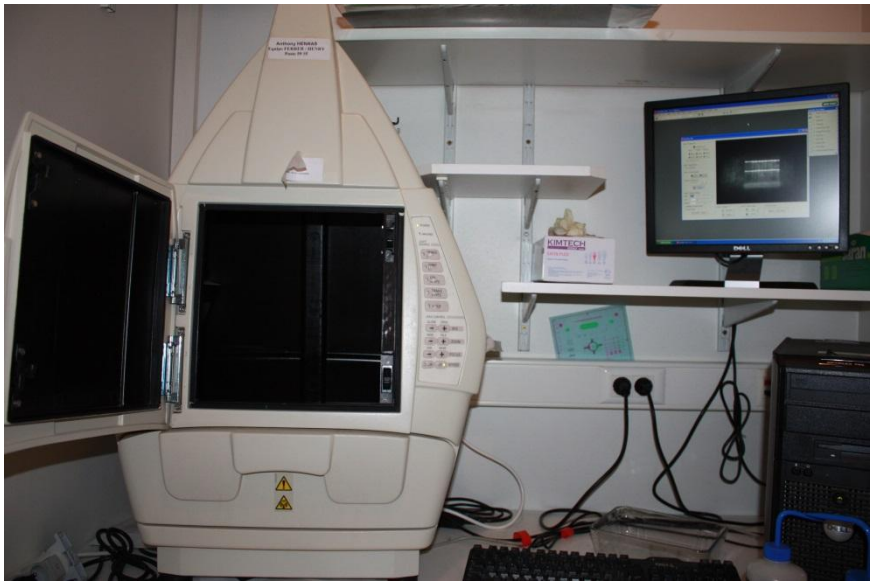
3- Les ARN sont séparés selon leur taille (140 volts, 4 h)





4- Les ARN sont transférés sur une membrane de nylon (1 nuit)

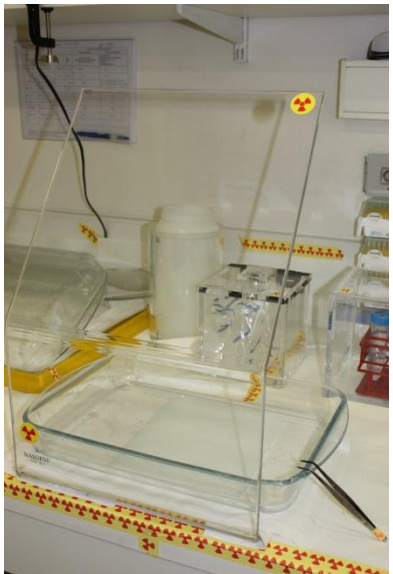
5- Les ARN sont fixés sur la membrane (UV) et celle-ci est photographiée



Les ARN pré-ribosomiques sont révélés

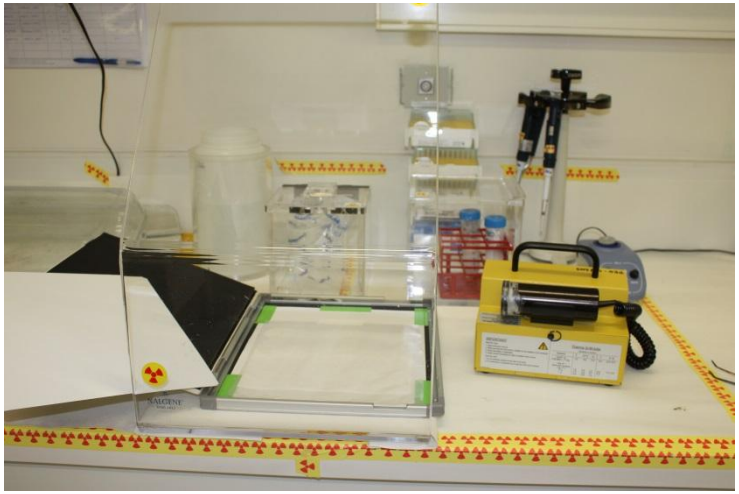
1- Une petite sonde est marquée avec du phosphate radioactif

2- La sonde radioactive est mise en contact avec les ARN liés au nylon (45°C, 1 nuit)



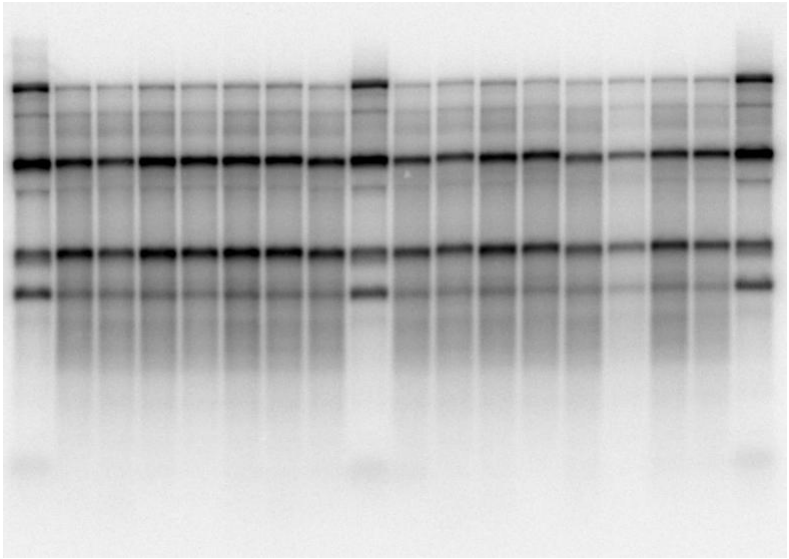
3- La sonde non hybridée est rincée (30 min)

4- La membrane est installée dans une cassette, au contact d'un écran sensible



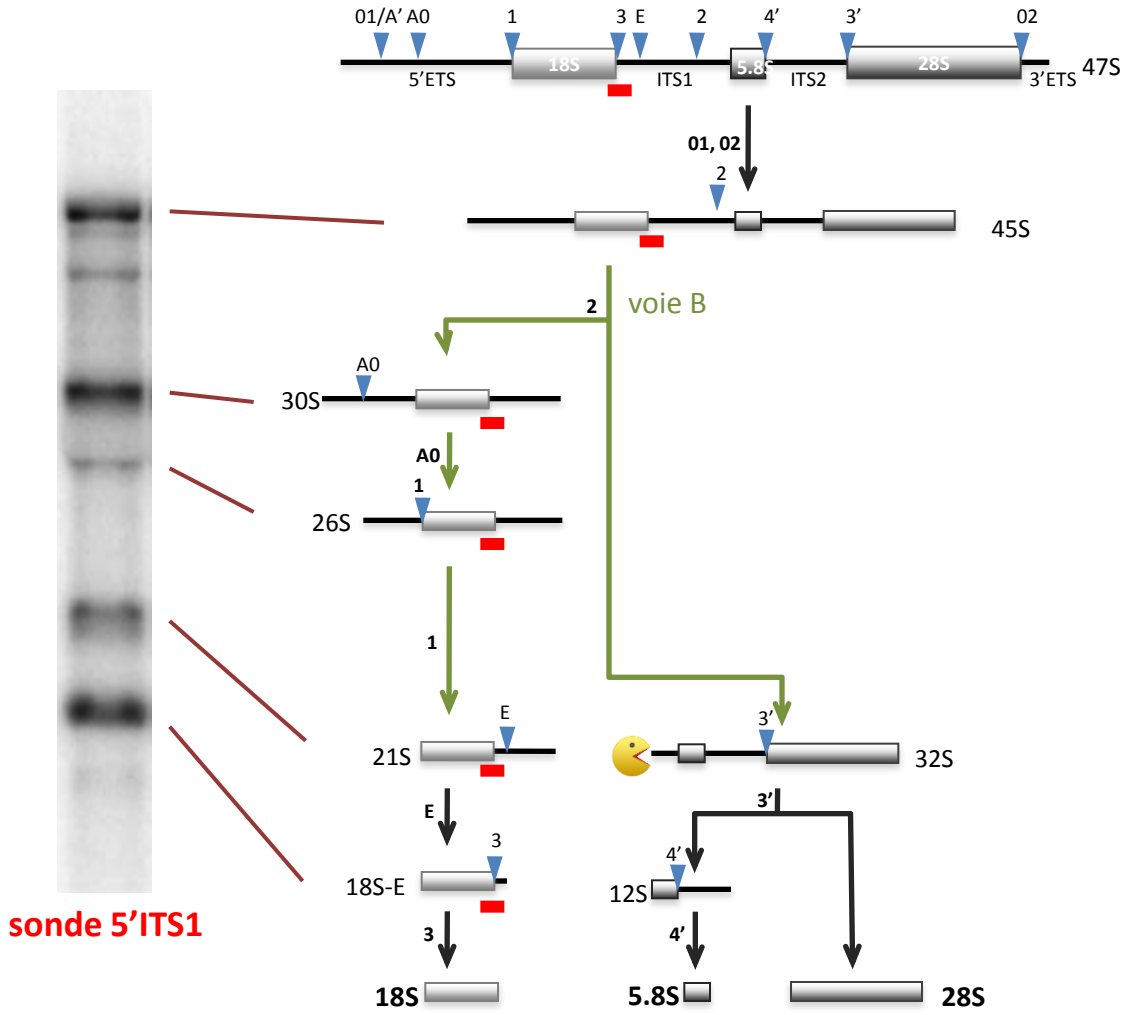
5- L’écran est laissé au contact de la membrane (48 h)

6- L’écran est scanné:
les résultats sont révélés!

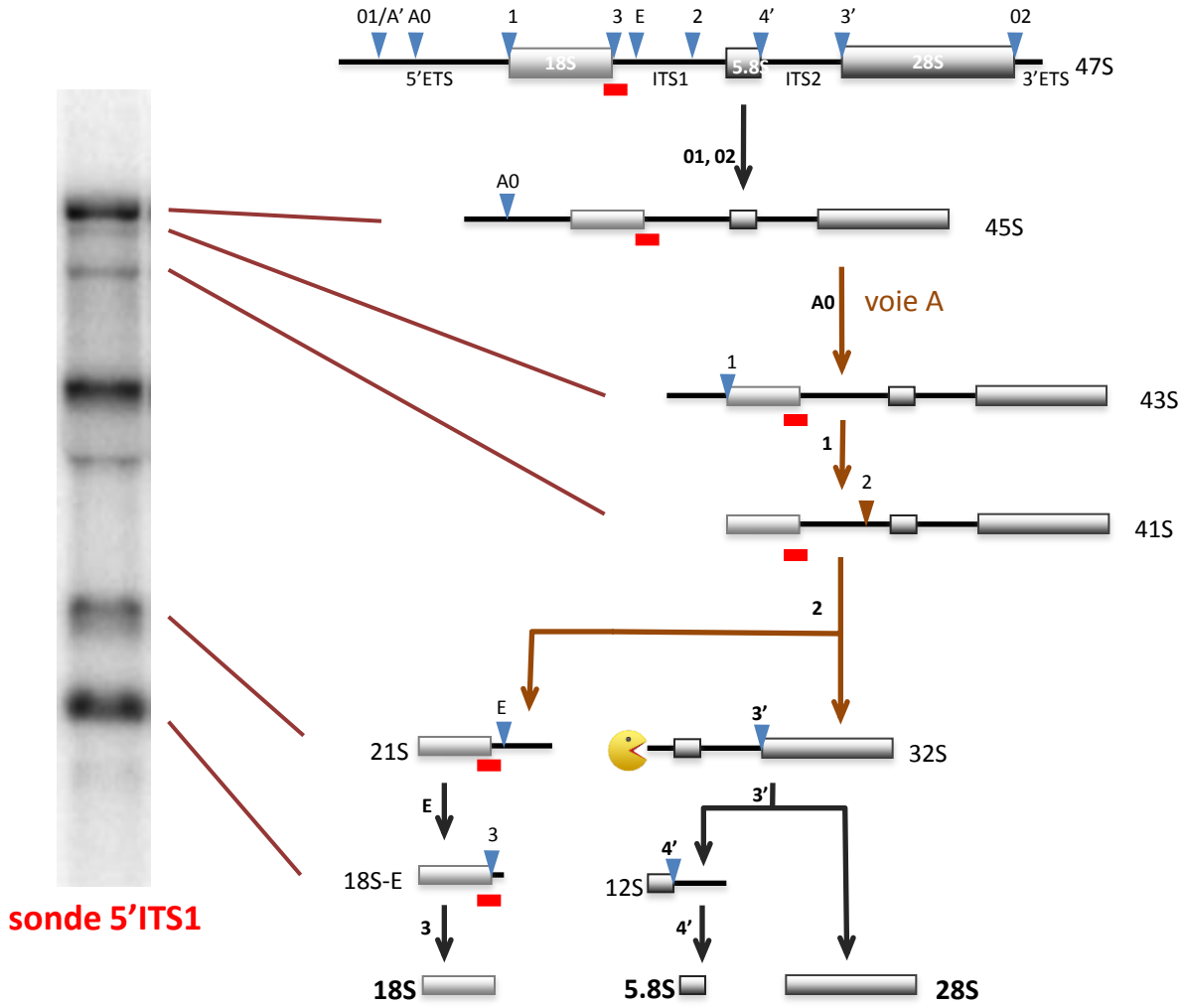


7- la membrane de nylon est déshybridée, puis réhybridée avec 4 autres sondes spécifiques…
l’aventure continue!

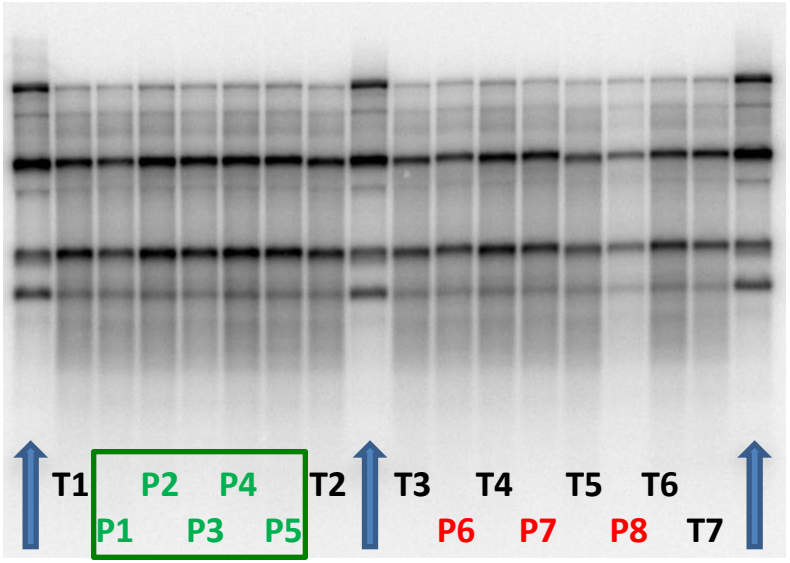
Une bande représente un type de pré-ARN particulier



Une bande représente un type de pré-ARN particulier



Les résultats sont analysés



L'intensité de chaque bande est mesurée

En route pour un test diagnostic… (ARNAB)

En collaboration avec T. Leblanc and L. Da Costa, Hôpital Robert Debré, Paris)

RPS19

Très bonne discrimination avec la sonde 5'-ITS1

RPL5-RPL11

Bonne discrimination avec les sondes 5'-ITS1 et ITS2

Pour la 2ème série d'échantillons

La préparation et l'analyse des échantillons ont été améliorées

La standardisation des membranes a été optimisée

Nous utiliserons 5 sondes (au lieu de 4) pour une meilleure discrimination entre les différentes protéines ribosomiques

Nous espérons avoir tous les résultats début 2014…

Rendez-vous l'an prochain pour la suite!

Nathalie Montel-Lehry

Dynamique fonctionnelle du Noyau et Transport des ARN (P.E. Gleizes)

Deux nouveaux gènes sont impliqués dans l'Anémie de Diamond-Blackfan (ADB)

En collaboration avec le Dr. Hanna Gazda (Boston):

Gazda, **Preti**, Sheen, **O'Donohue**, Vlachos, Davies, Kattamis, Doherty, Landowski, Buros, Ghazvinian, Sieff, Newburger, Niewiadomska, Matysiak, Glader, Atsidaftos, Lipton, **Gleizes**, Beggs (2012) Frameshift mutation in p53 regulator **RPL26** is associated with multiple physical abnormalities and a specific pre-ribosomal RNA processing defect in Diamond-Blackfan anemia. *Human Mutat*. 33, 1037-1044.

Landowski, **O'Donohue**, Buros, Ghazvinian, **Montel-Lehry**, Vlachos, Sieff, Newburger, Niewiadomska, Matysiak, Glader, Atsidaftos, Lipton, **Gleizes**, Beggs, Gazda (2013) Novel deletion of **RPL15** identified by array-comparative genomic hybridization in Diamond-Blackfan anemia. *Human Genet*., sous presse.

1999: RPS19

2006: RPS24

2007: RPS17

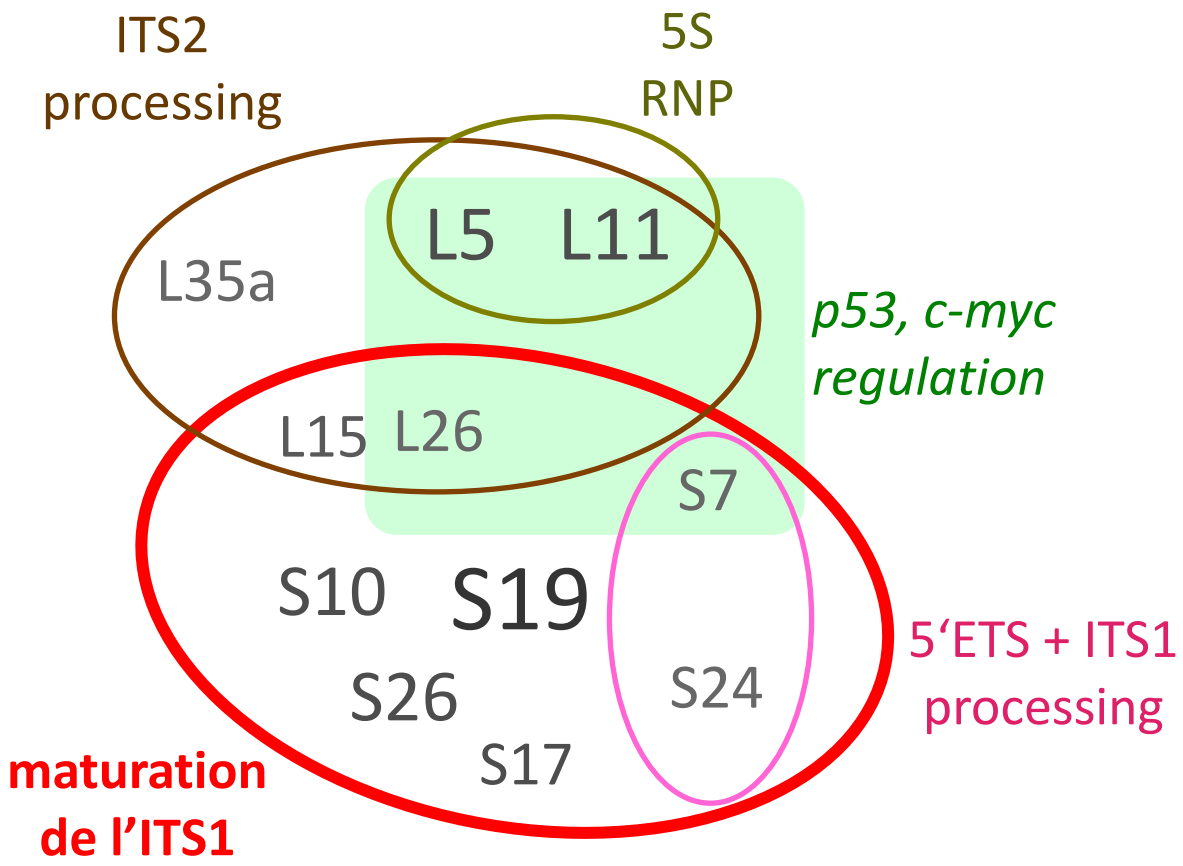
2008: RPL35a, RPL5, RPL11, RPS7

2010: RPS10, RPS26

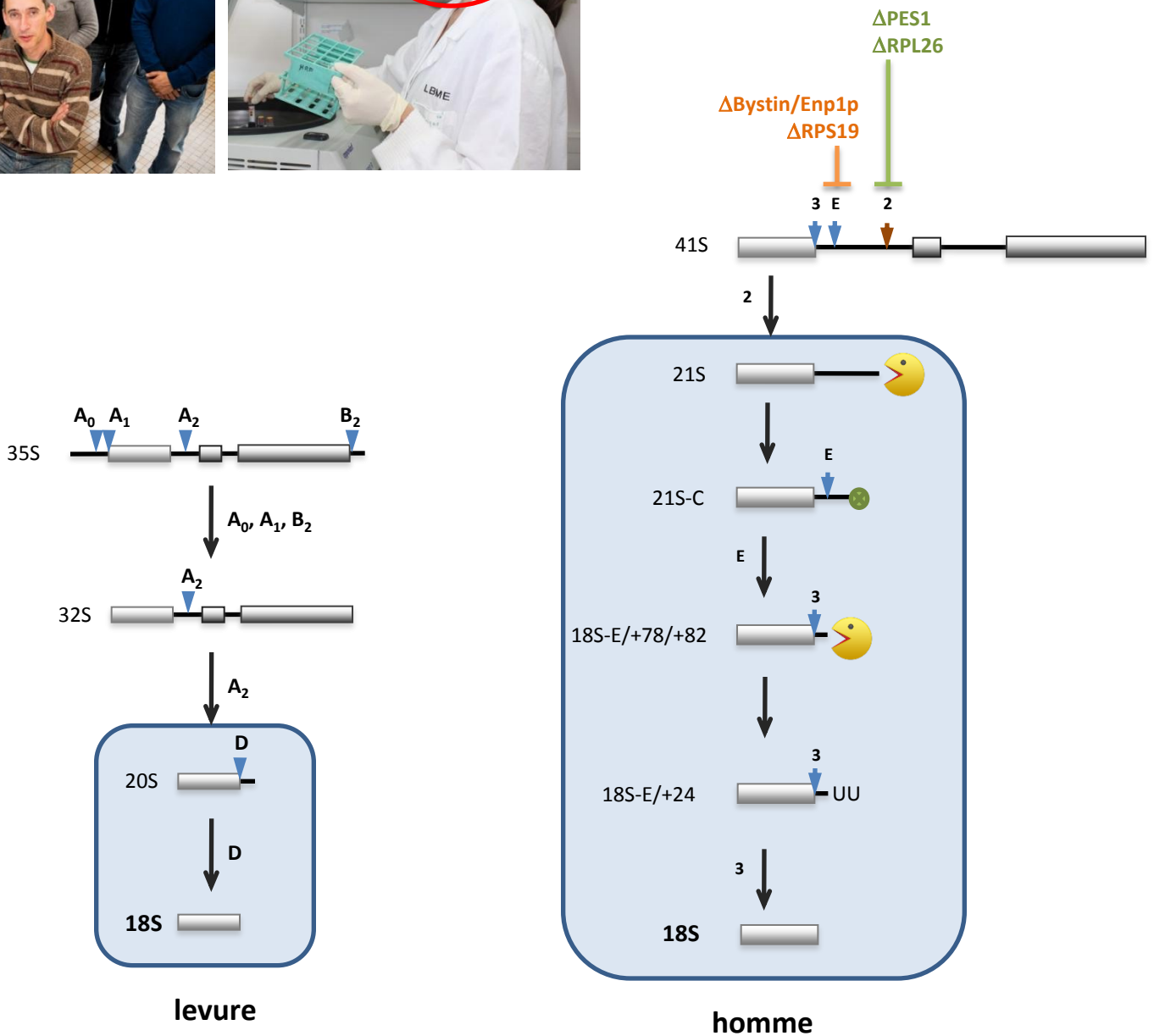
2012: RPL26

2013: RPL15

Les RPS/RPL mutées affectent surtout la maturation de l'ITS1

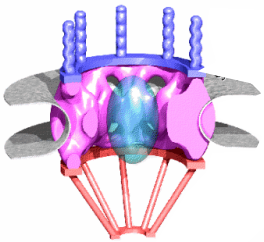


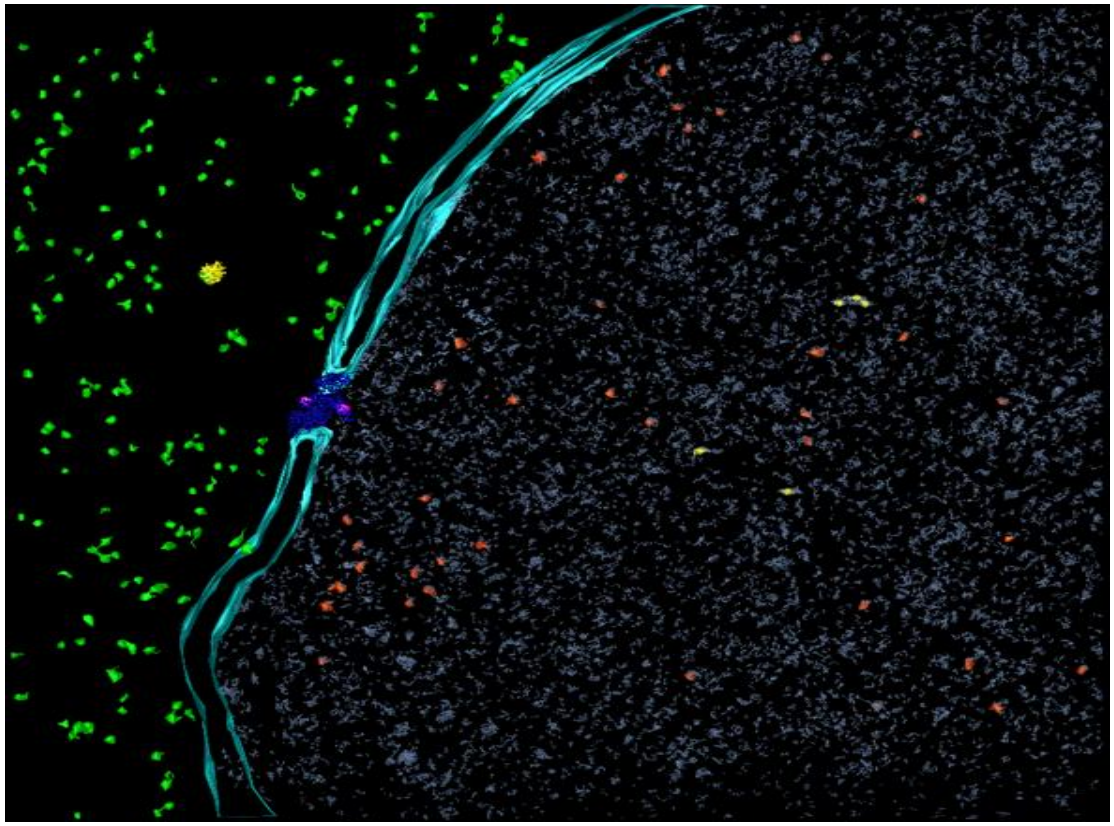
Ulrike Kutay, Christian Montelese
Zurich

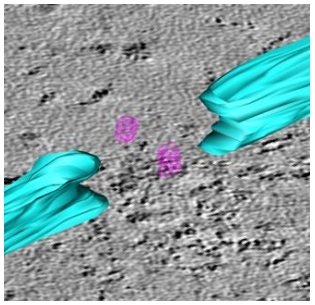


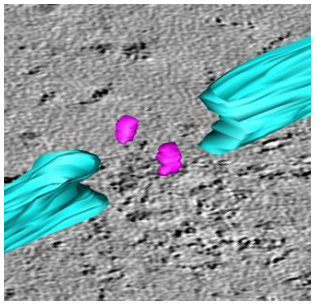
Franck Delavoie, Marlène Faubladier

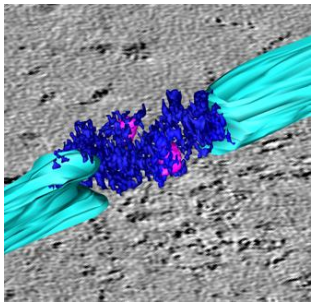
Passage des pré-ribosomes au travers des pores nucléaires





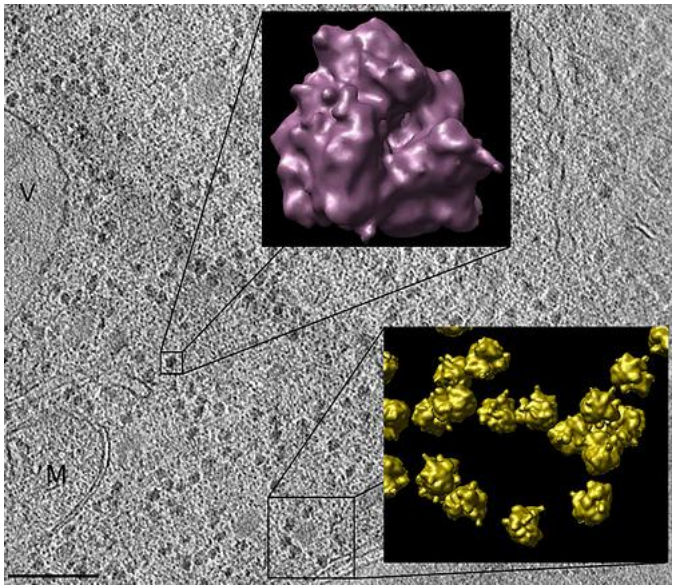




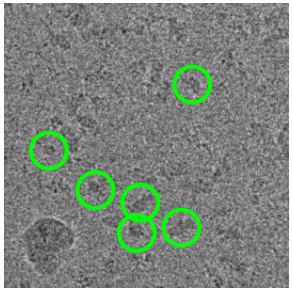


Célia Plisson, Natacha Larburu

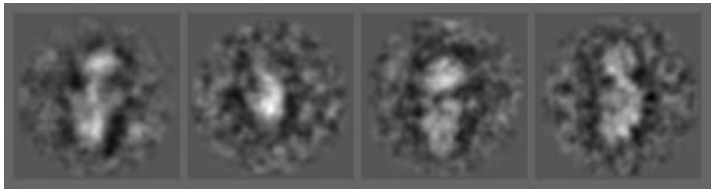
Structure des particules pré-ribosomiques (levure, Homme)



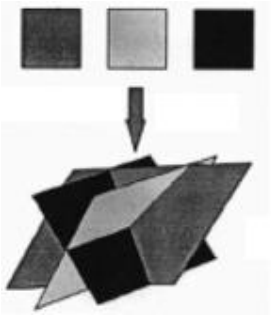
observation de particules pré-ribosomiques dans la glace



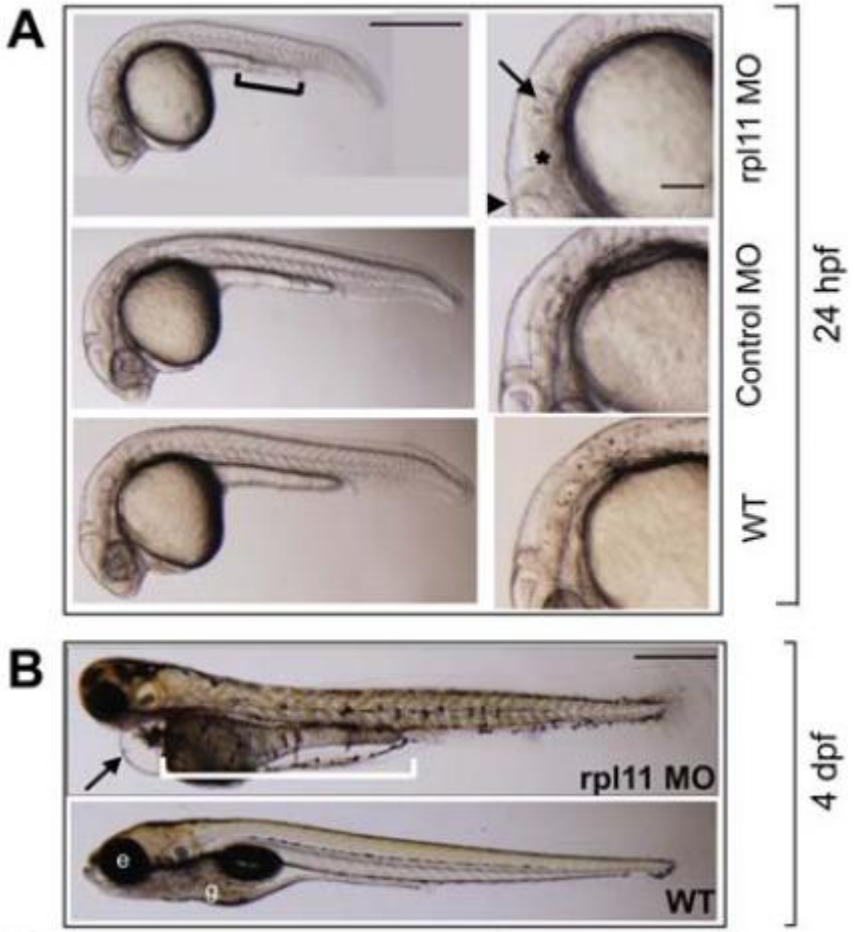
analyse statistique des images



détermination des orientations



structure

Anirban Chakraborty

Fonctionnement des ribosomes dans les cellules de patients/Modèle animal de l'ADB (poisson zèbre)