

Université de Sherbrooke

CLONAGE ET SEQUENCE DU GENE DE LA CHAINE
LEGERE V_K -1A DU MYELOME MOPC-460
DE SOURIS BALB/c.

par

© LINE RICARD

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade
de Maîtrise ès sciences (M.Sc.).

Février 1987.

LIVRES
RARES

Permission has been granted to the National Library of Canada to microfilm this thesis and to lend or sell copies of the film.

The author (copyright owner) has reserved other publication rights, and neither the thesis nor extensive extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her written permission.

L'autorisation a été accordée à la Bibliothèque nationale du Canada de microfilmer cette thèse et de prêter ou de vendre des exemplaires du film.

L'auteur (titulaire du droit d'auteur) se réserve les autres droits de publication; ni la thèse ni de longs extraits de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation écrite.

ISBN 0-315-36165-4

TABLE DES MATIERES

Table des matières	I
Liste des figures et tableaux	IV
Liste des abréviations	VI
Résumé	VII

INTRODUCTION

A. Structure typique des anticorps	1
B. Immunogénétique	3
B1. Arrangement des gènes d'immunoglobuline	3
B2. Réarrangements	6
B3. Association combinatoire	9
B4. Les mutations somatiques	9
B5. Expression des gènes d'immunoglobuline	11
C. A la base du projet	14
C1. Au sujet du myélôme MOPC-460	14
C2. Au sujet de l'idiotype 460	14
C3. Au sujet des gènes V_{K1}	16

MATERIEL ET METHODES

A. Préparation de l'ADN	19
A1. Extraction d'ADN de myélôme, de rate ou de rein	19
A2. Extractions et précipitation à l'éthanol	19
A3. Digestion avec des enzymes de restriction	20
B. Identification des fragments d'ADN	21
B1. Electrophorèse sur gel d'agarose	21

B2. Electroéluion	22
B3. Transfert d'ADN sur filtres	23
B4. Hybridations	24
C. Construction de la bibliothèque dans le phage λ L47.1	25
C1. Préparation des bras de phage λ L47.1	25
C2. Préparation de l'ADN génomique	25
C3. Ligations	26
C4. Préparation des extraits pour encapsidation in vitro	27
C5. Encapsidation in vitro	28
C6. Titrations	29
D. Criblage de la bibliothèque	30
D1. Criblage	30
D2. Purification des clones	31
D3. Extraction d'ADN de phages	31
E. Sous-clônage dans pBR 322	32
E1. Transformations	32
E2. Préparation de plasmide	33
F. Séquences	34
F1. Sous-clônage dans le phage M13	34
F2. Préparation d'ADN simple brin	36
F3. Réaction de synthèse	37
F4. Gel de séquence	38
F5. Lecture et compilation des données	38

RESULTATS	
A. Identification du fragment contenant le gène réarrangé	39
B. Préparation et criblage de la bibliothèque de phages	41
C. Sous-clônage dans le plasmide pBR 322	44
D. Carte de restriction	45
E. Séquences	48
E1. Sous-clônage dans le phage M13	48
E2. Séquence de la région V _{JK5}	50
DISCUSSION	54
CONCLUSION	58
REMERCIEMENTS	59
REFERENCES	60

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1. Structure typique d'un anticorps	2
Figure 2. Arrangement germinale des gènes d'immunoglobulines	5
Figure 3. Séquences de réarrangement et d'expression des gènes d'immunoglobulines	13
Figure 4. Gel de focalisation isoélectrique portant la chaîne légère de MOPC-460	17
Figure 5. Source des fragments utilisés comme sonde	26
Figure 6. Autoradiogramme identifiant le fragment porteur du gène réarrangé de la chaîne légère de MOPC-460	40
Figure 7. Etapes de criblage d'une bibliothèque	43
Figure 8. Gel et hybridation de MLC avec les sondes J_K et 0.88	45
Figure 9. Gel présentant les fragments de restriction de MLC	46
Figure 10. Stratégie de séquence	48
Figure 11. Exemple d'autoradiogramme de gel de séquence	49
Figure 12. Séquence de la région LVJ_{K5} de M-460 traduite	51
Figure 13. Séquence de la région LVJ_{K5} de M-460 comparée à celle de T-105	53
Figure 14. Classement des chaînes légères V_{K1}	55

Tableau 1. Composition des tampons selon les enzymes de restriction	21
Tableau 2. Grandeur des fragments de restriction prévus et obtenus pour MLC	47

LISTE DES ABREVIATIONS

bp	"base pair"
BBP	bleu de bromophénol
BSA	"bovine serum albumine"
C	région constante des gènes et chaînes d'immunoglobuline
CDR	"complementary determining region"
CIAP	"calf intestine alcalin phosphatase"
cM	centiMorgan
cpm	coups par minutes
D	région diversité des gènes et chaînes lourdes
DNP	dinitrophényl
dp	pentadecanucléotide
DTT	dithiothréitol
Fc	fragment cristalisable (région constante)
FR	"framework"
H	gènes et chaînes lourds "heavy"
H3	enzyme de restriction Hind III
Id	idiotype
J	région "joining" des gènes et chaînes d'immunoglobuline
K	Kappa
Kb	kilobase
L	gènes et chaînes légères "light"
L	leader
LLC	"lambda light chain"
MLC	"MOPC light chain"
M-460	MOPC-460
oc	octamère
pfu	"plaque forming units"
rpm	révolutions par minute
SDS	sodium dodécyl sulfate
se	site d'épissage
TNP	trinitrophényl
V	région variable des gènes et chaînes d'immunoglobuline

RESUME

Les gènes de la chaîne légère K se présentent, à l'état germinale, en quatre segments L, V, J et C. Après réarrangement par recombinaison, un des 300 gènes V_K fusionne avec l'un des quatre segments J_K fonctionnels. Une fois réarrangé, ce gène est sujet aux mutations somatiques, c'est-à-dire qu'un mécanisme localisé et propre aux gènes d'immunoglobuline provoque des mutations dans la région VJ. Le nombre des différents fragments, le réarrangement et les mutations somatiques sont des moyens efficaces d'accroître la diversité des anticorps. Pour apporter plus amples informations sur ces moyens de diversification, la caractérisation plus détaillée des gènes V_{K1} , plus particulièrement V_{K1A} , a été entreprise. Un des moyens d'y parvenir est le clonage et la séquence d'un gène de ce sous-groupe.

Afin de cloner le gène réarrangé de la chaîne légère du myélome MOPC-460, plusieurs étapes ont été franchies. Premièrement, l'identification du fragment d'ADN porteur du gène se fait à l'aide d'une sonde de la région V_{K1A} (1.1) et une autre de la région $J_K C_K$. Deuxièmement, le montage d'une bibliothèque de phages et le criblage de cette bibliothèque sont effectués. Troisièmement, un clone est isolé et purifié, puis son ADN est extrait. Quatrièmement, le fragment isolé de l'ADN de phage est sous-cloné dans pBR 322 et une carte de restriction est faite. Et finalement, des fragments du gène sont sous-clonés dans M13 et séquencés.

Les résultats obtenus, surtout la séquence de la région LVJ_{K5} , ont permis de classer définitivement la chaîne légère de MOPC-460 dans le sous-groupe

V_{K1A}, même si elle avait été classée V_{K1D} auparavant (Lazure et al, 1981). Cette séquence, en plus de lever les ambiguïtés laissées par la séquence protéique, révèle deux substitutions situées dans le V, aux résidus 45 et 86, par rapport à la séquence germinale (T-105). Ces substitutions proviennent certainement de mutations somatiques.

INTRODUCTION

Ce travail consiste en la caractérisation du gène de la chaîne légère d'immunoglobuline du myélôme MOPC-460. Avant d'entreprendre la description des résultats, il est nécessaire de présenter des notions de base d'immunologie et les travaux antérieurs sur lesquels s'appuie ce projet. Partant du fait qu'un individu produit au moins 10^6 - 10^7 molécules d'immunoglobulines différentes (Williamson, 1976) et sachant que la théorie germinale disant que chaque immunoglobuline a son gène s'est avérée fautive (Dreyer et Bennett, 1965), la cellule productrice d'anticorps doit employer plusieurs stratégies permettant d'accroître la diversité des anticorps. Parmi ces moyens se trouvent l'association aléatoire par recombinaison des différents segments formant le gène complet de chaque chaîne, le nombre assez considérable de ces différents fragments, l'association combinatoire d'une chaîne lourde avec n'importe quelle chaîne légère et finalement, les mutations somatiques (Tonegawa, 1983; Hood, 1985). Pour apporter plus amples informations sur ces moyens de diversification, le laboratoire du Dr Gibson a entrepris la caractérisation de plusieurs gènes V_{K1} (Hum et al, 1984) parmi lesquels se retrouve la chaîne légère du myélôme MOPC-460.

A. Structure typique d'un anticorps

Les anticorps ou immunoglobulines sont sécrétés par les plasmacytes lors d'une réponse humorale à une attaque antigénique. Les anticorps sont constitués de deux types de chaîne polypeptidique: soient deux chaînes légères et deux chaînes lourdes reliées entre elles par des ponts disulfures. Chaque chaîne contient une partie variable et une partie constante. La partie variable est

caractérisée par trois régions hypervariables appelées CDR (complementary determining region) séparées par des régions moins variables appelées FR (framework) (Wu et Kabat, 1970). Les régions CDR forment le site de liaison à l'antigène (Barstad et al, 1978). La partie constante de la chaîne lourde, qui détermine la classe de l'anticorps soit μ , γ_1 , γ_{2a} , γ_{2b} , γ_3 , δ , α ou ϵ , est responsable d'une variété de fonctions effectrices telles la fixation du complément et la fixation au récepteur Fc. Les différentes classes de chaînes lourdes peuvent s'associer avec n'importe lequel des types de chaîne légère K ou λ . Cependant les chaînes K constituent 95% du répertoire des chaînes légères de souris.

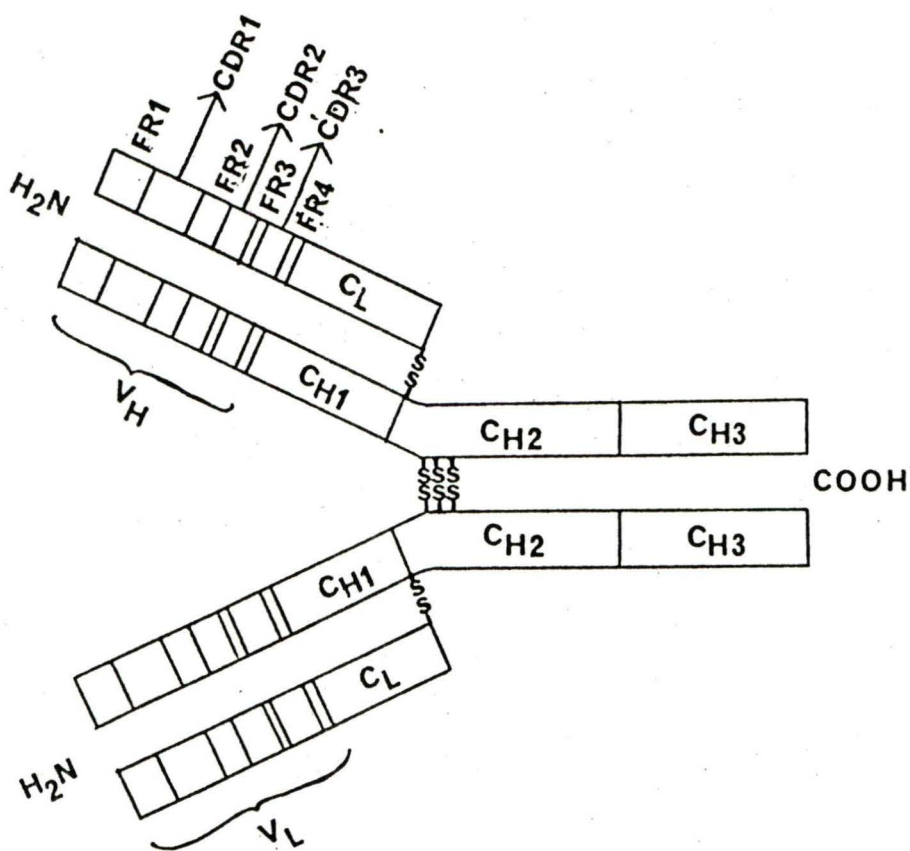


figure 1. Schéma général d'un anticorps où C est la région constante et V, la région variable. L représente la chaîne légère et H, la chaîne lourde. (inspiré de Tonegawa, 1983).

B. Immunogénétique

B1. Arrangement des gènes d'immunoglobuline

Les chaînes d'immunoglobulines de souris sont codées par trois familles de gènes: les gènes H situés sur le chromosomes 12 (D'Eustachio et al, 1980), les gènes λ situés sur le chromosome 16 (Tonegawa, 1983) et les gènes K situés sur le chromosome 6 (Swan et al, 1979; D'Hoostelaere et Gibson, 1986). Le locus de la chaîne K est orienté "tête en haut" par rapport au centromère (Banerjee et al, 1985) et localisé dans le premier tiers du chromosome (D'Hoostelaere et al, 1985). Ce locus, qui s'étend sur plus de 2000 Kb (Cory et al, 1981) est situé à un peu moins de 1.9 cM à gauche, probablement, du locus J_K-C_K (Gibson et al, non publié).

Ces familles de gènes présentent un arrangement similaire. Les gènes des chaînes légères K se composent de quatre fragments L, V, J et C, qui sont séparés à l'état germinale et ramenés ensemble pour l'expression. Parmi ces fragments il y a le L (leader) qui code pour la partie hydrophobe de la chaîne soit le peptide signal (Nishioka et al, 1980) et le V qui code pour la majeure partie de la région variable. Chaque V est accompagné de son propre L.

Plusieurs auteurs ont essayé d'estimer le nombre de gènes V_K chez la souris. Potter fait une première classification des chaînes K basée sur la séquence protéique allant du NH_2 terminal au premier Cys 23 invariable (Potter, 1977). Une deuxième classification des V_K , aussi faite par Potter (Potter et al, 1982), définit un sous-groupe ou isotype V_K comme ayant 12 substitutions ou moins dans la région NH_2 -Trp35. Cette classification laisse entendre que chaque

sous-groupe est codé par un seul gène (Weigert et Riblet, 1976). Afin d'essayer de préciser le nombre de gènes V_K , la méthode d'hybridation à saturation (Valbuena et al, 1978) propose que chaque sous-groupe soit codé par 4 à 8 gènes. Le nombre de sous-groupes étant d'environ 50, ils estiment le nombre total de gènes V_K à 300. L'hybridation par southern blot (Cory et al, 1981) démontre la présence de 4 à 10 familles de gènes ayant 16 à 22 membres pour une estimation de 90 à 320 gènes V_K . Finalement, la focalisation isoélectrique des chaînes légères (Gibson, 1984) ramène le nombre total de gènes V_K effectifs à 65.

Un troisième fragment J (pour joining) code pour les 12 derniers acides aminés de la région variable, c'est-à-dire le FR4. Les fragments J_K ont été mis en évidence par Weigert et al, (1978) puis clônés par Sakano et al, (1979). Ainsi ils font l'identification d'un groupe de cinq J_K pouvant tous s'associer avec n'importe quel V_K , sauf J_{K3} qui est déficient. Le groupe J_K est localisé de 4.0 Kb à 2.5 Kb en 5' du C_K (Sakano et al, 1979). Une hybridation par southern propose l'existence de trois et peut-être même quatre allèles J_K (Boyd et al, 1986).

Le quatrième fragment appelé C_K , code pour la région constante de la chaîne légère. Un génôme haploïde contient une copie unique du gène C_K . La région constante compte 106 acides aminés.

Les fragments de gènes de la chaîne légère λ présentent un arrangement différent. Cette famille contient quatre paires de segments J_λ et C_λ soient $J_{\lambda 1} C_{\lambda 1}$, $J_{\lambda 2} C_{\lambda 2}$ et $J_{\lambda 3} C_{\lambda 3}$ qui correspondent aux trois sous-types connus et $J_{\lambda 4} C_{\lambda 4}$ qui est déficiente. Cette famille contient aussi deux paires

de segments L V_{λ} . Le $V_{\lambda 1}$ se joint préférentiellement à $J_{\lambda 3}$ ou à $J_{\lambda 1}$ et le $V_{\lambda 2}$ au $J_{\lambda 2}$ mais la préférence n'est pas absolue.

L'arrangement des gènes de la chaîne lourde ressemble beaucoup à celui de la chaîne K. Le nombre de gènes $L_H V_H$ a été estimé, par hybridation par southern de 29 (Cory et al, 1981) à 100-200, subdivisés en 7 familles de 2 à 40 membres (Brodeur et Riblet, 1984). Avant de s'associer au V_H , l'un des 4 J_H doit d'abord se réarranger avec l'un des douze D_H . Ce segment D (pour diversité), code pour la partie centrale du CDR3 (Alt et al, 1984). Le génôme haploïde de souris compte 8 régions C_H , une pour chaque classe d'immunoglobuline.

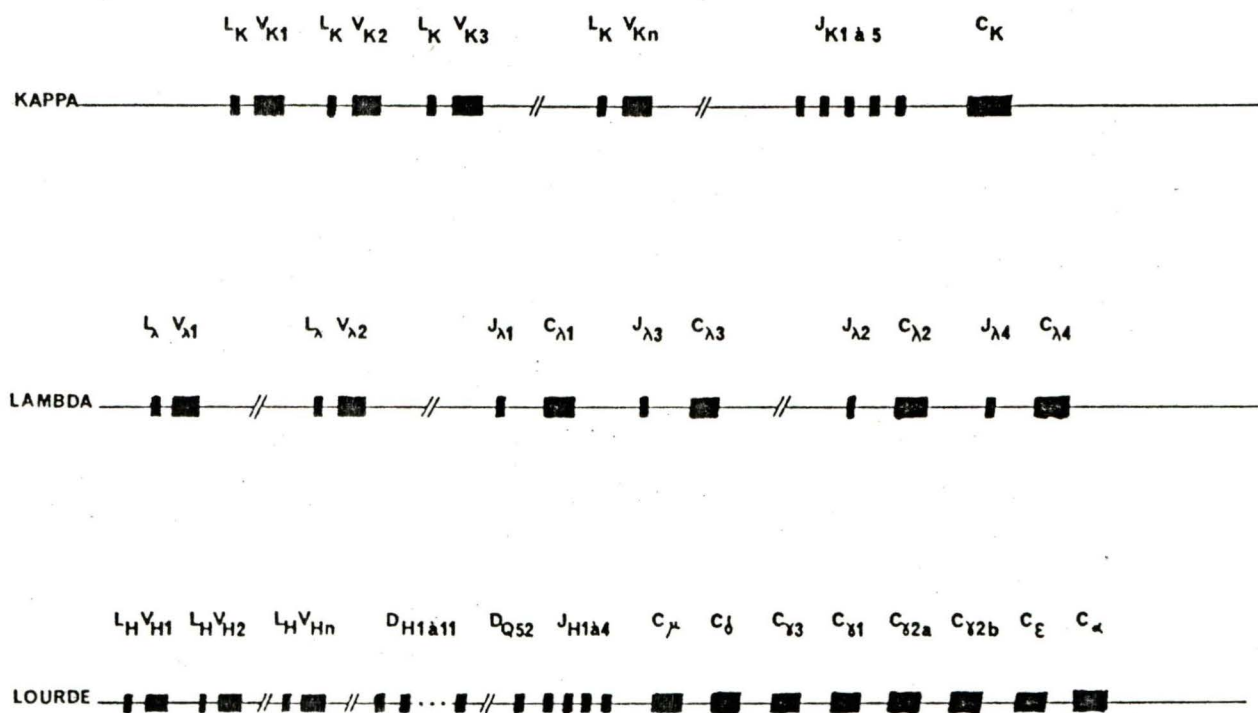


Figure 2 Schéma de l'arrangement germlinal des trois familles de gènes d'immunoglobuline. (D'après Hood et al, 1985).

B2. Réarrangements

Les segments de gènes d'immunoglobuline doivent être amenés ensemble pour former un gène complet actif. Ce mécanisme a été proposé par Dreyer et Bennett, (1965) par le fait qu'une extrémité de la chaîne légère semble être codée par l'un des nombreux gènes tandis que l'autre extrémité semble être le produit d'un gène unique. Puis ce mécanisme a été confirmé par le groupe de Tonegawa (Hozumi et Tonegawa, 1976; Tonegawa et al, 1976) à l'aide d'hybridations avec des sondes de mRNA de chaînes légères qui indiquaient que le V_K et le J_K , qui sont à une certaine distance l'un de l'autre dans les cellules embryonnaires, sont joints pour former un polynucléotide continu durant la différenciation des lymphocytes. Puis Weigert et al, (1978) démontrent que le segment V_K vient se joindre à un des 4 J_K effectifs, que ce phénomène semble se passer au niveau de l'ADN et qu'il a pour but d'augmenter la diversité.

Ce mécanisme se produit par recombinaison entre la partie 3' du V_K et la partie 5' du J_K . Cette recombinaison se fait au lien phosphodiester du second et du troisième nucléotide codant pour la proline (résidu #95 chez K et #97 chez) (Sakano et al, 1979). Comme aucun des J_K ne peut coder pour la proline 95, le premier résidu à être codé entièrement par le J est le résidu #96. Ce site de jonction est imprécis: au cours du réarrangement, les enzymes responsables introduisent des erreurs en joignant les brins d'ADN du V et du J dans différentes positions de manière à former de nouveaux triplets au site de recombinaison, et ce par insertion, délétion ou par substitution de nucléotide (Weigert et al, 1978). Ce phénomène d'insertion est plus souvent observé au site de recombinaison de la chaîne lourde où il est appelé N-régions (Honjo et Habu, 1985). Ceci contribue à augmenter la diversité mais parfois entraîne un

changement de cadre de lecture qui forme une chaîne légère non fonctionnelle; ce type de réarrangement est appelé aberrant (Altenburger et al, 1980; Lenhard et Schuller et al, 1978). On peut donc retrouver trois types de réarrangement dans une cellule B fonctionnelle soient K^+ pour l'allèle réarrangé fonctionnel, K^0 pour l'allèle non-réarrangé ou K^- pour un allèle présentant un réarrangement aberrant (Van Ness et al, 1982).

En faisant la séquence des régions flanquantes des V et des J, le groupe de Tonegawa (Early et al, 1980) identifie des séquences très bien conservées. Ces séquences de réarrangement sont constituées de séquences consensus: un heptamère CACAGTG et un nanomère ACAAAAACC. La disposition de ces séquences est importante. L'heptamère est toujours contigu au segment à réarranger soit en 3' du V, en 3' et 5' du D et en 5' du J (Tonegawa, 1983). L'heptamère est séparé du nanomère par une séquence non-conservée de 12 bp (1 tour d'hélice d'ADN) ou de 23 bp (2 tours d'hélice d'ADN). Ce type d'arrangement permet de former des structures répétées et inversées et peut ainsi servir de site de reconnaissance pour la recombinaison sachant qu'un site contenant une séquence non-conservée d'un tour d'ADN réarrange toujours avec un site qui contient une séquence non-conservée de 2 tours d'ADN (Hood et al, 1985). Un exemple de ces séquences pour la chaîne K est présenté à la figure 3 p.13.

Plusieurs mécanismes de recombinaison ont été proposés. Premièrement le modèle de "copie-insertion" dans lequel la partie V est copiée puis insérée de manière adjacente au fragment J (Hozumi et Tonegawa, 1976). Deuxièmement, le modèle d'excision-insertion où le segment de gène V est excisé, peut être retenu sous forme d'épisome (Dreyer et Bennett, 1965) puis inséré à côté du J

(Tonegawa et al, 1976). Troisièmement, le modèle de délétion par boucle dans lequel le V vient s'accoller au J par les séquences de reconnaissance formant une boucle avec la séquence intervenante. Ce segment d'ADN serait ensuite excisé puis dilué au cours des multiplications cellulaires subséquentes. Ce mécanisme est appuyé par des hybridations d'ADN total d'embryon et de myélômes (Sakano et al, 1979) et par la délétion complète du groupe de gènes V_{K21} causée par le réarrangement d'un des gènes du groupe V_{K19} situé plus distal du C_K (Heinrich et al, 1984). Quatrièmement, le modèle de réarrangement par inversion où le V et le C seraient dans une direction transcriptionnelle opposée et où le réarrangement se ferait par inversion de la séquence intervenante. Des évidences de l'emploi de ce mécanisme ont été rapportées dans le cas du réarrangement du gène β du récepteur de cellule T (Malissen et al, 1986). De plus le groupe de Lewis (Lewis et al, 1983 et 1985) a décrit une expérience qui prouve l'inversion des séquences se retrouvant entre le V et le C. Finalement, le mécanisme où la recombinaison se fait par échange inégal entre chromatides soeurs. Le groupe de Van Ness (Van Ness et al, 1979) explique pourquoi la séquence intervenante n'est pas délétée mais souvent retrouvée dans un nouveau contexte. Ce mécanisme implique une recombinaison mitotique par échange entre les chromatides soeurs. Une de ces chromatides se retrouve avec le locus K réarrangé tandis que l'autre porte la réciproque de recombinaison. Les deux chromatides sont ensuite ségréguées dans les deux cellules filles. Ce mécanisme est appuyé par Hocht et Zachau (1983), qui ont cloné et séquencé une réciproque de recombinaison.

B3. Association combinatoire

Comme il est démontré précédemment, la diversité des anticorps est accrue par le nombre des différents segments et le réarrangement de ceux-ci. Cependant un mécanisme additionnel, non-génétique, de génération de la diversité est celui de l'association combinatoire d'une chaîne lourde avec une chaîne légère. Sachant que le génôme contient 2 V_λ , 3 J_λ , 300 V_K et 4 J_K fonctionnels, le réarrangement de ces segments peut générer 1206 V_L ($2 \times 3 + 300 \times 4$) (Tonegawa, 1983) ou un peu moins sachant que les V_K ne réarrangent pas tout à fait au hasard mais démontrent plutôt une préférence pour J_{K1} et J_{K2} (Nishi et al, 1985). De même pour la chaîne lourde: 200 V_H x 12 D_H x 4 J_H peuvent former 9600 V_H (Crews et al, 1981). Au niveau protéine, n'importe quelle chaîne L peut s'associer avec n'importe quelle chaîne H, donc l'association combinatoire amplifie la diversité des anticorps: $1206 V_L \times 9600 V_H = 1 \times 10^7$ molécules d'anticorps différentes. Ce qui est le minimum requis pour assurer la défense contre les innombrables antigènes. L'organisme doit donc accroître la diversité par un moyen supplémentaire tel les mutations somatiques.

B4. Les mutations somatiques

Lederberg (1959) fut le premier à proposer un modèle basé sur un haut taux constant de mutations dans toutes les cellules productrices d'anticorps dans le but d'augmenter la diversité. Puis Brenner et Milstein (1966) renforcent l'hypothèse en proposant un mécanisme enzymatique qui couperait l'ADN autour de la région constante et introduirait des erreurs ou des mutations lors de la réparation. Cependant, l'existence des mutations somatiques a été confirmée par la séquence du gène $V_{\lambda 1}$ du myélome H2020 qui démontre trois substitutions par

rapport à la séquence germinale (Bernard et al, 1978). Par la suite plusieurs autres exemples de séquences réarrangées comparées à leur contreparties germinales démontrent plusieurs mutations. Parmi eux, les myélômes T1 et T2 (Pech et al, 1981) ont chacun 6 mutations, les myélômes MOPC 511 et MOPC 167 ont 4 et 2 mutations respectivement par rapport à la séquence germinale V_{167} (Gershenfeld et al, 1981). De même chez la chaîne lourde, plusieurs variants T15 découlant tous du gène V_{H1} diffèrent entre eux que par 1 à 8 acides aminés et sont au moins à 16 résidus de différence du V_H le plus apparenté, donc ces substitutions viennent de mutations somatiques (Crews et al, 1981). Par contre, la comparaison de d'autres gènes réarrangées et non-réarrangées n'indique aucune mutation (Nishioka et Leder, 1980; Seidman et al, 1979; Max et al, 1980)

Les mutations observées sont aussi fréquentes dans les CDR que dans les FR (Pech et al, 1981; Selsing et Storb, 1981; Heinrich et al, 1984). Il en est de même pour les mutations silencieuses et les mutations dans les introns, qui sont aussi fréquentes que les mutations effectives (Selsing et Storb, 1981). Ces observations réfutent l'hypothèse de Weigert et Riblet (Weigert et Riblet, 1976) selon laquelle les mutations sont sujettes à une sélection antigénique.

Le taux de mutation pour les gènes d'immunoglobuline est de 0.1% (McKean et al.1984) à 0.5% (Gearhart et Bogenhagen, 1983) par bp par génération tandis que pour les autres gènes des lymphocytes, il est de moins de 10^{-9} (Wabl et al, 1985). On observe autant de transitions que de transversions (Heinrich et al, 1984) et les mutations s'étendent exclusivement sur 1 à 2 Kb autour de la région VJ. Aucune mutation n'est retrouvée plus loin dans les séquences intervenantes ou dans le gène C_K (Gearhart et Bogenhagen, 1983). Ces

informations suggèrent un mécanisme mutationnel localisé qui agirait préférentiellement sur les séquences codantes, présentant un réarrangement VJ (Pech et al, 1981). Etant donné que les gènes non-réarrangés n'ont jamais été mutés, il est plausible que le mécanisme de mutation agisse pendant ou après le réarrangement, c'est-à-dire pendant le développement de la cellule B, avant l'expression d'une immunoglobuline de surface (Ziegler et al, 1984). Ce mécanisme "error-prone" emploierait une polymérase indépendante de la matrice telle la déoxynucléotidyl transférase couplée aux enzymes de réparation de l'ADN (Gershenfeld et al, 1981; Selsing et Storb, 1981). Cependant Gearhart et Bogenhagen (1983) croient que la distribution et la haute fréquence de mutations est plus facilement explicable par un mécanisme de réparation "error-prone" qui agit pendant plusieurs cycles de division cellulaire. Ils rejettent aussi l'hypothèse de la déoxynucléotidyl transférase qui préfère insérer des GC alors que les insertions ne sont pas majoritaires dans les mutations somatiques.

B5. Expression des gènes d'immunoglobuline

La première condition pour l'expression des gènes de la chaîne légère K est le réarrangement d'un V_K avec le locus $J_K C_K$. Même si le locus $J_K C_K$ est exprimé sous sa forme germinale K^0 , presque autant que le locus réarrangé VJC, le résultat est un transcript nucléaire qui se dégrade deux fois plus vite que le transcript VJC (Van Ness et al, 1981). Par contre, les V_K non-réarrangés présentent un rythme de transcription négligeable, soit 16000 fois plus petit que le locus VJC (Mather et Perry, 1981). Etant donné que les séquences du gène V_K et sa région 5' flanquante ne sont pas modifiées au cours du réarrangement, ces observations suggèrent que le réarrangement du V est accompagné d'une

altération de la structure de la chromatine ou que c'est la proximité du locus C_K qui confère une compétence transcriptionnelle au gène V_K . Effectivement, le locus C_K germinale ou réarrangé maintient une sensibilité à la DNase I distinctive et une structure hypométhylée caractéristique d'un niveau d'activité transcriptionnelle. Tandis que les gènes V_K germinaux sont des régions de chromatine moins sensibles et plus méthylées et que suite à la jonction au locus C_K , le gène V_K devient sensible à la DNase I et hypométhylé (Mather et Perry, 1983).

Même quand les gènes V_K ne sont pas réarrangés, leur promoteur peut être efficace dans un système *in vitro* (Bentley et al, 1983). Cette région promotrice se compose d'une TATA-box, dont la séquence consensus est TATA_TA_T située à environ 30 bp du "cap site" qui lui-même est situé à 20 bp du codon d'initiation ATG. Deux autres séquences, encore mieux conservées que la TATA-box, sont caractéristiques de la région promotrice des immunoglobulines. Ces séquences, un octamère ATTTGCAT, se localise approximativement à 70 bp en amont du site d'initiation de la transcription (Parslow et al, 1984) et un pentadecanucléotide TGCACTGTGNCNAN, situé à environ 100 bp du site d'initiation de la transcription (Falkner et Zachau, 1984). Ces séquences pourraient servir de site de reconnaissance pour un élément régulant l'expression des gènes d'immunoglobuline de manière tissu spécifique. Un tel élément, du type enhancer, a été localisé dans l'intron J_K-C_K (Queen et Baltimore, 1983) ainsi que dans l'intron J_H-C_μ de la chaîne lourde (Gillies et al, 1983) mais semble absent chez la chaîne légère. Ce enhancer agit de manière tissu spécifique, indépendamment de son emplacement du côté 5' ou 3' du V et indépendamment de son orientation et ce seulement en cis (Picard et Schaffner, 1984). La figure suivante montre les séquences importantes pour l'expression:

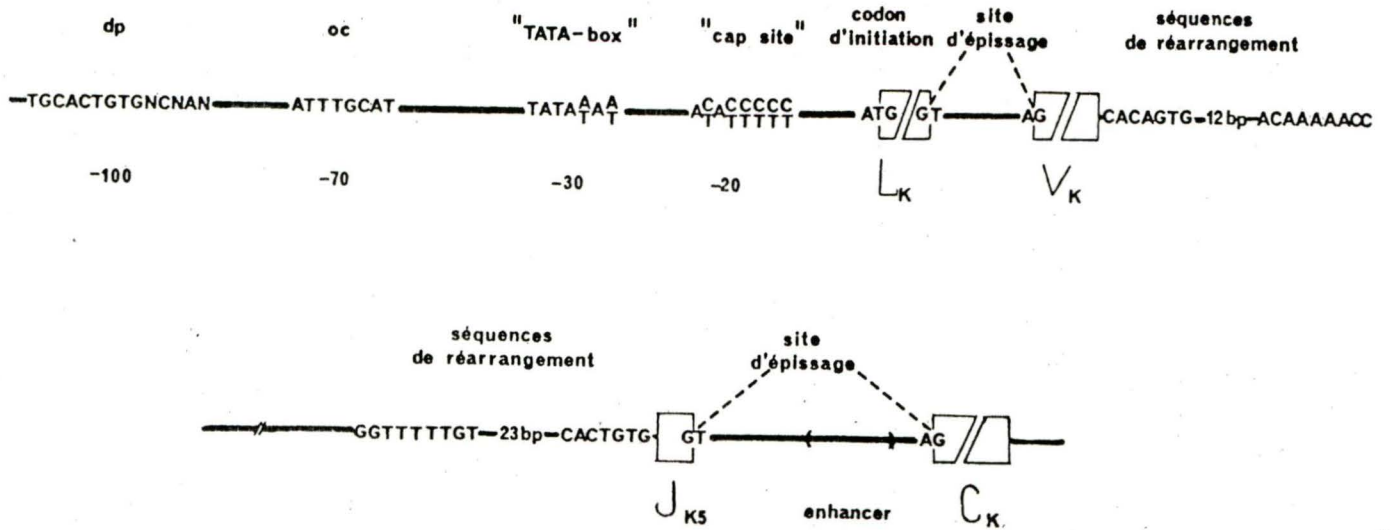


figure 3. Séquences de réarrangement et d'expression des gènes d'immunoglobuline où dp est pentadecanucléotide et oc est octamère.

Une fois que tous ces éléments sont à l'oeuvre, il y a production d'un pré-mRNA d'immunoglobuline. Ce pré-mRNA, semblable aux autres, est constitué d'une région 5' non-traduite, du peptide signal qui est séparé du V par un intron de 100-200 bp (Van Ness et al, 1981), du J directement juxtaposé au V suivi d'un intron d'environ 1400 bp puis du C_K. Ce pré-mRNA se termine par une séquence 3' non-traduite et une queue de poly A. Les introns sont ensuite enlevés par épissage, ce qui forme des mRNA des 1250 bases pour la chaîne K, qui constituent jusqu'à 10% des mRNA des plasmocytes (Queen et Baltimore, 1983).

C. A la base du projet

C1. Au sujet du myélôme MOPC-460

Le myélôme MOPC-460 a été conçu et étudié par le groupe de Potter. MOPC-460 a été induit dans une souris Balb/c par trois injections intrapéritonéales d'huile minérale et maintenue par une série de transplantations sous-cutanées (Potter et Boyce, 1962). La protéine myélôme sécrétée par cette tumeur est une immunoglobuline de classe IgA présentant la même structure que les autres anticorps (Jaffe et al, 1969 et 1971). Cette protéine démontre une affinité substantielle pour les nitrophenyls, surtout le 2,4-dinitrophenyl-L-lysine (DNP-Lys) et pour le 2-méthyl, 1,4-naphtaquinone thioglycollate (MenTG) (Rosenstein et al, 1972). Même si ces haptènes compétitionnent ensemble, il y a une séparation spatiale entre les groupes d'acides aminés qui font contact avec eux (Richards et al, 1975).

Plusieurs protéines myélomes qui lient des antigènes sont structurellement et idiotypiquement similaires aux anticorps normaux de la même spécificité de liaison. Ainsi MOPC-460 est constituée de chaînes lourdes d'isotype V_{H9} et de chaînes légères d'isotype V_{K1} (Potter, 1977).

C2. Au sujet de l'idiotype 460

Un idiotype (Id) est un déterminant antigénique unique trouvé sur les anticorps d'une spécificité particulière. L'habileté d'exprimer un idiotype particulier, durant les réponses à un même antigène est transmise par l'hérédité. Le groupe de Dzierzak (Dzierzak et al, 1980) a démontré que l'expression de

l'Id-460 ne dépend pas seulement de la possession de certains gènes V_H mais aussi de la présence de gènes V_K . L'expression de l'Id-460 fait aussi la discrimination entre les gènes V_K venant de souris AKR et ceux venant de souris C58, c'est-à-dire entre les souris qui expriment le marqueur EF2 et celles qui ne l'expriment pas. Ce marqueur définit un groupe de gènes V_K , soit le groupe V_{K1} (Gibson et MacLean, 1979). Donc, l'expression de l'idiotype 460 est étroitement reliée à l'habileté de produire des chaînes légères V_{K1} . La découverte de l'implication des gènes V_K dans l'Id-460 est renforcée par le fait que l'anticorps monoclonal G-1 n'inhibe pas les essais sur l'Id-460. Cet anticorps qui lie le DNP, porte la même chaîne lourde de MOPC-460 et a une chaîne légère λ (Dzierzak et al, 1980), ce qui démontre que l'Id-460 est porté par la chaîne légère K.

L'Id-460 est un idiotype dominant; on le retrouve aussi sur des anticorps spécifiques à Pasteurella pneumotropica mais ne liant pas le DNP (Marion et al, 1984). La dominance de cet idiotype, d'ûe à l'utilisation plus fréquente des gènes V_{H460} et V_{K1} , dépend probablement de la sélection par l'antigène environnemental (Dzierzak et al, 1985). Une dominance clonotypique, chez les souris Balb/c nouveaux-nés, dans la réponse au DNP a été remarquée où un des idiotypes dominants utilise un gène V_{K1} ayant une séquence homologue à celle de MOPC-460 (Riley et al, 1986).

Les chaînes V_{K1} sont plus fréquemment utilisées que ce que propose les données statistiques (Dzierzak et al, 1985). On retrouve des chaînes V_{K1} dans la réponse à plusieurs autres antigènes tels la flagelline (Smith et al, 1977), la phosphrylcholine (Clarke et al, 1984; Tood et al, 1984), le glutamoyl-alanyl-tyrosine (GAT) (Schiff et al, 1983; Fougereau et al, 1894) et

l'oxazolone (Berek et al, 1985).

C3. Au sujet des gènes V_{K1}

Dans le but de faire une caractérisation précise des différences au niveau protéine et acide nucléique chez les chaînes légères et aussi afin de définir le nombre de chaînes légères contrôlées par chaque gène V_K , le groupe de Gibson emploie la technique de focalisation isoélectrique des chaînes légères. Ainsi, il a défini deux marqueurs EF1 (Gibson et al, 1978) et EF2 (Gibson et MacLean, 1979) dont les allèles sont caractérisés par la présence "a" ou l'absence "b" de bandes précises. L'identité, dans les 30 premiers acides aminés, des chaînes K de trois myélomes cofocalisant avec le marqueur EF2, indique que ce marqueur correspond au groupe de chaînes légères V_{K1} (Lazure et al, 1980). En 1981, ils établissent que le groupe V_{K1} se divise en deux, soient V_{K1A} pour les souris qui possèdent l'allèle EF2^a et V_{K1B} associé à l'allèle EF2^b (Lazure et al, 1981). Plus tard, la séquence protéique de plusieurs chaînes légères de myélome a apporté d'autres subdivisions au groupe V_{K1} , soient V_{K1C} et V_{K1D} (Lazure et al, 1984). V_{K1A} représente 2.9% de toutes les chaînes légères de myélome de Balb/c analysées, soit le groupe le plus représenté (Gibson, 1984).

Le patron de focalisation isoélectrique des chaînes légères du myélome MOPC-460 est unique tel que démontré à la figure 4. Ces bandes principales focalisent à peu près 2 unités de charge du côté acide par rapport au marqueur EF2 (V_{K1A}).

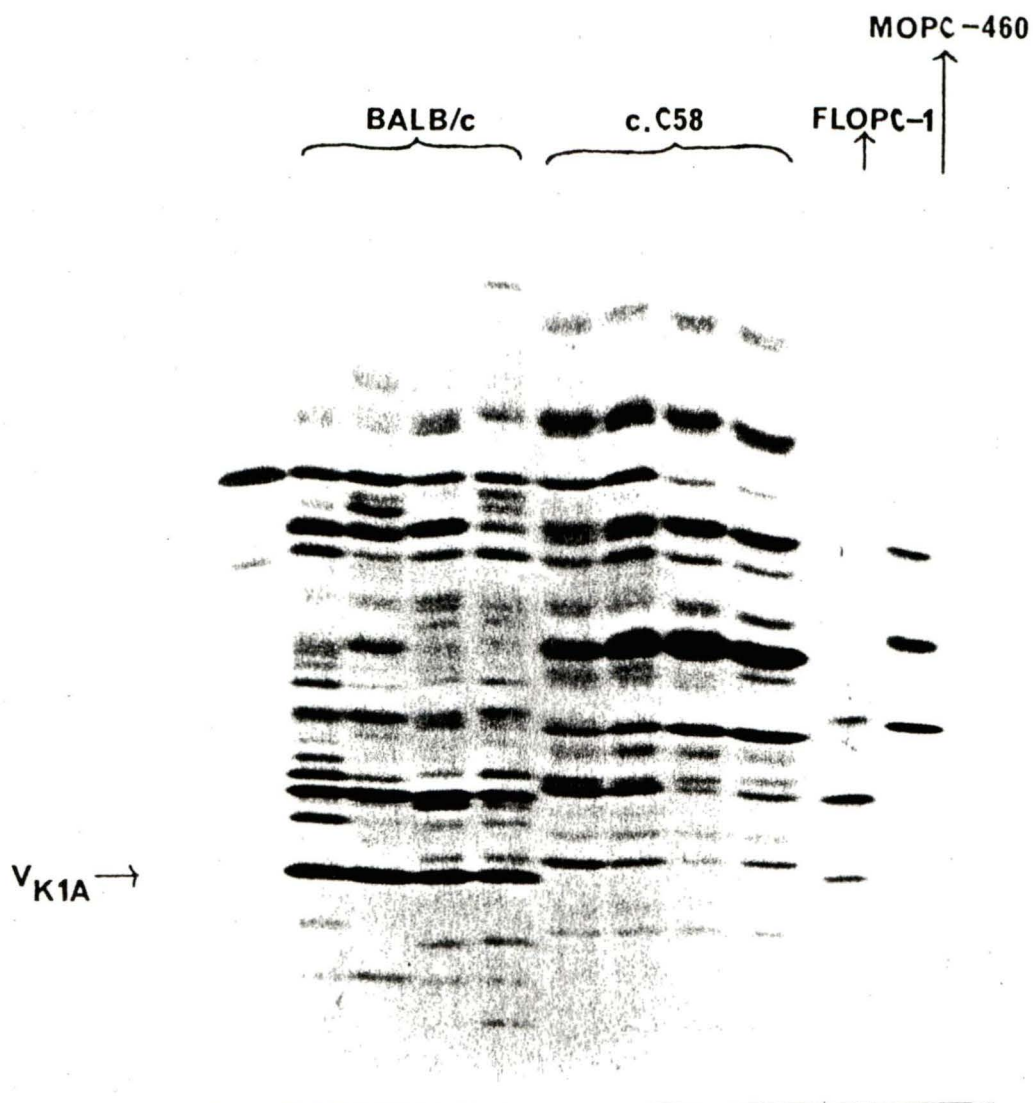


figure 4. Gel de focalisation isoélectrique montrant le patron unique des bandes de M-460 par rapport à celles des anticorps anti-DNP isolés de Balb/c, porteur du marqueur EF2^a (V_{K1A}) et à celles de c.C58 porteur de l'allèle EF2^b.

La séquence d'acides aminés de la chaîne légère de M-460 diffère par une substitution Tyr-Phe, en position 86, par rapport à la séquence V_{K1A} (TEPC-105). On a donc classifié M-460 dans le sous-groupe V_{K1D} (Lazure et al, 1981). Cependant, il est possible que le sous-groupe V_{K1D} proposé par une substitution partagée par la chaîne légère de deux myélomes MOPC-460 et TEPC-821, puisse être codé par le gène V_{K1A} et que cette substitution proviendrait d'une mutation somatique (Moynet et al, 1985).

Donc le clonage et la séquence du gène réarrangé de la chaîne légère du myélome MOPC-460 pourra définitivement classer cette chaîne légère dans le bon sous-groupe. La séquence d'ADN, qui en plus de faire lever les cinq ambiguïtés laissées par la séquence protéique, pourra être comparée avec la séquence germinale, ce qui apportera peut-être de plus amples informations sur les mutations somatiques.

MATERIEL ET METHODES

A. Préparation de l'ADN

A1. Extraction de l'ADN de myélôme, de rate ou de rein

Cette technique, fournie par le Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine) consiste à placer l'organe fraîchement prélevé dans un homogénéisateur (Weaton Scientific) froid contenant du tampon LST (20 mM Tris, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, pH=7.4). Après homogénéisation, on ajoute une solution contenant 4% de Nonidet NP-40. Après centrifugation, on resuspend le culot nucléaire dans du tampon ACE (50 mM NaAcetate, 10 mM EDTA pH=5.1) auquel on ajoute du SDS pour obtenir une solution finale de 1%. Après une incubation d'environ une heure sur glace, on fait une extraction au phénol saturé avec ACE suivie d'une extraction au chloroforme/alcool isoamyl (24:1). Ensuite, on ajoute un volume égal d'éthanol absolu sur la phase aqueuse, sans mélanger. On attend que l'ADN précipite à l'interface puis on l'extrait en le faisant adhérer à une tige de verre. On sèche ensuite l'ADN au lyophilisateur et on le resuspend dans du TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH=7.5).

A2. Extractions et précipitation à l'éthanol

Pour débarasser une préparation d'ADN des débris cellulaires ou autres contaminants, on lui fait une ou plusieurs extractions au phénol. Le phénol doit être saturé avec le tampon de la solution d'ADN, souvent TE. L'extraction consiste à ajouter un volume égal à la solution à extraire de phénol saturé, à brasser et à centrifuger pour séparer les deux phases. Cette extraction peut

être suivie d'une extraction au chloroforme/alcool isoamylique (24:1) et d'une extraction à l'éther, si le besoin s'en fait sentir. Ces extractions se font de la même façon que celles au phénol. L'extraction à l'éther doit être suivie d'une période d'évaporation à 65⁰C afin de faire disparaître toute trace d'éther. L'ADN est ensuite précipité à l'éthanol.

La précipitation de l'ADN à l'éthanol se fait en ajoutant 1/25^e volume de NH₄ Acetate 3 M ou 1/25^e volume de NaCl 5 M et 2.5 volume d'éthanol absolu à la solution d'ADN. Après une incubation de 30 minutes à 3 heures à -20⁰C, on centrifuge à 7000 rpm pendant 20 minutes ou 12000 rpm pendant 15 minutes, selon le volume à précipiter. Le culot est ensuite lavé avec de l'éthanol 70% puis séché sous vide. L'ADN est finalement resuspendu dans le volume désiré d'eau stérile ou de TE.

A3. Digestions avec enzymes de restriction

Pour couper l'ADN, on utilise des enzymes de restriction préparés commercialement (BRL, Boehringer, IBI). On coupe 2 à 3 µg d'ADN avec 10 à 20 unités d'enzyme. La solution de digestion contient 1/10^e volume de 10X tampon, 100 µg/ml d'albumine (BSA) et 20 mM DTT. Les tampons utilisés sont décrits dans le tableau 1.

Tableau I. Composition des tampons selon les enzymes de restriction employés

10X Tampon	Tris pH=7.8	NaCl	MgCl ₂	Enzymes
A	25 mM	50 mM	10 mM	BglII, HindIII, PstI, PvuII, Sau3A
B	25 mM	-	10 mM	HaeIII, MgCl ₂
C	25 mM	100 mM	10 mM	BamHI, EcoRI, MboI, TaqI, XbaI, KpnI
D	25 mM	25 mM KCl	10 mM	SmaI, HpaI

B. Identification des fragments d'ADN

B1. Electrophorèse sur gel d'agarose

Afin de visualiser l'ADN après l'extraction ou à la suite d'une digestion enzymatique, on fait une électrophorèse sur gel d'agarose. La concentration d'agarose dans les gels dépend de la grandeur des fragments à séparer: plus les fragments sont petits, plus le gel est concentré. Cette concentration varie entre 0.4% et 1.5%. L'électrophorèse se fait à l'horizontal dans des appareils BioRad et BRL. Le tampon d'électrophorèse contient 0.04 M Tris, 0.02 M NaAcetate, 0.002 M EDTA, pH=7.8.

Les échantillons appliqués sur le gel contiennent environ 20% d'une solution

de bleu de bromophénoï (0.1% bleu de bromophénoï, 50% sucrose, 1.5% Ficoll, 10 mM EDTA, 10 mM Tris, pH=7.8) et sont préalablement chauffés à 65°C pendant 5 minutes. Le voltage de migration dépend de la grandeur du gel: un bébé-gel (5 cm X 7.5 cm) migre à 50 V pendant 1 1/2 heure pour un total de 75 Volts-heure, un gel moyen (11 cm X 14 cm) migre 400 Volts-heure total et un grand gel (20 cm X 25 cm) nécessite de 600 à 700 volts-heure au total. Les marqueurs de poids moléculaires sont le λ H3 donnant des fragments de 23 Kb, 9.4 Kb, 6.0 Kb, 4.3 Kb, 2.5 Kb, 1.98 Kb, 0.58 Kb, 0.125 Kb et le ϕ X174 HaeIII donnants des bandes à 1353 bp, 1078 bp, 872 bp, 603 bp, 310 bp, 271-281 bp, 234 bp, 194 bp, 118 bp et 72 bp.

Quand la migration est terminée, les fragments d'ADN sont révélés après coloration dans une solution à environ 1 μ g/ml de bromure d'éthidium pendant 15 minutes et exposition à la lumière UV ($\lambda = 254$ nm). Une photo du gel est prise en exposant un film polaroid type 57 de 1 à 2 minutes.

B2. Electroélution

Quand on veut isoler un fragment particulier, on le sépare des autres par électrophorèse sur gel d'agarose. On coupe la bande d'agarose qui contient le fragment désiré et on l'extrait par électroélution tel que décrit dans Maniatis p. 164 (Maniatis et al, 1982). Les sacs à dialyse utilisés dans cette technique sont préparés commercialement (BRL). Après une électroélution d'environ 1 à 3 heures à 100 Volts, la solution contenant l'ADN est extraite au phénoï puis à l'éther et ensuite précipitée à l'éthanol.

B3. Transfert d'ADN sur filtres

La méthode de transfert d'ADN a d'abord été décrite par Southern (Southern, 1975) et modifiée pour les membranes "gene screen plus". Elle commence par un trempage du gel d'agarose dans de l'acide chlorhydrique à 0.25 N pendant 15 minutes suivi immédiatement par un trempage dans une solution dénaturante (0.4 N NaOH, 0.6 M NaCl) durant 30 minutes. Le gel est ensuite neutralisé dans une solution 1.5 M NaCl, 0.5 M Tris, pH=7.5 pendant 30 minutes. Le gel est ensuite déposé sur des filtres (Whatman 3MM). La membrane "gene screen plus" est placée directement sur le gel et sur la membrane on dispose des papiers Whatman 3MM secs et une bonne épaisseur de papier absorbants (10 cm). Un poids d'environ 200 ml d'eau couronne le tout. Le transfert de l'ADN se fait par buvardage d'une solution 10X SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M NaCitrates) qui passe à travers du gel d'agarose, entraînant l'ADN et le faisant adhérer à la membrane "gene screen plus". Le transfert nécessite de 16 à 24 heures. Quand le transfert est complété, on immerge la membrane dans une solution de 0.4 N NaOH pendant 45 secondes afin de dénaturer complètement l'ADN. On neutralise ensuite dans une solution 2X SSC, 0.2 M Tris, pH=7.5 pendant 15 minutes. Le filtre est ensuite séché à l'air ambiant ou sous vide à 80°C pendant 1 heure. Cette technique est proposée par New England Nuclear (Dupont).

B4. Hybridation

La membrane "gene screen plus" transportant les fragments d'ADN doit d'abord être préhybridée. Pour ce faire, on place la membrane dans un sac de plastique (Kapak Corporation), on y ajoute de 10 à 20 ml de solution de préhybridation (1% SDS, (BDH), 1 M NaCl, 10% Sulfate de dextran, (Pharmacia). Le sac, hermétiquement fermé, est incubé de 4 à 6 heures à 65°C avec une agitation constante.

Pendant cette période d'incubation, on peut procéder au marquage de la sonde par "nick translation" (Rigby et al, 1977). On marque 0.5 µg d'ADN dans une solution contenant 1 mM dGTP, 1 mM dTTP, 50 µCi ³²P-dATP, 50 µCi ³²P-dCTP, 1/10^e volume de tampon 10X DNA polymerase I (500 mM NaCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 200 mM Tris, pH=7.5) et 7.5 unités de DNA polymerase I de E. coli (Kornberg enz). La réaction s'effectue pendant 40 minutes à la température de la pièce. Après arrêt de la réaction avec 10 mM final de EDTA, on ajoute 20 µg de tRNA et on sépare la sonde marquée des nucléotides libres sur colonne Sephadex G-75 éluée avec du tampon 10 mM Tris, pH=7.6, 10 mM EDTA. Finalement on compte une fraction (environ 0.02%) de la sonde obtenue à l'aide d'un compteur à radioactivité (Beckmann).

Pour l'hybridation, on ajoute 1x10⁶ cpm de sonde par ml de solution de pré-hybridation et environ 100 ng/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé par ultrasons. La sonde est dénaturée à 100°C pendant 10 minutes puis refroidie rapidement sur glace et transférée dans le sac de plastique. L'hybridation se fait à 65°C avec agitation constante, pendant la nuit.

Le lendemain, on retire la membrane "gene screen plus" de la solution d'hybridation et on lui fait subir plusieurs lavages consécutifs: les deux premiers lavages sont de 5 minutes dans du 2X SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M NaCitrate) avec agitation constante et à la température de la pièce. Ces lavages sont suivis d'un autre de 30 minutes dans une solution de 2X SSC, 1% SDS, à 65⁰C suivi de 30 minutes dans une solution de 0.1X SSC, 0.5% SDS à 65⁰C. On termine par un ou deux lavages, selon le besoin, de 30 minutes dans une solution de 0.1X SSC à la température de la pièce. On laisse ensuite sécher légèrement la membrane sur un papier filtre Whatman 3MM puis on l'enveloppe dans un papier "Saran Wrap" pour l'exposer à un film Kodak XAR-5 à -70⁰C pendant une nuit ou plus longtemps.

C. Construction de la bibliothèque dans le phage λ L47.1

C1. Préparation des bras de phage λ L47.1

Le vecteur λ L47.1 fut d'abord construit et décrit par Loenen et Brammar, 1980. λ L47.1 a une longueur totale de 40.6 Kb. En le coupant avec l'enzyme BamH1, on obtient deux bras de 23.6 Kb et 10.4 Kb et un fragment central de 6.6 Kb que l'on coupe avec XhoI pour l'empêcher de se religuer avec les bras.

C2. Préparation de l'ADN génomique

L'ADN du myélôme MOPC-460 a été digéré avec BamH1 puis fractionné par gel préparatif et électroélution afin d'obtenir les fractions suivantes: 1- de 21 à 11.5 Kb; 2- de 11.5 à 9.0 Kb; 3- de 9.0 à 7.4 Kb; et 4- de 7.4 à 5 Kb. Ces fractions sont mises sur gel puis transférées sur "gene screen plus" et hybridées

avec la sonde J_K . Parallèlement, une digestion BamHI est aussi transférée et hybridée avec la sonde 1.1. La figure suivante présente les sondes utilisées.

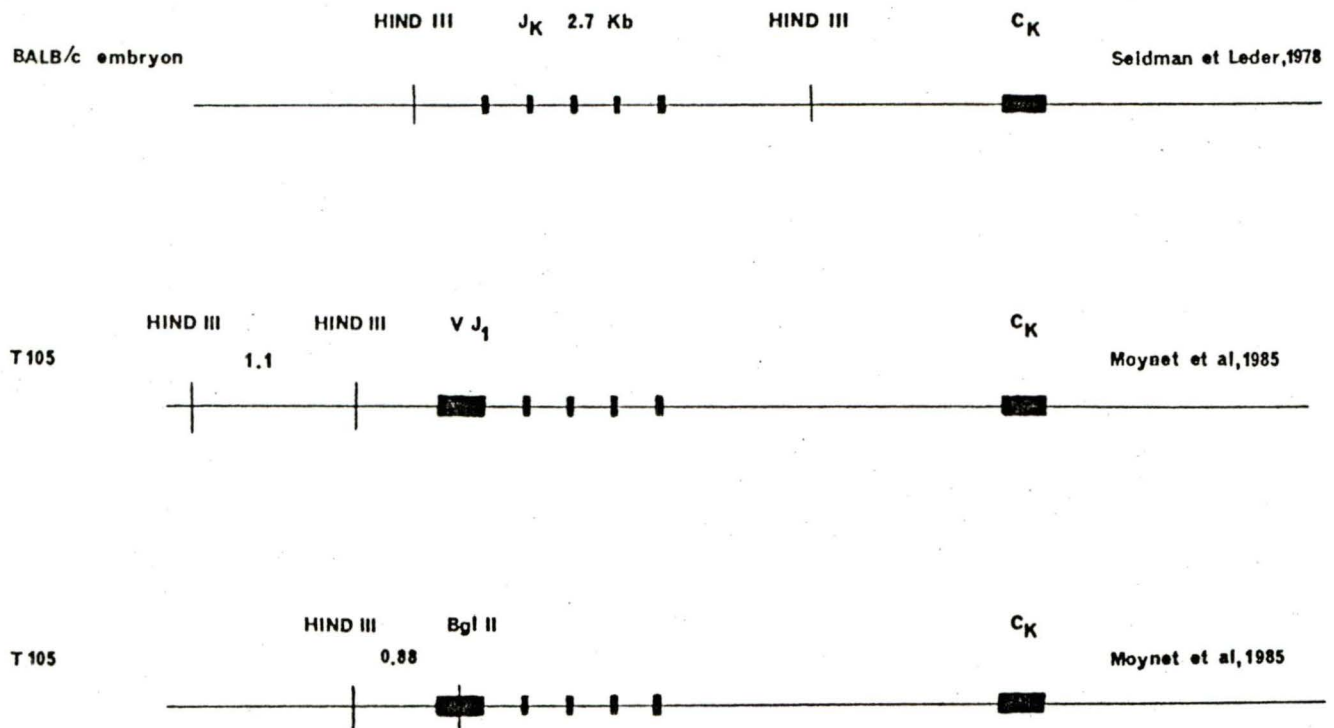


Figure 5. Source des fragments d'ADN qui ont servi de sonde marquée au ^{32}P pour la détection du gène réarrangé de la chaîne légère de MOPC-460.

Le but de l'utilisation de ces trois sondes est l'identification du gène réarrangé de la chaîne légère K du myélôme MOPC-460. En obtenant une bande commune aux deux sondes, c'est-à-dire ayant le même poids moléculaire, on est presque certain que cette bande correspond à la chaîne légère K réarrangée.

C3. Ligations

Différents rapports de molarité de l'insert et des bras ont été essayés pour la ligation. Ces rapports sont 4 bras:1 insert; 2:1; 1:1 et 0.5:1. La ligation se

faisait dans un tampon 70 mM Tris, 7 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP avec 1 unité Weiss de T4 DNA ligase (Biolabs) pour 2 μg d'ADN total à liguer. La réaction s'effectue dans un volume ne dépassant pas 15 μl à $10^{\circ}C$ toute la nuit. Un μl est prélevé avant de partir la réaction, c'est-à-dire juste avant d'ajouter l'enzyme puis un autre μl est prélevé à la fin de la réaction et ce pour fin d'analyse sur gel d'agarose à 0.4%.

C4. Préparation des extraits pour encapsidation in vitro

La méthode de préparation des extraits pour encapsidation in vitro qui a été utilisée est celle décrite par Enquist et Sternberg, 1979 avec certaines modifications.

L'extrait FTL (freeze thaw lysis) est fournit par la bactérie E. coli 131. Le phénotype "lysogène" de la bactérie est d'abord vérifié en striant cette bactérie sur deux pétris L-Broth que l'on incube à $30^{\circ}C$ et à $42^{\circ}C$. Le prophage étant inductible à des températures excédant $37^{\circ}C$, le pétri incubé à $42^{\circ}C$ doit rester vide. On se sert ensuite d'une colonie isolée provenant du pétri à $30^{\circ}C$ pour partir une pré-culture de 10 ml de L-Mg (L-Broth + 5 mM $MgSO_4$). Cette pré-culture sert ensuite d'inoculum pour 600 ml de culture qui serviront pour faire l'extrait. Quand la culture a atteint une $D.O._{600} = 0.13$, la souche est induite en incubant les 600 ml de culture dans un bain à $65^{\circ}C$ jusqu'à ce que la température atteigne $45^{\circ}C$. Puis on laisse l'induction se produire à $45^{\circ}C$ pendant 20 minutes sans agitation. On incube ensuite la culture à $38-39^{\circ}C$ pendant 3 heures, avec une forte agitation. Après refroidissement et centrifugation, on resuspend le culot bactérien dans 2 ml de DPC (10% sucrose, 500 mM Tris, pH=7.5) froid. Sur glace, on ajoute 160 $\mu g/ml$ de lysosyme puis on

congèle les tubes dans l'azote liquide. On dégèle ensuite les extraits sur glace et on ajoute 75 μ l/ml d'extrait, de tampon M1 (0.2% β -mercaptoéthanol, 6 mM Tris, pH=7.5, 30 mM spermidine, 60 mM putrescine, 18 mM $MgCl_2$, 15 mM ATP pH=8.0). On se débarrasse des débris bactériens par centrifugation. On amène le surnageant à 20% glycérol, on aliquote et on conserve dans l'azote liquide.

L'extrait SE (sonicated extract) est fourni par la bactérie E. coli 154. Le début de la préparation se fait de la même façon que pour l'extrait FTL jusqu'au moment de la resuspension du culot bactérien. Celui-ci est resuspendu dans 1 ml de tampon A (3 mM $MgCl_2$, 0.05% β -mercaptoéthanol, 1 mM EDTA, 20 mM Tris, pH=8.0). La suspension est transférée dans un tube COREX de 15 ml qui est maintenu dans un b cher contenant de la glace-NaCl. La sonication est effectuée par un sonicateur LAB 9405MSE à amplitude 3, 6 fois 20 secondes avec 10 à 15 secondes de repos entre chaque sonication. On se débarasse des débris bactériens par centrifugation, on amène le surnageant à 20% glycérol, on aliquote et on conserve dans l'azote liquide.

Les extraits sont ensuite testés en effectuant l'encapsidation in vitro de 0.2 μ g d'ADN du phage λ de type sauvage. Les meilleurs résultats ont été obtenus en utilisant 6 μ l d'extrait SE et 2 fois 20 μ l d'extrait FTL.

C5. Encapsidation in vitro

Les quantités optimales d'extraits SE et FTL à utiliser pour l'encapsidation ont été préalablement déterminées. Une encapsidation a été faite avec les quatre rapports de molarité essayés pour la ligation (voir C3) de la fraction 2 de la digestion BamHI de MOPC-460 avec les bras de λ L47.1. Pour faire ces

encapsidations, il faut mélanger dans l'ordre: 7 μ l de tampon A (voir C4), 2 μ l de tampon M1 (voir C4), 0.4 μ g d'ADN ligué, 6 μ l de SE et 20 μ l de FTL. Une incubation de une heure à la température de la pièce avec agitation légère est suivie par l'ajout d'un autre 20 μ l d'extrait FTL et d'une autre heure d'incubation dans les mêmes conditions. On ajoute ensuite 1 ml de tampon SM (100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄, 0.01% gélatine, 50 mM Tris, pH=7.5), on titre et on conserve à 4°C.

C6. Titration

Les bactéries utilisées pour l'étalement des phages sont les NM 538. Celles-ci sont permissives, c'est-à-dire qu'elles ne font pas la distinction entre les phages non-recombinants et les phages recombinants. Contrairement aux bactéries NM 539 qui, étant restrictives, permettent la croissance des phages recombinants seulement, à cause du phénotype spi^- exprimé par les phages recombinants.

Les bactéries NM 538 sont donc mises en culture dans le milieu T-Broth contenant 5 mM MgSO₄ et 0.1% de maltose. Lorsqu'on obtient une D.O.₆₀₀=2.4, on centrifuge puis resuspend le culot dans du MgSO₄ à 10 mM de façon à avoir une D.O.₆₀₀=2.0.

Pour l'étalement, on fait une pré-adsorption en incubant les phages avec les bactéries pendant 20 minutes à 37°C, puis on étale sur des pétris L-Mg (5 mM MgSO₄) avec du T-soft (0.6% agar). Les recettes des milieux L et T sont décrites dans Maniatis p.440 (Maniatis et al, 1982).

C7. Amplification de la bibliothèque

Pour amplifier suffisamment la bibliothèque, les quatre tubes d'encapsulation ont été mélangés. Ces phages ont ensuite été étalés avec les bactéries NM 538 sur 5 grandes boîtes de pétri (22 x 22 cm) de façon à obtenir une lyse presque complète. De 50 à 60 ml de tampon SM (voir C5) sont déversés sur les boîtes de pétri et incubés à 4⁰C pour la nuit afin d'en extraire les phages. Le lendemain, on lave les boîtes de pétri avec 15 ml de tampon SM, on ajoute jusqu'à 4% de chloroforme à la solution, on centrifuge, on filtre et on titre. De la solution, 50 ml sont gardés tel quels à 4⁰C et du reste, 200 ml, on précipite les phages au polyéthylène glycol (PEG, Fisher). Pour ce faire, on amène la solution à 1 M NaCl, 10% p/v PEG en dissolvant à la température de la pièce. Après une incubation de deux heures sur glace, on centrifuge à 8000 rpm pendant 10 minutes. Le culot est resuspendu dans 3.0 ml de tampon SM et extrait deux fois au chloroforme. Les phages sont ensuite concentrés à l'aide d'un gradient discontinu de chlorure de césium (BDH). Les solutions de chlorure de césium sont faites dans du tampon SM contenant 20 mM MgSO₄. Les densités du sel et les temps de centrifugation employés sont ceux décrits dans Maniatis p.80 (Maniatis et al, 1982).

D. Criblage de la bibliothèque

D1. Criblage

La méthode de criblage, faite par hybridation in situ, a été décrite par Benton et Davis, 1977. Les quatre premiers criblages ont été faits en étalant les phages avec NM 538. Chaque criblage comptait environ 100000 plages étalées

sur trois grandes boîtes. Le transfert des phages se faisait sur nitrocellulose, l'hybridation était faite telle que décrite en section B4 avec la sonde J_K (voir figure 4). Pour chaque criblage il y avait un contrôle positif soit T-105, phage 1059 contenant le gène réarrangé du myélôme TEPC-105, préalablement isolé dans ce laboratoire et un contrôle négatif soit λ L47.1 sans insert.

Le titre de la bibliothèque sur NM 539 a révélé que seulement 1 phage sur 10 était recombinant. Après criblage de 900000 phages, sur NM 539, deux clônes ont été obtenus: clône B et clône B'.

D2. Purification des clônes

Pour purifier les clônes, il faut repiquer la plage positive, la mettre dans 1 ml de tampon SM avec 50 μ l de chloroforme, laisser les phages diffuser à 37°C pendant 1 heure puis étaler. Après avoir fait une hybridation in situ, on repique encore une plage positive. Plusieurs passages de la sorte doivent être effectués jusqu'à ce que les plages soient homogènes, c'est-à-dire toutes positives. Le clône B' étant un faux positif, il a été abandonné dès le deuxième passage. Au dernier passage, le clône LLC a été hybridé avec la sonde 0.88 ainsi qu'avec J_K afin de démontrer que le gène isolé était bien réarrangé.

D3. Extraction d'ADN de phages

Pour avoir assez d'ADN, il faut faire l'extraction à partir d'au moins 10^{10} pfu. Une plage donnant environ 10^4 pfu, il a donc fallu amplifier les phages. Pour ce faire, on étale sur deux petits pétris de façon à obtenir une lyse complète. On extrait les phages avec 5 ml de tampon SM par pétri. Le titre

obtenu est de 5.2×10^7 pfu/ml. Ensuite on fait une amplification en milieu liquide telle que décrite par Maniatis p. 77 (Maniatis et al, 1982). Après amplification dans un litre on précipite les phages au PEG (voir C7) puis on fait un gradient discontinu de chlorure de césium qui donne un stock de clône pur qui titre à 5×10^{12} pfu/ml.

Pour extraire l'ADN, on suit la méthode décrite dans Davis et al (1980). Pour ce faire on prend 5×10^{12} phages dans le chlorure de césium et on le dialyse contre une solution 50% formamide et 50% 0.02 M EDTA, 0.2 M Tris, pH=7.5 à la température de la pièce pendant toute la nuit. On dialyse ensuite pendant 24 heures, en changeant le tampon 0.1 M NaCl, 0.01 M EDTA, 0.05 M Tris, pH=7.5, 4 fois. Ensuite on récolte, on lave le sac à dialyse avec de l'eau, on fait deux extractions au phénol puis une au chloroforme, on précipite à l'éthanol et on resuspend l'ADN dans l'eau stérile.

E. Sous-clônage dans le plasmide pBR-322

E1. Transformations

L'ADN ayant été extrait du clône LLC, il a été digéré avec BamHI pour sortir l'insert. pBR-322 (BRL) a aussi été digéré avec BamHI puis traité à la phosphatase alcaline CIAP, voir section G1. La ligation a été faite dans des conditions telles que décrites dans la section C3 où un rapport de molarité 3 inserts:1 vecteur a été employé.

Des bactéries HB 101 rendues compétentes au CaCl_2 , ont été transformées avec 20 à 40 ng de plasmide ligué, selon Maniatis p.250 (Maniatis et al, 1982).

Les colonies obtenues ont été ensemencées sur pétri contenant 50 µg/ml d'ampiciline et sur pétri contenant 100 µg/ml de tétracycline. Les colonies positives sur ampiciline seulement ont servi à ensemencer 2 ml de L-Broth et ce dans le but d'en faire des mini-préparations d'ADN de plasmides. Le protocole de mini-préparation qui est décrit par Maniatis p. 368 (Maniatis et al, 1982) est tout à fait semblable à celui qui a été adopté pour les grandes quantités. Il est décrit dans la section suivante.

E2. Préparation de plasmides

Plusieurs méthodes d'extraction de plasmides à grande échelle ont été essayées. Les premières ne donnaient pas un rendement suffisant ou bien les plasmides ne se digéraient pas bien avec certains enzymes. Parmi les méthodes essayées, il y en a une où la lyse des cellules se fait par du lysozyme suivi d'une incubation avec du Triton X-100 et après plusieurs extractions au phénol et/ou chloroforme, l'ADN devait être purifié sur un gradient de chlorure de césium. Cette méthode est fastidieuse et donne un faible rendement. Deux autres méthodes dans lesquelles la lyse des cellules se faisait en milieu alcalin ont été essayées. Ces méthodes sont assez rapides et donnent un rendement satisfaisant, mais les plasmides obtenus sont très difficiles à digérer avec certains enzymes. La dernière méthode essayée et que l'on emploie toujours, commence par une amplification des plasmides à l'aide de la spectinomycine. Le reste du protocole nous a été proposé par Promega Biotec. Il consiste en la lyse des bactéries avec une solution 0.2 N NaOH, 1% SDS. Après neutralisation du milieu avec une solution 3 M KAcetate, 2 M acide acétique, on se débarrasse des débris bactériens par centrifugation et on précipite l'ADN du surnageant avec 0.6 volume d'isopropanol. Après centrifugation on resuspend l'ADN dans du TE

et on lui fait subir plusieurs étapes de purification. Premièrement, on ajoute de l'acétate d'ammonium à la solution d'ADN de façon à atteindre 2.5 M. Après centrifugation, on précipite l'ADN du surnageant à l'éthanol. On resuspend ensuite le culot dans du TE et on lui fait subir une RNase (Sigma), 10 µg/ml, 15 minutes à 37⁰C. On amène ensuite la solution à 1.5 M NaCl et 7.5% PEG et on incube sur glace pendant 30 minutes. Après centrifugation on resuspend l'ADN dans du TE et on fait une extraction au chloroforme suivie d'une extraction au phénol/chloroforme 1:1. On précipite ensuite l'ADN à l'éthanol. Après avoir resuspendu le culot dans de l'eau stérile, on refait une extraction au phénol seulement puis on précipite l'ADN à l'éthanol. Finalement l'ADN est resuspendu dans 1 ml d'eau stérile et congelé à -20⁰C.

F. Séquences

La technique de séquence découle du principe de Sanger (Sanger et al, 1977) utilisant les didéoxynucléotides comme terminateurs de synthèse. Ajoutant à ce principe le clonage dans M13, on obtient la technique complète de séquence. Des trousse de séquences sont vendus commercialement (P.L., Biochemical, Pharmacia).

F1. Clonage dans le phage M13

Il faut d'abord choisir le vecteur M13 qui contient le "polylinker" contenant les sites de restriction permettant l'incorporation de fragments d'ADN dans le sens de synthèse désiré. Un choix grandissant de vecteurs "mp" offre les sites courants. Une fois ce vecteur choisi, on coupe l'ADN avec le ou les enzymes impliqués selon les conditions décrites en A3. On peut ensuite traiter ce vecteur

à la phosphatase alcaline (CIAP, (Boehringer) afin de déphosphoryler les sites et ainsi empêcher le vecteur de se religuer sur lui-même.

Pour faire un traitement à la phosphatase alcaline, il faut préparer la quantité voulue d'enzyme, soit 2 unités par μg d'ADN en le centrifugeant et le resuspendant dans l'eau stérile à 1 $\text{u}/\mu\text{l}$. A la solution d'ADN digéré, on ajoute $1/10^{\text{e}}$ volume de 10X tampon CIAP (0.5 M Tris, $\text{pH}=9$, 10 mM MgCl_2 , 1 mM ZnCl_2 , 10 mM spermidine) et 1 $\text{u}/\mu\text{g}$ de CIAP. Après une incubation à 37°C de 30 minutes, on rajoute la même quantité de CIAP et on poursuit l'incubation pendant encore 30 minutes. On fait ensuite une extraction au phénol et une à l'éther puis on précipite à l'éthanol (voir A2). On resuspend l'ADN dans du TE de façon à obtenir 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

Le vecteur est ainsi prêt à recevoir le ou les fragments déjà digérés et prêts à liguer. La ligation se fait dans les mêmes conditions que celles décrites en section C3 sauf pour la ligation des bouts francs où l'on met seulement 0.1 M d'ATP final dans la solution. Pour les bouts cohésifs, on ligue 10 ng de vecteur avec de 2 à 5 ng d'ADN. Pour les bouts francs, on ligue 25 ng de vecteur avec 50 ng d'ADN. Pour le contrôle de ligation, on utilise le vecteur coupé avec un seul enzyme et non-traité à la phosphatase qu'on essaie de religuer sur lui-même.

Quand le ou les fragments sont insérés dans le vecteur, on utilise ce dernier pour transformer des bactéries JM 101. Les cellules JM 101 sont mises en culture dans un milieu YT (0.8% tryptone, 0.5% d'extrait de levure, 0.5% NaCl) jusqu'à l'obtention d'une $\text{D.O.}_{660}=0.3-0.4$. Pour rendre les cellules compétentes, on les refroidit d'abord sur glace puis on les centrifuge. On resuspend le culot

bactérien dans 1/2 volume initial de 50 mM CaCl_2 froid et on incube sur glace 20 minutes. Après centrifugation on resuspend les bactéries dans 1/20 volume initial de 50 mM CaCl_2 froid et on conserve sur glace. La transformation se fait en mettant 0.3 ml de cellules compétentes en présence de 2 à 6 ng d'ADN ligué. On incube 40 minutes sur glace, suivi de 2 minutes à 42°C . On ajoute ensuite 10 μl de 10 mM thiogalactopyranoside 5 (IPTG) et 50 μl de 2% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (XGAL) et 0.2 ml de JM 101 fraîches puis on étale sur milieu YT avec 1.5% agar. Comme contrôle de transformation on utilise du vecteur M13 non-digéré et on lui fait subir les mêmes manipulations. Le vecteur M13 ayant l'opéron Lac, il doit donner des plages bleues dans les conditions décrites précédemment sauf si un fragment d'ADN est incorporé, alors les gènes Lac sont dissociés et deviennent inactifs, ce qui donne des plages blanches.

F2. Préparation du simple brin

Avant d'extraire le simple brin, il faut amplifier les phages des plages blanches qui nous intéressent. Pour ce faire, on prélève les plages blanches à l'aide de cure-dents, on les met dans 2 ml de milieu 2X YT avec 20 μl de JM 101 fraîches et on laisse croître de 6 à 8 heures à 37°C avec agitation constante. Après la croissance, on transfère la culture dans un tube eppendorf et on centrifuge. On précipite les phages provenant de 0.8 ml du surnageant avec 0.2 ml d'une solution 20% PEG, 2.5 M NaCl en incubant 15 minutes à la température de la pièce. Le reste du surnageant est conservé à -20°C . Après centrifugation, on jette le surnageant et on essuie les parois du tube avec un écouvillon. Le culot de phages est resuspendu dans 100 μl de TES (10 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris, pH=7.5). On purifie l'ADN en faisant une extraction

avec 50 μ l de phénol et on précipite à l'éthanol. Le culot d'ADN est resuspendu dans 50 μ l de TES. On vérifie l'incorporation d'un fragment en passant 4 μ l d'ADN simple brin obtenu sur gel d'agarose à 0.8% et en le comparant à l'ADN d'une plage bleue (sans insert).

F3. Réaction de synthèse

L'ADN simple brin des clones choisis d'après le gel d'agarose servira de matrice pour la synthèse en présence de didéoxy. La première étape consiste à faire l'hybridation entre l'amorce et la matrice. Pour ce faire, on met 7 μ l d'ADN simple brin avec 2 μ l d'amorce (13 bp ssDNA, (Pharmacia), 1.5 μ l de tampon de séquence 10X (50 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris, pH=8.0) et 3 μ l d'eau stérile. On incube à 75°C pendant 5 minutes puis on laisse à la température de la pièce de 45 à 60 minutes. Après l'incubation, on ajoute 1 μ l de 0.1 M DTT et 0.75 unité de fragment Klenow de la polymérase (Amersham) à l'ADN hybridé. Pour la synthèse, on prend 3 μ l de cette solution et on le met dans un tube A qui contient déjà 2 μ l de MIX A (300 μ M ddATP, 33 μ M dCTP, 33 μ M dGTP, 33 μ M dTTP, 50 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 10 mM Tris, pH=7.5) et 1 μ l de ^{35}S -dATP. Pour les réactions C, G et T c'est la même chose sauf que le 2 μ l de MIX A est remplacé par 2 μ l de MIX C (66 μ M ddCTP, 1.66 μ M dCTP, 33 μ M dGTP, 33 μ M dTTP et mêmes sels que pour MIX A), 2 μ l de MIX G (66 μ M ddGTP, 1.66 μ M dGTP, 33 μ M dCTP, 33 μ M dTTP et mêmes sels que pour MIX A), et par 2 μ l de MIX T (117 μ M ddTTP, 1.66 μ M dTTP, 33 μ M dCTP, 33 μ M dGTP et mêmes sels que pour MIX A) respectivement. On laisse réagir 20 minutes à la température de la pièce puis on ajoute 1 μ l de la solution "chase" (2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP, 2 mM dTTP, 10 mM Tris, pH=7.5) à chaque tube A, C, G et T et on laisse réagir pour encore 15 minutes à la

température de la pièce. A la fin de la réaction, on ajoute à chaque tube 6 μ l d'une solution 0.1% xylène cyanol F1, 0.1% bleu de bromophénoï, 10 mM EDTA, pH=7.5, 95% de formamide déionisée, on met dans l'eau bouillante pendant 2 minutes. On conserve les réactions à -20°C .

F4. Gel de séquence

Les gels de séquences sont des gels de 6% d'acrylamide avec ou sans gradient de sel. Ces gels sont de dimension 45 cm x 32.5 cm x 0.35 mm d'épaisseur et sont montés sur un appareil Fotodyne. De 2 à 3 μ l de réactions A, C, G et T sont déposés dans les puits. La migration s'effectue à 3000 V, 42 mA et 80 W dans un tampon TBE (2 mM EDTA, 0.1 M Tris-borate, pH=8.3) pendant 2 à 2 1/2 heures pour les gels avec des gradients et pendant 3 à 5 heures pour les gels sans gradient. Quand la migration est terminée, le gel est démoulé puis fixé dans une solution d'acide acétique à 10 % et de méthanol à 10 % pendant 30 minutes. Par la suite le gel est séché sur un séchoir à photo à 175°F pendant 1 1/2 heure. Le gel est ensuite exposé pour autoradiographie pendant 1 ou plusieurs jours.

F5. Lecture et compilation des données

L'autorodiogramme est lu de bas en haut, donnant ainsi la séquence directe. Les séquences sont analysées par ordinateur utilisant les programmes "M13" et "RSITE" du Dr Gibson. Ils permettent de faire des comparaisons, des alignements, la recherche de sites de restriction ainsi que la traduction des séquences données.

RESULTATS

A. Identification du fragment contenant le gène réarrangé

En partant de la séquence de protéine de la chaîne légère de MOPC-460 (Lazure et al, 1981) qui suggérait que le V est réarrangé au J_{K5} , et en se basant sur le clonage du gène réarrangé codant pour une chaîne légère du même sous-groupe que MOPC-460 (Moynet et al, 1985), la grandeur du fragment portant le gène réarrangé de la chaîne légère de MOPC-460 avait été déduite pour se situer autour de 10 Kb. Pour s'assurer de la véracité de cette valeur, une analyse des fragments par hybridation a été effectuée. D'abord l'ADN du myélome MOPC-460 est digéré avec BamH1 et les fragments séparés en quatre fractions par électroélution. Les fractions suivantes ont été obtenues: fraction 1 de 21 à 11.5 Kb, fraction 2 de 11.5 à 9.0 Kb, fraction 3 de 9.0 à 7.4 Kb et la fraction 4 de 7.4 à 5.0 Kb. Ces fractions sont ensuite mises sur un gel d'électrophorèse, avec la digestion BamH1 non-fractionnée, transférées sur "gene screen plus" puis hybridées avec la sonde J_K (décrite dans matériel et méthodes, section C2). Parallèlement, une digestion complète de l'ADN de MOPC-460 avec BamH1 et EcoR1 est hybridée avec la sonde 1.1 (aussi décrite dans matériel et méthodes section C2). La figure suivante montre les autoradiogrammes de ces deux hybridations.

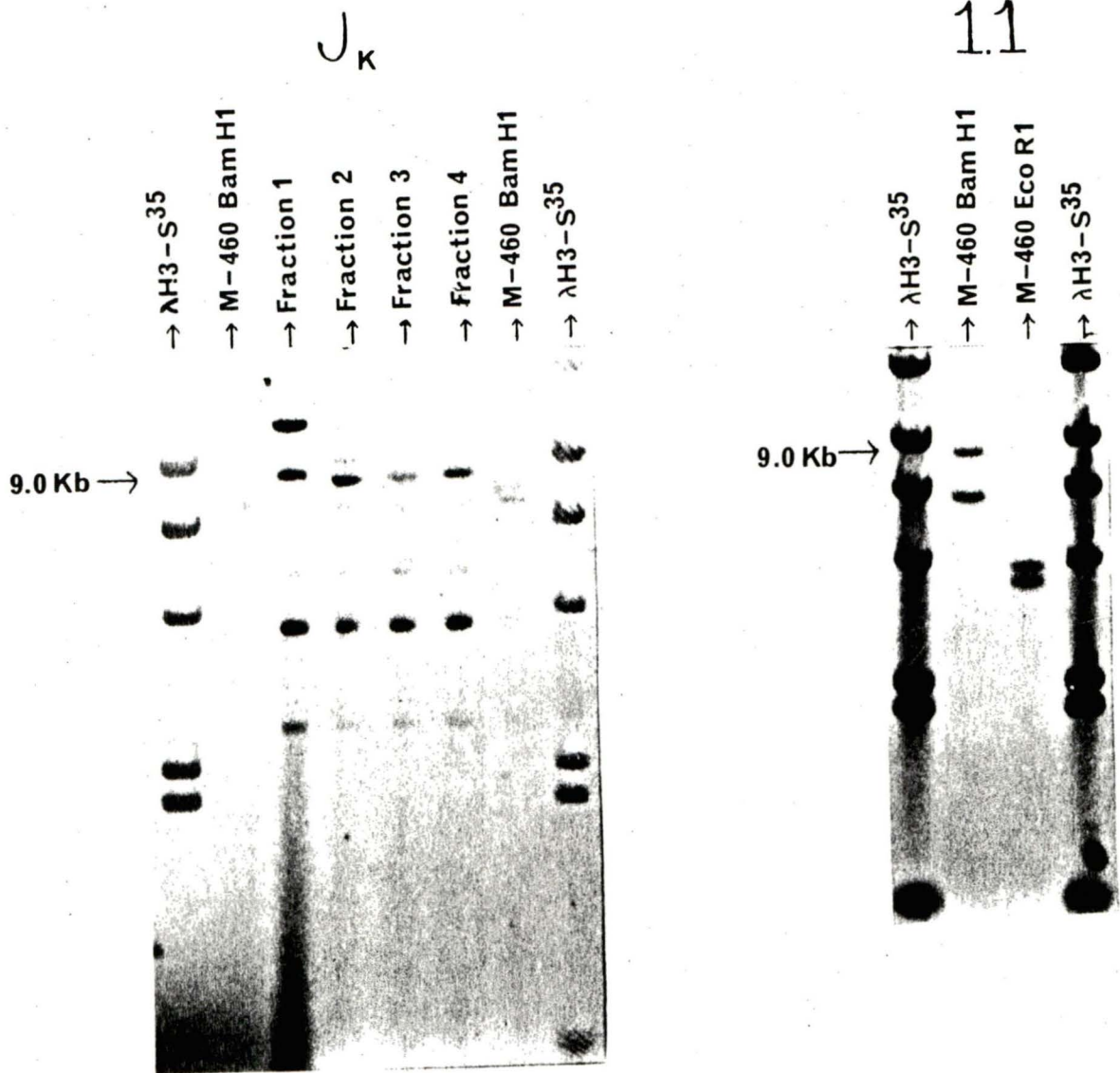


figure 6. Autoradiogramme démontrant le fragment de 9.0 Kb portant le gène réarrangé de la chaîne légère de MOPC-460. (sondes utilisées: J_K à gauche et 1.1, spécifique au V_{K1} , à droite)

Ces résultats confirment la première déduction, soit que le fragment qui contient le gène réarrangé de MOPC-460 est à 9.0 Kb, et ceci parce que ce fragment hybride avec la région J (sonde J_K) aussi bien qu'avec la région V (sonde 1.1). L'autre fragment un peu au-dessus de celui qui est intéressant, qui hybride aussi avec les deux sondes mais avec une intensité beaucoup plus faible, peut être de la contamination par le tissu hôte du myélôme tel qu'il a déjà été observé par Van Ness et al, 1982. Les autres bandes, sous les 5.0 Kb sur l'autoradiogramme J_K, proviennent de la contamination par le plasmide J_K digéré, de la solution BBP servant à l'application des échantillons sur le gel. La fraction 2 dont le fragment de 9.0 Kb hybride plus intensément que celui des autres fractions, a été utilisée pour les étapes subséquentes.

B. Préparation et criblage de la bibliothèque de phages

Le montage d'une bibliothèque de phages commence par la ligation du fragment avec les bras de phage. La bande 2 ayant été choisie, elle a été liguée avec les bras du phage λ L47.1 tel que décrit dans matériel et méthodes, section C1. Quatre rapports de molarité insert:bras ont été essayés et les quatre ont servi pour l'encapsidation in vitro. Ces rapports ont donné environ 1×10^6 pfu/ μ g d'ADN/ml. Il est à noter que ces phages ont été titrés sur des bactéries NM 538 qui, étant permissives, laissent pousser autant les phages non-recombinants que les recombinants.

Le montage de la bibliothèque se poursuit en amplifiant le nombre de phages obtenus. Cette amplification se fait en étalant tous les phages obtenus (sur NM 538) sur cinq grandes boîtes de pétri, les faire se multiplier puis les extraire avec du tampon SM. Ces phages sont ensuite concentrés par gradient discontinu

de chlorure de césium. A la fin la bibliothèque est de 3 ml titrant à 2.2×10^{11} pfu/ml.

Le criblage de la bibliothèque a d'abord été fait en utilisant les bactéries NM 538. De cette manière, 4×10^5 pfu ont été analysés et n'ont montré aucun positif. Le changement des bactéries NM 538 pour des bactéries NM 539, qui sont restrictives, a démontré que 1 phage sur 10 était recombinant. Donc les criblages suivants se sont faits en utilisant des bactéries NM 539. Après un essai, soit 9×10^4 pfu, deux clônes sont apparus, B et B'. Le criblage de la bibliothèque se faisait avec la sonde J_K.

Pour purifier un clône, il faut faire plusieurs passages, c'est-à-dire repiquer une plage positive, l'étaler et l'hybrider, et ce jusqu'à ce que l'hybridation soit homogène donc que toutes les plages hybrident, tel que démontré sur la figure suivante.

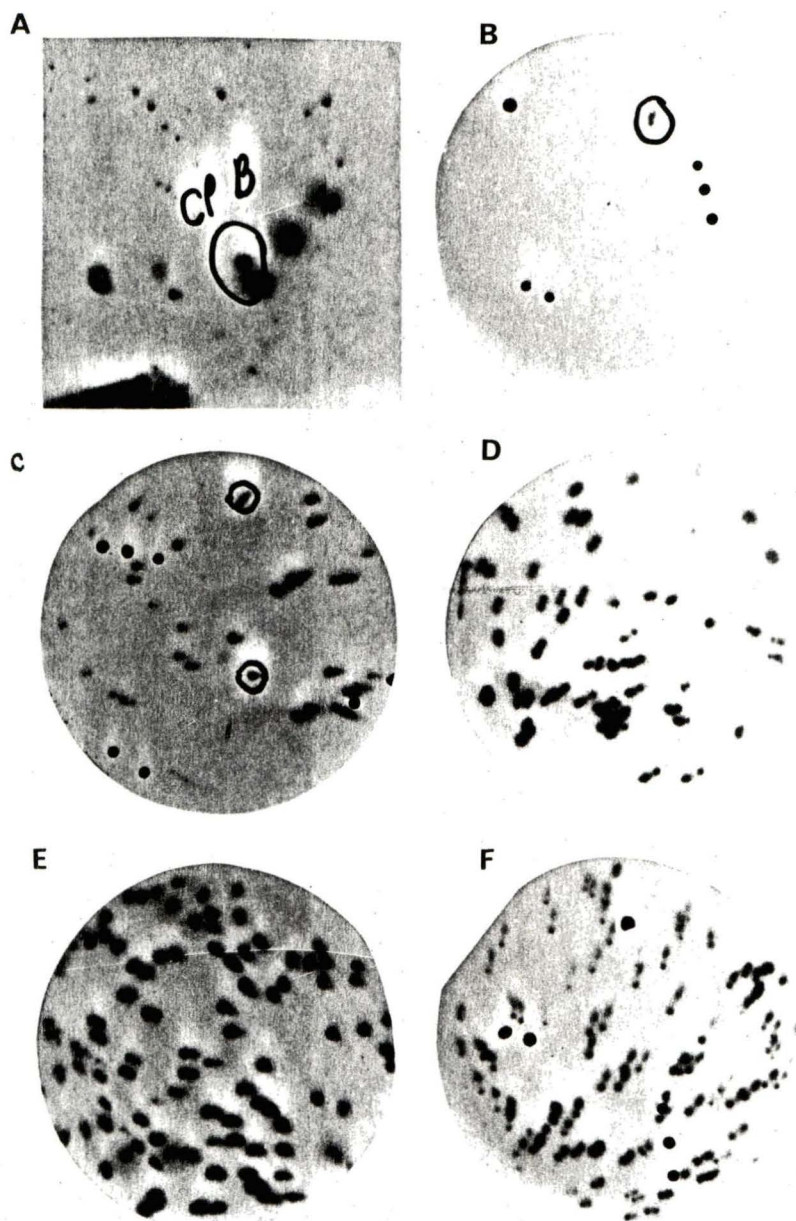


figure 7. Schéma démontant les différentes étapes de purification d'un clône: A- identification du clône, B- premier passage de purification, C- 2^e passage, D- 3^e passage; tous ces passages sont hybridés avec J_K et faits en duplicata, F- hybridation de LLC avec 0.88.

Dès le premier passage le clône B' s'est avéré être un faux positif et a donc été rejeté. Il aura fallu quatre passages au clône B pour être purifié. Puis finalement, le clône appelé LLC a été hybridé avec la sonde 0.88 en plus de la sonde J_K dans le but de démontrer que ce phage contenait bien le gène réarrangé de la chaîne légère de MOPC-460.

C. Sous-clônage dans le plasmide pBR-322

Afin de sous-clôner le fragment BamH1-BamH1 de 9.0 Kb qui contient le gène réarrangé de la chaîne légère de MOPC-460, il a d'abord fallu l'extraire du phage. Cette préparation d'ADN s'est faite à partir de 5×10^{12} pfu qui ont fourni 30 μ g d'ADN de phage, qui ont été coupés avec BamH1. Le plasmide pBR 322 a aussi été digéré avec BamH1 puis traité à la phosphatase alcaline. La ligation a été effectuée avec un rapport de molarité de 3 insert:1 vecteur. De 20 à 40 ng d'ADN ligué ont servi pour les transformations. Des 160 colonies qui ont poussé sur des pétris contenant de l'ampiciline, 40 ont été criblées sur ampiciline et sur tétracycline en vue de démontrer l'incorporation d'un fragment au site BamH1. Et de ces 40 colonies apparemment toutes positives, 20 mini-préparations d'ADN ont été effectuées. Seulement 2 des 20 colonies testées démontraient l'incorporation de plasmide. Après digestion avec BamH1, seulement le clône #11 semblait avoir incorporé le bon fragment de 9.0 Kb. Afin de vérifier, ce clône a été analysé par hybridation avec J_K et 0.88. La figure suivante montre bien que le fragment de 9.0 Kb hybride bien avec les deux sondes. Le plasmide pBR 322 hybride avec la sonde 0.88 parce que cette dernière est portée par ce plasmide lors de l'hybridation. Le clône se nomme maintenant MLC (MOPC light chain).

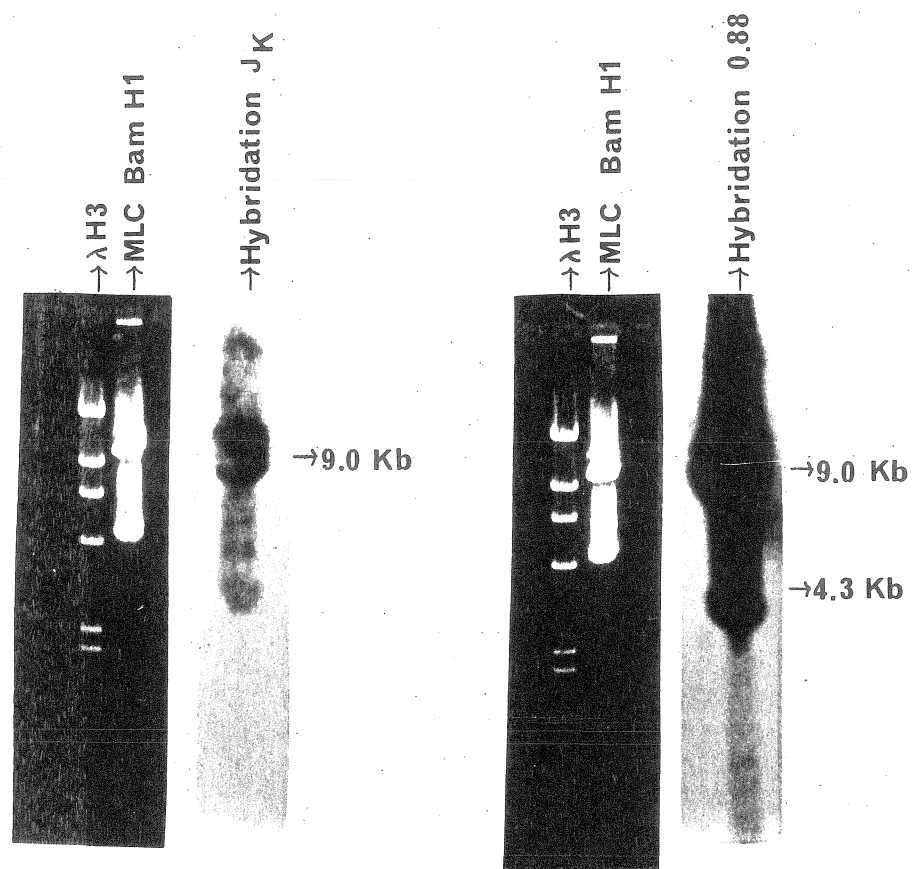


figure 8. Gel d'agarose portant la digestion BamH1 de MLC et hybridation de cette digestion avec J_K et 0.88. Confirmation de l'incorporation du fragment de 9.0 Kb portant le gène réarrangé de la chaîne légère de MOPC-460, dans pBR 322.

D. Carte de restriction

La carte de restriction consistait seulement à vérifier la position des sites des enzymes de restriction courants par rapport à celle du gène de T-105 (Moynet et al, 1985). T-105 est le gène réarrangé de la chaîne légère K du myélome TEPC-105. D'après la séquence protéique, le gène V qui code pour la chaîne légère de MOPC-460 est le même que celui de TEPC-105, mais ayant réarrangé avec J_{K5} au lieu de J_{K1} . Donc la confirmation de l'emplacement des sites de restriction du clone MLC s'est faite en vérifiant la grandeur des

fragments obtenus par digestion avec les enzymes XbaI, TaqI, HindIII, EcoRI, PstI, PvuII et KpnI. Ces digestions ont été analysées sur gel d'agarose tel que présenté à la figure suivante:

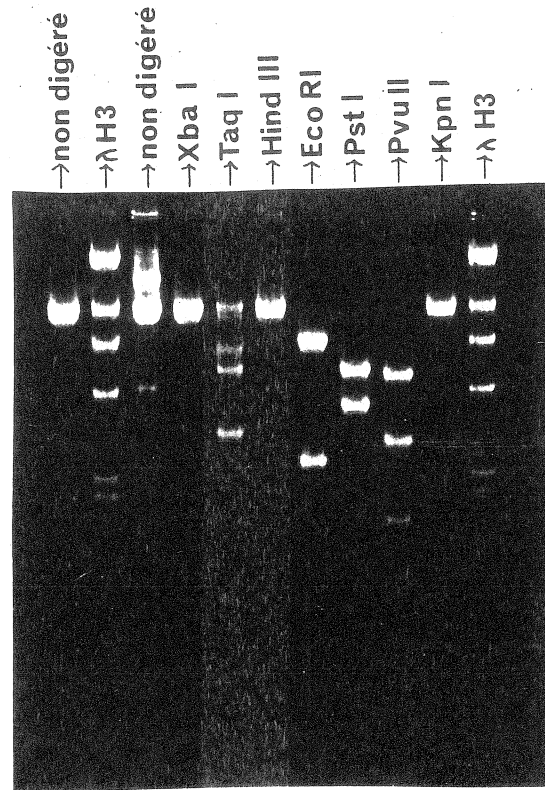


figure 9. Gel d'agarose présentant les digestions de MLC avec plusieurs enzymes et confirmant l'homologie avec T-105.

Tableau 2. Tableau des grandeurs de fragment prévues selon la carte de restriction de T-105 (Moynet et al, 1985) et des fragments obtenus sur le gel de la figure 9.

ENZYME	DIGESTION	FRAGMENTS ATTENDUS (Kb)	FRAGMENTS OBTENUS (Kb)
XbaI	non	3.6 5.4	-
TaqI	partielle	3.0 5.8	1.1 1.3 3.0 5.0 6.3
HindIII	non	1.1 1.2 1.8 2.3 2.6	-
EcoRI	complète	0.3 2.4 6.2	0.4 2.4 6.0
PstI	complète	0.4 3.6 5.0	0.54 3.6 5.0
PvuII	complète	1.4 3.1 4.4	1.55 2.8 4.6
KpnI	partielle	0.1 3.9 4.8	4.4 5.2

Les grandeurs des fragments obtenus étant identiques à celles qui étaient prévues, on en déduit donc que la chaîne légère K du myélôme MOPC-460 est bel et bien codée par le même gène que celle du myélôme TEPC-105, soit V_{K1A} . La carte de restriction est donc sensiblement la même pour ces deux myélôme sauf pour ce qui est de la région J_{K1} à J_{K4} qui est absente chez MOPC-460. Ces renseignements sur les sites de restriction sont suffisants pour passer à la séquence.

E. Séquence

E1. Sous-clônage dans le phage M13

La partie intéressante à séquencer est la région VJ ainsi que la partie flanquante en 5' du V parce que ce sont ces régions qui sont le plus sujettes aux mutations somatiques et qu'elles contiennent toutes les séquences responsables de l'expression du gène. De plus, la région $J_K C_K$ est bien connue (Sakano et al, 1979). Donc pour séquencer la région VJ, il faut examiner les sites de restriction qui, tout en étant communs avec ceux du vecteur M13, fournissent des fragments de 400 bp et moins. Parmi ces sites, PstI et PvuII sont très appropriés. Cependant le clônage avec PvuII n'a jamais fonctionné. La figure suivante montre la stratégie de séquence employée. On y voit les sites utilisés, la direction et la longueur des séquences obtenues.

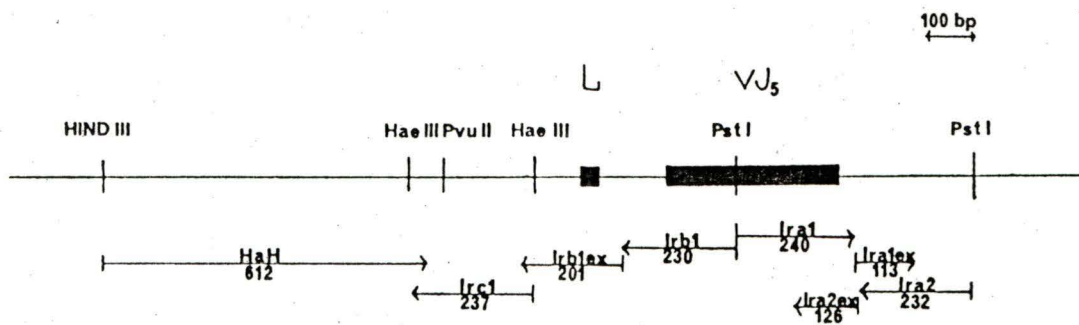


figure 10 Stratégie de séquence présentant les sites utilisés, le noms des clônes, la longueur et la direction des séquences obtenues.

Quand le clonage est réussi, il ne reste qu'à faire les réactions de synthèse et les passer sur des gels d'acrylamide dont la résolution est à la base près. Après avoir exposé le gel à un autoradiogramme, on en déduit directement la séquence en lisant les bases à partir du bas de l'autoradiogramme. Un tel exemple de gel est présenté à la figure suivante.



figure 11. Exemple de gel de séquence, gel d'acrylamide 6% avec gradient de sel exposé pendant 24 heures pour autoradiographie.

E2. Séquence de la région VJ_{K5}

La séquence obtenue part de 340 bp en 5' du leader et va jusqu'à 267 bp en 3' du J_{K5} . On y retrouve plusieurs sites importants pour l'expression tels le signal de début de la transcription ou "cap site", une pseudo-TATA-box localisée à environ 30 bp du "cap site" puis une séquence très semblable à l'octamère impliqué dans l'activité du enhancer (Parslow et al, 1984). Ce qui différencie l'octamère de celui qui est décrit dans la littérature est la première base où un T a substitué un A et son emplacement: pour MOPC-460 cet octamère est localisé à 110 bp du L tandis que celui de Parslow est à 70 bp du L. Un autre site important pour l'expression est le site d'épissage constitué du GT à la fin du L et du AG au début du V. L'intron qui sépare le L et le V est de 382 bp, un des plus long observé pour les gènes K.

Le site d'épissage du J_{K5} commence aussi par un GT mais la séquence située un peu après ce site est ambiguë. La région ambiguë est marquée d'étoiles sur la figure 12. Cette ambiguïté vient du fait que lorsque cette séquence est séquencée dans le sens 5' → 3' on obtient la séquence TAACAAC et lorsqu'elle est séquencée dans le sens 3' → 5' la séquence TACAC est obtenue. Ces résultats, probablement dûs à des problèmes techniques, ont été obtenus aussi pour la séquence de T-105 (Moynet et al, 1985), de la région J_K de FLOPC-1 et la région embryonnaire de Balb/c (laboratoire de Dr Gibson). Cette région fait partie de la région consensus pour l'épissage décrite par Mount (1982). Le fait que la région qui présente des difficultés de synthèse soit la région qui code pour la structure de reconnaissance pour l'épissage ne peut pas être une coïncidence. Il y a probablement quelque chose à ce site qui perturbe les réactions de synthèse.

AAGCTTACCAGTTATTAACAAAATCCACTCGCAATCGTCTGGGTGAAAAATAAATATACATTTCTTTTATTGAGGAGACAGCCCTGTGTGAGTCATATT 100
 CCTGGTATCTCGGGTGCCTTATCTGTGAACACTCTACAGCATAGAAGAGGTTTTGTGTCACTTTTAAATCTTAACTAGTCTATATAACTCTTCCTTCTAT 200
 ACTGCAACACTAAAGGGAGCTTTTGCATATTGCTCCCCAGGGAGGGCCCCACCCTTACTAGTCTGAGATAAAAGCTCAGCTGTCTTGTTCAGTGACTGAT 300
 "cap site" LEADER se
 CAGTCTCCTCAGGCTGTCTCCTCAGGTTGCCTCCTCAAAATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCTGGTGAGGAGAGAGGGA 400
 M K L P V R L L V L M F W I P
 AGTGAGGGAGGAGAATGGACAGGGAGCAGGAGCCTGAATCCCATTGCTCATTCCATGTATTCTGCCATGGGTGAGAAGATGGGTCTTATCCTCCAGCAT 500
 GGGGCCTCTGGGGTGAATACTTGTAGAGGGAGGTTCCAGATGGGAACATGTGCTATAATGAAGATTATGAAATGGATGCCTGGGATGGTCTAAGTAATG 600
 CCTAGAAGTACTAGACACTTGC AATTCACTTTTTTGGTAAGAAGAGAATTTTAGGATATAAAAAATGGTATGTA AAAATAAACATCACAGTTGAAAT 700
 AAAAAAAAAACATAAGGATGTTTCATGAATTTTGTGTGTA ACTATGTATTCTCTCTCATTGTTTCA ^{se}AGCTTCCAGCAGTGATGTTGTGATGACCCAAACTC 800
 A S S S D V V M T Q T
 CACTCTCCCTGCCTGTCTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTGTACACAGTAATGAAACACCTATTTACATTGGTA 900
 P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y L H W Y
 REGION VARIABLE
 CCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAGCTCCTGATCTACAGATTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACA 1000
 L Q K P G Q S P K L L I Y E V S N R F S G V P D R F S G S G S G T
 < REGION J (J5)
 GATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTTTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCGGTCCAGTTCGGTGGTGGCACCA 1100
 D F T L K I S R V E A E D L G V F F C S Q S T H V P L T F G A G T
 AGCTGGAGCTGAAACGTAAGTACACTTTTCTCATCTTTTTTATGTGTAAGACACAGGTTTTTCATGTTAGGAGTTAAAGTCAGTTCAGAAAATCTTGAGA 1200
 K L E L K R
 AAATGGAGAGGGCTCATTATCAGTTGACGTGGCATACTAGTGTGAGATTTTCTGTTTATCAAGCTAGTGAGATTAGGGGCAAAAAGAGGCTTTAGTTGAGA 1300
 GAAAGTAATTAATACTATGGTACCATCCAAGAGATTGGATCGGAGAATAAGCATGAGTAGTATTGAGATCTGGGTCTGACTGCAG 1387

figure 12. Séquence traduite de MLC présentant quelques sites nécessaires à l'expression: oc est l'octamère; se est le site d'épissage et ***** est la région ambiguë.

Quand on compare la séquence de T-105 avec M-460, on remarque deux différences situées dans le V. Ces différences amènent des changements d'acide aminés: A→G transforme une lysine en acide glutamique au résidu #45 et un A→T transforme une tyrosine en phénylalanine à la position 86. Ces différences expliquent le déplacement de 2 unités de charge du patron de bandes sur le gel de focalisation isoélectrique pour la chaîne légère de M-460. Ces différences proviennent de mutations somatiques par rapport à T-105 qui elle, représente probablement la séquence germinale étant donné que sa séquence est identique à celle de plusieurs autres myélômes. La figure suivante présente la comparaison de la séquence de T-105 et M-460. On y voit l'identité de la région flanquante en 5' de V, les deux mutations somatiques dans la région V ainsi que les différences au niveau de J qui confirment que les chaînes légères de ces deux myélômes sont codées par le même V, V_{K1A}, et par des J différents.

```

AAGCTTACCAGGTTATTAACAAAATCCACTCGCAATCGTCTGGGTGAAAAATAAATATACATTTCTTTTATTGAGGAGAC 80
-----
AGCCCTGTGTGAGTCATATTCCTGGTATCTCGGGTGCTTATCTGTGAACACTCTACAGCATAGAAGAGGTTTTGTGTAC 160
-----
TTTTAAAATCTTAACTAGTCTATAATACTCTTCCTTCTACTGCAACACTAAAGGGAGCTTTTGCATATTGCTCCCCAG 240
-----
GGAGGGCCACCCCTTACTAGTCTGAGATAAAAAGCTCAGCTGCTTGTTCAGTGACTGATCAGTCTCCTCAGGCTGTCTC 320
-----
CTCAGGTTGCCCTCTCAAATGAAGTTGCCCTGTTAGGCTGTTGGTGTGATGTTCTGGATTCTGGTGAGGAGAGAGGGA 400
-----
AGTGAGGGAGGAGAATGGACAGGGAGCAGGAGCACTGAATCCCATTGCTCATTCCATGTATTCTGCCATGGGTGAGAAGA 480
-----
TGGGTCTTATCCTCCAGCATGGGCCCTCTGGGGTGAATACTGTAGAGGGAGGTCCAGATGGGAACATGTGCTATAAT 560
-----
INTRON
GAAGATTATGAAATGGATGCCCTGGGATGGTCTAAGTAATGCCTAGAAGTGAAGTACTAGACACTTCCAATTCACTTTTTGGT 640
-----
AAGAAGAGAATTTTAGGATATAAAAAATGGTATGTAATAAATAAACATCACAGTTGAAATAAAAAAAAAACATAAGGATG 720
-----
TTCATGAATTTTGTGTACTATGTATTTCTCTCATTTGTTTCAGCTCCAGCAGTGATGTTGTGATGACCCAACTC 800
-----
CACTCTCCCTGCCCTGTAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGA 880
-----
REGION VARIABLE
AACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTC 960
-----
TGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATITCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATC 1040
-----
TGGGAGTTTCTTCTGCTCTCAAAGTACACATGTTCCGCTCAGGTTCCGGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGT 1117
-----
TGC-----CA--C-----AA-C-----AAG

```

figure 13. Comparaison des séquences de la région VJ de M-460, en haut, et de T-105, en bas. Les - représentent des identités et les \square , des mutations somatiques.

Donc la séquence du gène réarrangé de la chaîne légère du myélôme MOPC-460 aura levé les ambiguïtés laissées par la séquence protéique, confirmé une différence et apporté une autre par rapport à T-105; ces différences provenant sûrement de mutations somatiques.

DISCUSSION

Le but de ce travail consistait à clôner et séquencer le gène réarrangé codant pour la chaîne légère du myélôme MOPC-460. Pour ce faire, il a d'abord fallu identifier le fragment d'ADN digéré qui porte ce gène. L'hybridation avec une sonde de la région V_{K1} et une autre de la région J_K a permis de situer ce fragment à 9.0 Kb. Ensuite des fragments de 11.5 à 9.0 Kb ont été insérés dans le phage L47.1 dans le but de construire une bibliothèque. Après criblage de la bibliothèque, un seul bon clône a été isolé et purifié. Puis le sous-clônage dans pBR 322 et quelques digestions avec des enzymes de restriction du fragment MLC 9.0 Kb, ont permis de démontrer l'identité entre le gène de M-460 et celui de T-105. A partir de ce moment, il n'y avait plus aucun doute quant à l'appartenance de la chaîne légère de MOPC-460 au sous-groupe V_{K1A} .

La région séquencée du gène M-460 contient tous les sites nécessaires à l'expression situés en 5' du L, le L, le V, le J_{K5} ainsi qu'une partie de l'intron $J_K C_K$. Ces résultats de séquence ont permis de lever cinq ambiguïtés laissées par la séquence protéique parmi lesquelles se trouvaient les trois premiers acides aminés du J_{K5} . Mais surtout, cette séquence a permis de classer définitivement la chaîne légère de MOPC-460 dans le bon sous-groupe. Ce qui finalement donne le classement présenté à la figure suivante.

L'assurance que la chaîne légère de MOPC-460 est codée par un gène V_{K1A} vient de l'identité parfaite de la séquence flanquante en 5' du V pour les gènes M-460 et T-105. Précédemment, M-460 avait été classée dans le sous-groupe V_{K1D} . Gibson (Gibson, 1984) avait estimé que les chaînes du sous-groupe V_{K1A} constituaient 2.9% de toutes les chaînes légères analysées. Maintenant que l'on sait que le sous-groupe V_{K1D} est en fait codé par le gène V_{K1A} , on peut dire que les chaînes V_{K1A} forment une grande portion du répertoire des chaînes légères de souris.

La séquence de la région variable de MOPC-460 a confirmé la substitution Tyr-Phe de la position 86 par un changement de nucléotide A→T. Une autre substitution, qui dans la séquence protéique paraissait très ambiguë, s'est révélée à la position 45. Cette substitution A→G entraîne le changement d'un résidu Lys pour un résidu Glu par rapport à la séquence de T-105, qui elle est considérée comme étant la séquence germinale. Récemment, le gène germinale V_{K1A} de Balb/c a été cloné et séquencé (Corbet et al, 1987). Cette séquence est identique à celle de T-105 d'où la confirmation de T-105 comme prototype de la séquence germinale. Les substitutions de M-460 ne sont explicables que par des mutations somatiques dans la région V. Ces mutations sont dûes à un mécanisme localisé, propre aux gènes d'immunoglobuline. Le fait qu'une des deux mutations soit partagée par un autre myélôme, TEPC-821, peut être purement aléatoire. Même si le gène M-460 provient d'un myélôme dont les cellules ont subi plusieurs passages de culture, ce n'est pas suffisant pour expliquer les mutations observées. Nishioka et Leder, 1980 démontre que la séquence germinale K2 a été répliquée sans modification à travers la différenciation des lymphocytes, à travers 15 ans de passages de culture et à travers les procédures in vitro utilisées pour le clonage et la séquence. D'autres exemples de séquence

de gènes d'immunoglobuline de myélôme ne montrent aucune différence par rapport à la séquence germinale, provenant d'embryons (Seidman et al, 1979; Max et al, 1980). Donc les mutations observées chez M-460 n'ont probablement pas été provoquées par les manipulations des cellules ou de l'ADN, mais viennent plutôt du mécanisme de mutation somatique propre aux gènes d'immunoglobulines.

Pour ce qui est de la portion de séquence qui présente une ambiguïté, c'est-à-dire les quelques nucléotides situés au site d'épissage du J_{K5} , il n'y a pas d'explication autre que des problèmes techniques de synthèse causés par le site d'épissage dont les fins détails sont inconnus pour le moment.

Dans le futur, le gène réarrangé de la chaîne légère de MOPC-460 pourra servir dans plusieurs expériences. Ce gène pourra être cloné dans des lymphocytes pour étudier l'effet qu'auront des changements mineurs d'acides aminés sur l'idiotype ou sur la spécificité de liaison à l'antigène. Ce gène pourrait aussi être transféré, avec celui de la chaîne lourde, dans des cellules de myélôme dans le but de reconstituer une immunoglobuline anti-DNP ou encore transfecté dans des cellules-souches normales de la moelle épinière puis injecté dans une souris incapable de produire des V_{K1A} pour voir s'il y aurait induction de la capacité de produire ces chaînes. Finalement, ce gène pourrait servir à la construction d'anticorps chimériques où la région constante de souris est remplacée par la région constante humaine, par un enzyme ou par une toxine.

CONCLUSION

Ce travail, en plus de permettre l'apprentissage et la maîtrise de plusieurs techniques de biologie moléculaire, apporte plusieurs informations concernant la caractérisation des chaînes légères V_{K1} . Par sa séquence, le gène M-460 reclasse la chaîne légère dans le bon sous-groupe, V_{K1A} , en plus de remplir les trous laissés par la séquence protéique. Une connaissance plus approfondie des chaînes légères V_{K1} s'obtiendra par la comparaison de plusieurs gènes V_{K1} . Le gène M-460 est un pas dans cette direction.

REMERCIEMENTS

Merci au Dr David Gibson pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Le Dr Gibson, tout en laissant place à beaucoup d'initiative, prodigue de précieux conseils.

Merci à Sheila MacLean pour l'enseignement des techniques de base de clonage.

Merci à Diane Cloutier pour ses conseils et son assistance pour la séquence.

Merci à toute l'équipe du laboratoire pour son soutien.

Et finalement, merci à mon mari, Patrice, d'avoir été là.

REFERENCES

- Alt FW, Yancopoulos GD, Blackwell TK, Wood C, Thomas E, Boss M, Coffman R, Rosenberg N, Tonegawa S, Baltimore D, (1984), Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments, *EMBO J.* 3: 1209-1219.
- Altenburger W, Steinmetz M, Zachau HG, (1980), Fonctionnal and non-fonctionnal joining of immunoglobulin light chain genes of a mouse myeloma, *Nature* 287: 603-607.
- Banerjee M, Wiener F, Spira J, Banonits M, Nilsson MG, Sumegi J, Klein G, (1985), Mapping of the c-myc, pvt-1 and immunoglobulin kappa genes in relation to the mouse plasmacytoma associated variant (6,15) translocation breakpoint, *EMBO J.* 4: 3183-3188.
- Barstad P, Hubert J, Hunkapiller M, Goetze A, Schilling J, Black B, Eaton B, Richards J, Weigert M, Hood L, (1978), Immunoglobulins with hapten-binding activity structure-fonction correlations and genetic implications, *Eur. J. Immunol.* 8: 497-503.
- Bentley DL, Farrell PJ, Rabbitts TH, (1982), Unrearranged immunoglobulin variable region genes have a fonctionnal promoter, *NAR* 10: 1841-1856.
- Benton WD, Davis RW, (1977), Screening gt recombinants clones by hybridation to single plaques in situ, *Science* 196: 180-182.
- Berek C, Griffiths GM, Milstein C, (1985), Molecular events during the maturation of the immune response to oxazolone, *Nature* 316: 412-418.
- Bernard O, Hozumi N, Tonegawa S, (1978), Sequences of mouse immunoglobulin in light chain genes before and after somatic changes, *Cell* 15: 1133-1144.
- Boyd TR, Goldrick MM, Gottlieb PD, (1986), Genetic polymorphism at the mouse

immunoglobulin J_K locus (IgKJ) as demonstrated by southern hybridation and nucleotide sequence, *Immunogenetics* 24: 150-157.

Brenner S, Milstein C, (1966), Origin of antibody variation, *Nature* 211: 242-243.

Brodeur PH, Riblet R, (1984), The immunoglobulin heavy chain variable region (Igh-V) locus in the mouse; I-One hundred Igh-V genes comprise seven families of homologous genes, *Eur. J. Immunol.* 14: 922-930.

Cabilly S, Riggs AD, Pande H, Shively JE, Holmes WE, Rey M, Perry LJ, Wetzel R, Heynecker, (1984), Generation of antibody activity from immunoglobulin polypeptide chains produced in *Escherichia coli*, *PNAS* 81: 3273-3277.

Clarke SH, Kenny JJ, Seikman DG, Rudikoff S, (1984), Amino acid sequence of a phosphorylcholine-binding antibody from an immune defective CBA/N mouse employing the T15 V_H region associated with an unusual $D_H:J_H$ and V_K segments, *J. Immunol.* 132: 1544-1549.

Corbet S, Milili M, Fougereau M, Schiff C, (1987), Two V_K germline genes related to the GAT idiotype network (B1NAB3/ab1') account for the major subfamily of the mouse V_{K1} variability subgroup, *J. Immunol.* 138: 932-939.

Cory S, Kemp DJ, Bernard O, Gough N, Gerondakis S, Tyler B, Webb E, Adams JM, (1981), Number and organization of immunoglobulin variable region genes in the mouse, *INC-UCLA Symp. Mol. Cell. Biol.* Academic Press p.49-58.

Crews S, Griffin J, Huang H, Calame K, Hood L, (1981), A single V_H gene segment encodes the immune response to phosphorylcholine: somatic mutation is correlated with the class of antibody, *Cell* 25: 59-66.

Davis RW, Botstein D, Roth JR, (1980), A manual for genetic engineering: Advanced bacterial genetics, Cold Spring Harbor, New York.

- Dreyer WJ, Bennett CJ, (1965), The molecular basis of antibody formation: a paradox, PNAS 54: 864-868.
- Dzierzak EA, Janeway CA, Rosenstein RW, Gottlieb PD, (1980), Expression of an idiotype (Id-460) during in vivo anti-dinitrophenyl antibody responses: I. Mapping of genes of Id-460 expression to the variable region of immunoglobulin heavy-chain locus and to the variable region of immunoglobulin K-light-chain locus, J. Exp. Med. 152: 720-729.
- Dzierzak EA, Brodeur P, Marion T, Janeway CA, Bothwell A, (1985), Molecular characterisation of antibodies bearing Id-460. II. Molecular basis for Id-460 expression, J. Exp. Med. 162: 1494-1511.
- Early P, Huang H, Davis M, Calame K, Hood L, (1980), An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: V_H , D and J_H , Cell 19: 981-992.
- Enquist L, Sternberg N, (1979), In vitro packaging of λ Dam vectors and their use in cloning DNA fragments, Methods in enzymology 68: 281-298.
- D'Eustachio P, Pravcheda D, Marcu K, Ruddle FH, (1980), Chromosomal location of the structural gene cluster encoding murine Ig heavy chains, J. Exp. Med. 151: 1545-1550.
- Falkner FG, Zachau HG, (1984), Correct transcription of an immunoglobulin K gene requires an upstream fragment containing conserved sequence elements, Nature 310: 71-74.
- Fougereau M, Rocca-Serra J, Schiff C, Tonnelie C, (1984), Molecular analysis of the anti GAT repertoire in three strains of mice, Ann. Inst. Pasteur 135: 69-75.
- Gearhart PJ, Bogenhagen DF, (1983), Clusters of point mutations are found exclusively around rearranged antibody variable genes, PNAS 80: 3439-3443.

- Gershenfeld HK, Tsukamoto A, Weissman IL, Joho R, (1981), Somatic diversification is required to generate the V_K genes of MOPC-511 and MOPC-167 myeloma proteins, PNAS 78: 7674-7678.
- Gibson DM, Taylor BA, Cherry M, (1978), Evidence for close linkage of a mouse light chain marker with the Ly2,3 locus, J. Immunol. 121: 1585-1590.
- Gibson DM, MacLean SJ, (1979), EF2: a new Ly3 linked light chain marker expressed in normal mouse immunoglobulin, J. Exp. Med. 149: 1477-1486.
- Gibson DM, (1984), Evidence for 65 electrophoretically distinct groups of light chains in Balb/c and NZB myelomas, Mol. Immunol. 21: 421-432.
- Gillies SD, Morrison SL, Oi VT, Tonegawa S, (1983), A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major of a rearranged immunoglobulin chain gene, Cell 33: 717-728.
- Heinrich G, Traunecker A, Tonegawa S, (1984), Somatic mutation creates diversity in the major group of mouse immunoglobulin K light chains, J. Exp. Med. 159: 417-435.
- Hochtl J, Zachau HG, (1983), A novel type of aberrant recombination in immunoglobulin genes and its implications for VJ joining mechanism, Nature 302: 260-262.
- Honjo T, Habu S, (1985), Origine of immune diversity: genetic variation and selection, Ann. Rev. Biochem. 54: 803-830.
- Hood L, Kronenberg M, Hunkapiller T, (1985), T cell antigen receptor and the immunoglobulin supergene family, Cell 40: 225-229.
- D'Hoostelaere LA, Jouvin-Manche E, Huppi K, (1985), Localization of $C_{T\beta}$ and C_K on the mouse chromosome 6, Immunogenetics 22: 277-283.
- D'Hoostelaere LA, Gibson DM, (1986), The organization of immunoglobulin variable Kappa chain genes on mouse chromosome 6, Immunogenetics 23:

260-265.

- Hozumi N, Tonegawa S, (1976), Evidence of somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for the variable and constants regions, PNAS 73: 3628-3632.
- Hum WT, Lazure C, Lavigueur A, MacLean SJ, Gibson DM, (1984), Structure and genetic control of $V_{\kappa-1}$ light chains, Ann. Immunol. 135c: 163-170.
- Jaffe BM, Eisen HN, Simms ES, Potter M, (1969), Myelome proteins with anti-hapten antibody activity: ρ -2,4-dinitrophenyl lysine binding by the protein produced by mouse plasmacytoma MOPC-460, J. Immunol. 103: 872-874.
- Jaffe BM, Simms ES, Eisen HN, (1971), Specificity and structure of the myeloma protein produced by mouse plasmacytoma MOPC-460, Biochemistry 10: 1693-1699.
- Kaartinen M, Griffiths GM, Hamlyn PH, Marklam AF, Karjalainen K, Pelkone JLT, Malela O, Milstein C, (1983), Anti-oxazolone hybridomas and the structure of the oxazolone idotype, J. Immunol. 130: 937-945.
- Lazure C, Hum WT, Gibson DM, (1980), A major group of Kappa chains controlled by the chromosome 6 locus IgK EF2, J. Exp. Med. 152: 555-564.
- Lazure C, Hum WT, Gibson DM, (1981), Sequence diversity within a subgroup of mouse Kappa chains controlled by the IgK EF2 locus, J. Exp. Med. 154: 146-155.
- Lederberg J, (1959), Genes and antibodies, Science 129: 1649-1653.
- Lenhard-Schuller R, Hohn B, Brack C, Hiramama M, Tonegawa S, (1978), DNA clones containing mouse immunoglobulin K chain genes isolated by in vitro packaging into phage coats, PNAS 75: 4709-4713.

- Lewis S, Rosenberg N, Alt F, Baltimore D, (1982), Continuing Kappa-gene rearrangement in a cell line transformed by Abelson Murine Leukemia Virus, *Cell* 30: 807-816.
- Lewis S, Gifford A, Baltimore D, (1985), DNA elements are assymmetrically joined during the site-specific recombinaison of Kappa immunoblogulin genes, *Science* 228: 677-685.
- Loenen WAM, Brammar WJ, (1980), A bacteriophage Lambda vector for cloning large DNA fragments made with several restriction enzymes, *Gene* 20: 249-259.
- Malissen M, McCoy C, Blanc D, Trucy J, Devaux C, Schmitt-Verhust AM, Fitch F, Hood L, Malissen B, (1986), Direct evidence for chromosomal inversion during T-cell receptor β -gene rearrangements, *Nature* 319: 28-33.
- Maniatis T, Fritch EF, Sambrook KJ, (1982), *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbour, New York.
- Marion TN, Dzierzak EA, Lee HS, Adams RL, Janaway CA, (1984), Non-dinitrophenyl-binding immunoglobulin that bears a dominant idotype (Id-460) associated with antidinitrophenyl antibody is specific for an antigen on *Pasteurella pneumotropica*, *J. Exp. Med.* 159: 221-233.
- Mather EL, Perry RP, (1981), Transcription regulation of immunoglobulin V genes, *NAR* 9: 6855-6865.
- Mather EL, Perry RP, (1983), Methylation status and DNase I sensitivity of immunoglobuline genes: changes associated with rearrangement, *PNAS* 80: 4689-4693.
- Max EE, Seidman JG, Miller H, Leder P, (1980), Variation in the crossover point of Kappa immunoglobulin gene V-J recombination: evidence from a cryptic gene, *Cell* 21: 793-799.
- McKean D, Huppi K, Bell M, Staudt L, Gerhard W, Weigert M, (1984),

Generation of antibody diversity in immune response of Balb/c mice to influenza virus hemagglutinin, PNAS 81: 3180-3184.

Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT, (1984), Chimeric antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human region domains, PNAS 81: 6851-6855.

Mount SM, (1982), A catalogue of splice junction sequences, NAR: 10: 459-472.

Moynet D, MacLean SJ, NG KH, Anctil D, Gibson DM, (1985), Polymorphism of K variable region (V_{K-1}) genes in inbred mice: relationship to the IgK EF2 serum light chain marker, J. Immunol. 134: 3455-3460.

Mudsett-Hunter M, Margolies MN, Ju A, Haber E, (1982), High-affinity monoclonal antibodies to the cardiac glycoside digoxin, J. Immunol. 129: 1165-1172.

Neuberger MS, Williams GT, Mitchell EB, Jouhal SS, Flanagan JG, Rabbitts TH, (1985), A hapten-specific chimeric IgE antibody with human physiological effector function, Nature 314: 268-270.

Nishi M, Kataoka T, Honjo T, (1985), Preferential rearrangement of immunoglobulin K chain joining region J_{K1} and J_{K2} segments in mouse spleen DNA, PNAS 82: 6399-6403.

Nishioka Y, Leder P, (1980), Organization and complete sequence of identical embryonic and plasmacytoma K V-region genes, J. Biol. Chem. 255: 3691-3694.

Parslow TG, Blair DL, Murphy WJ, Granner DK, (1984), Structure of the 5' ends of immunoglobulin genes: a novel conserved sequence, PNAS 81: 2650-2654.

Pech M, Hchtl J, Schnell H, Zachau HG, (1981), Differences between germ-line and rearranged immunoglobulin V_K coding sequences suggest a localized mutation mechanism, Nature 291: 668-670.

- Picard D, Schaffner W, (1984), A lymphocyte-specific enhancer in the mouse immunoglobulin K gene, *Nature* 307: 80-82.
- Potter M, Boyce CR, (1962), Induction of plasma-cell neoplasms in strain Balb/c with mineral oil and mineral adjuvants, *Nature* 193: 1086-1087.
- Potter M, (1977), Antigen-binding myeloma proteins in mice, *Adv. Immunol.* 25: 141-211.
- Potter M, Newell JB, Rudikoff S, Haber E, (1982), Classification of mouse V_K groups based on partial amino acid sequence to the first invariant tryptophan: impact of 14 new sequences from IgG myeloma proteins, *Mol. Immunol.* 19: 1619-1630.
- Queen C, Baltimore D, (1983), Immunoglobulin gene transcription is activated by downstream sequence elements, *Cell* 33: 741-748.
- Richards EF, Konigsberg WH, Rosenstein RW, Varga JM, (1975), On the specificity of antibodies: biochemical and biophysical evidence indicates the existence of polyfunctional antibody combining region, *Science* 187: 130-137.
- Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P, (1977), Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I, *J. Mol. Biol.* 113: 237-251.
- Riley SC, Connors SJ, Klinman NR, Ogata RT, (1986), Preferential expression of variable region heavy chain gene segment by predominant 2,4-dinitrophenyl specific Balb/c neonatal antibody clonotypes, *PNAS* 83: 2589-2593.
- Rosenstein RW, Mussun RA, Armstrong MYK, Konigsberg WH, Richards EF, (1972), Contact region for dinitrophenyl and menadione haptens in an immunoglobulin binding more than one hapten, *PNAS* 69: 877-881.

- Roth C, Rocca-Serra J, Sommé G, Fougereau M, Theze J, (1985), Gene repertoire of the anti poly (Glu⁶⁰ Ala³⁰ Tyr¹⁰)_n (GAT) immune response: comparison of V_H, V_K and D regions used by anti-GAT antibodies and monoclonal antibodies produced after anti-idiotypique immunization, PNAS 82: 4788-4792.
- Sakano H, Hüppi K, Heinrich G, Tonegawa S, (1979), Sequences of the somatic recombinaison sites of immunoglobulin light-chain genes, Nature 280: 288-294.
- Sanger F, Nicklend S, Coulson AR, (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitor, PNAS 74: 5463-5467.
- Schiff C, Corbet S, Milili M, Fougereau M, (1983), Interstain conservation of the murine GAT-specific antibody V-Kappa repertoire as analysed at the germline level, EMBO J. 2: 1771-1776.
- Scholomchik MJ, Nemazee DA, Sato VL, Snick JV, Carson DA, Weigert MG, (1986), Variable regions sequences of murine IgM anti IgG₁, monoclonal antibodies (Rheumatoid factors): a structural explanation for the high frequency of IgM anti IgG B cell, J. Exp. Med. 164: 407-427.
- Seidman JG, Leder P, (1978), The arrangement and rearrangement of antibody genes, Nature 276: 790-795.
- Seidman JG, Max EE, Leder P, (1979), A K-immunoglobulin gene is formed by site specific recombination without further somatic mutation, Nature 280: 370-375.
- Selsing E, Storb U, (1981), Somatic mutaiton of immunoglobulin light-chain variable region genes, Cell 25: 47-58.
- Smith AM, Slack J, Potter M, (1977), Restriction in the immune response to flagellar proteins in inbred mice, Eur. J. Immunol. 7: 497-503.
- Swan D, D'Eustachio P, Leinwand L, Seidman J, Keithley D, Ruddle FH, (1979),

- Chromosomal assignment of the K light chain genes, PNAS 76: 2735-2739.
- Tonegawa S, Hozumi N, Matthyssens G, Schuller R, (1976), Somatic changes in the content and context of immunoglobulin genes, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 41: 877-889.
- Tonegawa S, (1983), Somatic generation of antibody diversity, Nature 302: 575-581.
- Todd I, Chang SP, Perlmutter RM, Aebersold R, Heusser CH, Hood L, Rittenberg MB, (1984), Immunologic memory to phosphorylcholine V. hybridomas representative of group I antibodies utilize V_{K1-3} gene(s), J. Immunol. 132: 1556-1560.
- Valbuena O, Marcu KB, Weigert M, Perry RP, (1978), Multiplication of germline genes specifying a group of related mouse K chains with implications for the generation of immunoglobulin diversity, Nature 276: 780-784.
- Van Ness BG, Weigert M, Coleclough C, Mather EL, Kelley DE, Perry RP, (1981), Transcription of the unrearranged mouse C_K locus: sequence of initiation region and comparison of activity with rearranged V_K-C_K gene, Cell 27: 593-602.
- Van Ness BG, Coleclough C, Perry RP, Weigert M, (1982), DNA between variable and joining gene segments of immunoglobulin K light chain is frequently retained in cells that rearrange the K locus, PNAS 79: 262-266.
- Wabl M, Burrows PD, vonGabain A, Steinberg C, (1985), Hypermutation at the immunoglobulin heavy chain locus in a pre-B-cell line, PNAS 82: 479-482.
- Weigert M, Riblet R, (1976), Genetic control of antibody variable regions, Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 41: 837-846.
- Weigert M, Gatmaitan L, Loh E, Schilling J, Hood L, (1978), Rearrangement of genetic information may produce immunoglobulin diversity, Nature 276:

785-790.

- Weigert M, Perry RP, Kelley D, Hunkapiller T, Schilling J, Hood L, (1980), The joining of V and J gene segments creates antibody diversity, *Nature* 283: 497-499.
- Williamson AR, (1976), The biological origin of antibody diversity, *Ann. Rev. Biochem.* 45: 467-500.
- Wu TT, Kabat EA, (1970), An analysis of the sequences of the variable regions of Bence-Jones proteins and myeloma light chains and their implication of antibody complementarity, *J. Exp. Med.* 132: 211-248.
- Ziegler SF, Treiman LJ, Witte ON, (1984), K gene diversity among the clonal progeny of pre B lymphocytes, *PNAS* 81: 1529-1533.