

## Chapitre 2

### Méthodologies et illustrations

#### IV- Analyse de la fonction des gènes :

##### 2) par surexpression ectopique :

**Mutant gain de Fonction** : Par rapport a un embryon normal, il faut sur exprimer une protéine exogène ; surexpression ectopique : pas forcément au même endroit que la protéine endogène.

#### Ciblage dans une cellule ou un territoire

-Si on part d'un gène :

Cela marche mal car les limites 5' et 3' d'un gène sont assez floues. De plus la transcription peut se faire mais il peut y avoir un problème d'épissage. Donc pour faire un gain de fonction (gdf) ce n'est pas judicieux

-surexpression de l'ARN m dans l'embryon par micro-injection ciblée :

Ciblage dans l'espace et dans le temps. Limité dans le temps, valable assez tôt lorsqu'on peut repérer les cellules où on veut micro-injecter. Le problème c'est que l'embryon devient vite complexe. Donc gdf faisable avec l'ARNm mais sur une fenêtre de temps courte

-à partir de l'ADNc:

On peut faire en sorte qu'il s'intègre tôt et on peut contrôler sa transcription.

On peut contrôler dans le temps la transcription. Ainsi on peut utiliser un ADNc car la transcription sera plus tardive que le moment où on aura injecté.

Comment sinon contrôler l'expression d'un ADNc dans l'embryon ?

#### Système inductible

Injection d'un ADNc dans un plasmide et on peut placer en amont un promoteur qui est actif au moment où on veut (stade gastrula, morula...) expression spatio-temporelle que l'on contrôle en choisissant ce promoteur.

Double contrôle spatial et temporel :

On va produire une protéine chimérique dont une partie (récepteur) sera sensible si il ya présence d'œstradiol ou pas. En fonction du fait qu'il y a fixation ou pas d'œstradiol la protéine heat shock se détachera, permettant de libérer le site NLS.

Protéine de fusion aura une localisation cytoplasmique en absence d'œstradiol, en effet il ya aura un domaine NLS qui sera démasqué lorsqu'il y aura de l'œstradiol, permettant la translocation dans le noyau, avec l'expression d'une protéine active.

Chez la souris aussi il y a des régulations qui existent avec la tétracycline ce qui déclenche une activation de gènes.

Ex : Surexpression ectopique du gène *eyless* normal

=>On obtient des yeux supplémentaires sur les antennes ou sur les pattes ou sur les ailes.

Wnt et expression ectopique au niveau ventral : contrôle la formation de la tête.

### 3) Par inactivation de son gène ou de son produit

**Mutants perte de fonction** : Il faut faire des embryons perte de fonction et agir sur la protéine endogène : soit on fait en sorte que la **protéine n'est plus présente soit on fait en sorte qu'elle soit présente mais inactive.**

-Soit on fait du KO par recombinaison homologue somatique. Soit on interfère avec le produit du gène par approche KD

Approches KO et KD (Knock Down) donnent les mêmes phénotypes.

#### Mutant perte de fonction par KO :

Faire des mutants perte de fonction au niveau somatique (Cellules ES)

Il a été réalisé dans un premier temps des Inactivations de gènes en modifiant des parties d'exons et plus tard, sont venues des substitutions de la partie du gène par un gène exogène : marqueur LacZ et ca c'est le KI.

LacZ permet de voir comment ce promoteur est actif in vivo. On a une idée de son expression spatio-temporelle.

Cellules ES : cellules au stade embryonnaire comparable au stade blastula. On crée des mutations et recombinaison homologue sur un des allèles on intègre ces gènes ayant ces mutations grâce à des gènes de résistance. Cellules ES la seule difficulté c'est de les maintenir non différenciées car elles ont tendance à se différencier. On peut les mettre sur un tapis de fibroblastes qui de façon spontanée et naturelle vont sécréter du LIF qui les maintient en état de pluripotence. Soit on fait une culture sur tapis en présence de LIF

Il faut ensuite réimplanter ces cellules dans un embryon de stade blastocyste équivalent.

=>Embryon chimérique qui possède les cellules ES normal et les cellules ES modifiées.

Embryon receveur sera implanté dans des femelles gestantes et les croiser pour avoir un homozygote.

#### *Difficultés lignées transgéniques KO*

Parfois il n'y a pas de phénotype lorsqu'on inactive un gène car il existe des gènes en famille multigéniques et donc on inactive un gène et un autre membre de la famille prend le relais.

Parfois c'est létal, si on inactive dans toutes les cellules de l'embryon.

Pour pallier à tous ces problèmes il a fallu contrôler cette inactivation de façon spatio-temporelle :

⌘Système tétracycline

⌘ Système cre-lox : la cre= recombinaise qui fait 38Kd et spé du bactériophage P1.

Les lox P séquences courtes de 34pb répétées. Toute séquence d'ADN (en vert) entre deux loxP (triangles) peut être excisée en présence d'une recombinaise.

Application de système cre/lox

On peut réaliser deux lignées de souris transgéniques :

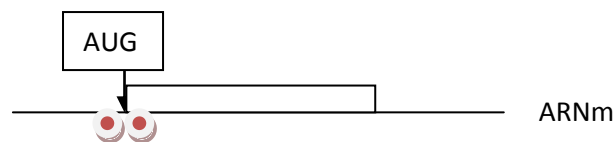
Micro injection de l'ADN codant pour la recombinaise (cre). On croise avec un mâle chez qui on a flanqué un exon (exon 2) avec les loxP. Puis on croise avec les femelles exprimant recombinaise. Intérêt c'est que l'on peut éviter la létalité en contrôlant quant recombinaise est exprimée et ou (ex ici dans le foie).

#### Mutant perte de fonction par interférence (Kock Down)

- Au niveau de l'ARN

-Pour inactiver l'ARNm il y a les ARN anti sens qui vont s'hybrider avec l'ARN sens. Le problème, c'est que l'on s'est aperçu que l'hybride sens-anti sens n'est pas stable, ce qui est du à la déroulase qui déroule cet hybride.

-Ils ont fait donc des séquences beaucoup plus courtes, **les morpholino**



#### Morpholino

Ces séquences morpholino :

- \* sont proches de l'AUG (10 avant et 10 après cet AUG)
- \* de 10 à 20 Nt
- \* ces séquences vont empêcher la traduction et tout ARN m non traduit a une durée de vie très courte et donc est dégradé.

Les morpholino marchent beaucoup mieux que les si RNA qui sont moins intéressants. Les morpholino sont beaucoup plus stables, résistants aux nucléases et donc les hybrides formés sont stables avec une durée d'action longue.

On les appelle les morpholino car in-vivo on aura un phénotype perturbé qui entraîne un problème au niveau de la morphologie.

Morpholino oligos are short chains of about 25 Morpholino subunits. Each subunit is comprised of a nucleic acid base, a morpholine ring and a non-ionic phosphorodiamidate intersubunit linkage. Morpholinos do not degrade their RNA targets, but instead act via an **RNAse H-independent** steric blocking mechanism. With their requirement for greater complementarity with their target RNAs, Morpholinos are free of the widespread off-target expression modulation typical of knockdowns which rely on RISC or RNase-H activity. They are completely stable in cells and do not induce immune responses.

With their high mRNA binding affinity and exquisite specificity, Morpholinos yield reliable and predictable results. Depending on the oligo sequence selected, they either can **block translation** initiation in the cytosol (by targeting the 5' UTR through the first 25 bases of coding sequence), can **modify pre-mRNA splicing** in the nucleus (by targeting splice junctions or splice regulatory sites) or can **inhibit miRNA** maturation and activity (by targeting mature miRNA or pri-miRNA), as well as more exotic applications such as ribozyme inhibition or translational frameshifting. Morpholinos have been shown effective in animals, protists, plants and bacteria.

- **Au niveau de la protéine**

a) ~~On peut utiliser un Anticorps (Ac)~~ dans un embryon en entier, mais ce n'est pas une technique fine car l'Ac diffuse il faut le cibler donc pas facile et il faut un Ac spécifique.

Ex Ac anti-actine empêchant la migration.

b) ~~L'autre stratégie c'est de faire des protéines mutantes à effet dominant~~, interférant avec la protéine normale endogène.

Ex du récepteur à un facteur de croissance :

On peut agir au niveau du récepteur de la voie et donc interfère avec la fixation du ligand. On modifie la partie l'ADNc qui code pour le domaine intra-membranaire.

On travaille en excès de protéine mutante de telle façon à ce qu'il n'y ait plus d'homodimères normaux.

Surexpression en excès de la protéine mutée donc piège la molécule endogène et donc il n'y a plus de signal transduit.

(On peut faire de la restauration du phénotype sauvage afin de restaurer un phénotype normal).

Si on veut inactiver un facteur de transcription (FT) dans l'embryon : (ce trans-facteur se fixant sur une cis-séquence).

Le FT a un domaine de liaison à l'ADN, possédant des acides aminés basiques.

On va surexprimer les FT qui seront modifiés et qui vont interférer avec le FT endogène et faire en sorte que ce dernier soit non fonctionnel.

Surexpression de la protéine modifiée de telle façon à ce qu'il n'y ait plus aucun FT endogène allant se fixer sur les cis-séquences.

Le domaine de dimérisation important, domaines régulateurs peuvent être modifiés, de même pour qu'un FT soit actif il faut une phosphorylation, donc on peut jouer sur ces sites de phosphorylation.

On peut aussi changer un domaine activateur par un domaine répresseur.

Peut-on jouer sur les cis-séquences ?

On peut détourner les FT de leur cible endogène, il suffit d'ajouter un excès de cis-séquences dans l'embryon ce qui va titrer la protéine endogène : tous les FT iront se fixer et donc il n'y aura plus de FT disponibles pour aller se fixer sur le promoteur.

Exemple du gène brachyury (mésoderme postérieur) :

D'abord caractérisé chez la souris (gène T), Xbra chez Xénope et no-Tail chez le poisson.

Etapas (cf. diapo).

On va faire des délétions et voir si on perd de l'activité transcriptionnelle.

Séquences UAS fixant un FT, Gal 4, avec un domaine activateur pour que Lac Z soit exprimée : X-Bra.

A partir d'une certaine délétion on remarque une perte de l'activité de Lac Z.

Il faut convertir Xbra qui était activateur en répresseur.

On peut mettre un domaine répresseur à la place : engrailed. Test in vitro de la protéine

# Chapitre 3

## Contrôle maternel

### I- polarité embryonnaire :

Polarité A/P, polarité D/V et droite-gauche.

A quel moment se fait cette mise en place ?

Chez la drosophile, ce sont ses gènes maternels qui sont mis en jeu pour la mise en place des axes. 3<sup>ème</sup> groupe non abordée car déterminants beaucoup moins importants dans mise en place de la polarité.

### II- Niveau de régulation :

L'ARNm est sous contrôle de ces séquences 3'UTR non traduites.

On étudie l'activité du gène rapporteur qui est sous contrôle de la séquence 3'UTR

Possibilité de voir effets in vivo après suppression de la séquence 3'UTR, etc....

Si la traductibilité augmente après enlèvement de 3'UTR, donc cette partie fixerait une protéine de liaison à l'ARN qui aurait un rôle répresseur. Le but est de déterminer ces protéines se fixant à l'ARNm.

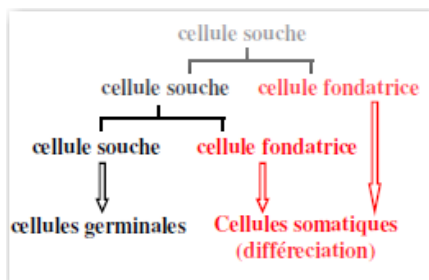
*Etudes in vitro :*

Régulation des gènes maternels :

Ces protéines maternelles peuvent être des ligands ou des récepteurs...

### **Lignage cellulaire chez le Nématode**

Après la fécondation il va y avoir une cellule se divisant de façon asymétrique pour donner à chaque fois une cellule souche et une cellule fondatrice. A partir des cellules souches, cela donnera encore 1 cellule souche et une fondatrice.



Et ceci pendant 4 divisions successives. A partir de cela on aura une cellule souche qui donnera les cellules de la lignée germinale (gamètes).

Cellules fondatrices donneront les différents tissus. On parle de cellules AB, E, MS...

La particularité ce sont les divisions de ces cellules fondatrices qui sont égales et synchrones. Cependant les cellules fondatrices peuvent se diviser à vitesse différente.

Granules P : localisés dans l'embryon grâce à des Ac qui les ciblent.

Cellule P3 possèdera des granules P. Ce sont des marqueurs de la lignée germinale, participant à la mise en place de la lignée postérieure. Ce sont des particules riboprotéiques : ARN et protéines.