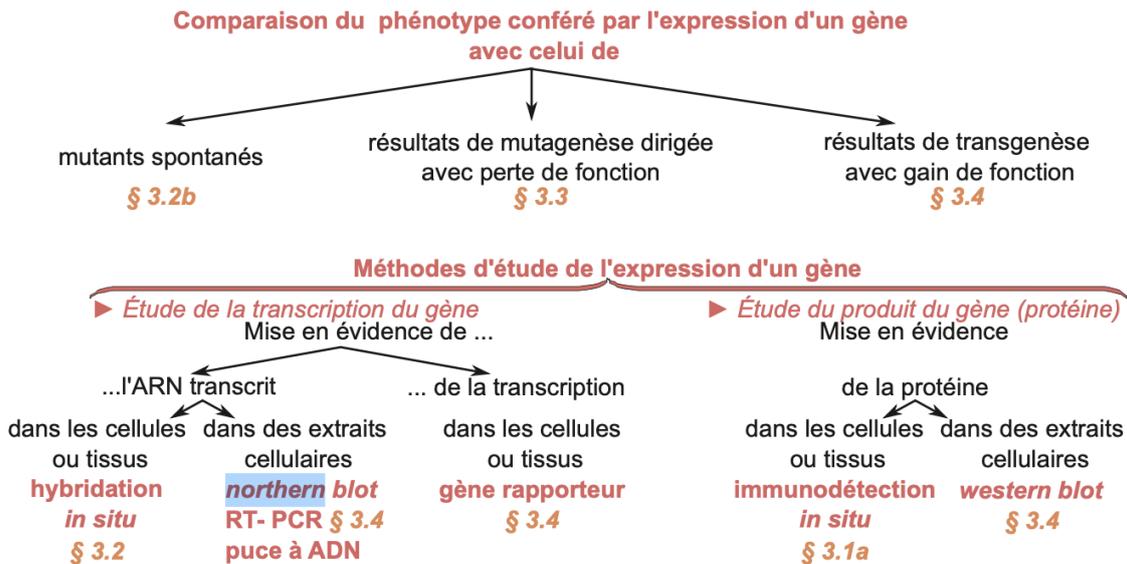


Figure 1 : Méthodes d'étude d'un gène
(in Dunod, 2021)



L'ingénierie génétique dispose de nombreux outils pour modifier le génome des cellules de manière plus ou moins ciblée. La comparaison des différents phénotypes ainsi générés permet de comprendre les conséquences de l'expression de gènes d'intérêt et d'envisager d'éventuelles applications thérapeutiques ou agronomiques.

- **La mutagenèse aléatoire**

Elle consiste à traiter les organismes avec des **agents chimiques** (acide nitrique, 5-bro-mo-uracile, colchicine, etc.) ou **physiques** (rayonnements ionisants ou UV) reconnus comme **mutagènes**.

Ces agents provoquent des **erreurs d'appariements** ou génèrent des **lésions** dans la molécule d'ADN, qui si elles ne sont **pas corrigées**, constituent des mutations qui apparaissent en des sites et en nombre variables : ce sont des **mutations aléatoires**.

Les **phénotypes mutants** du caractère d'intérêt sont **sélectionnés** (anomalie de l'organisation des fleurs, des membres, disparition de l'aptitude à réaliser une réaction métabolique, etc.). Le gène muté peut alors être identifié et le rôle de son expression validé.

Le criblage de ces mutants est fastidieux et l'interprétation des phénotypes peut s'avérer parfois difficile.

- **La mutagenèse ciblée (voir figure ci-dessous)**

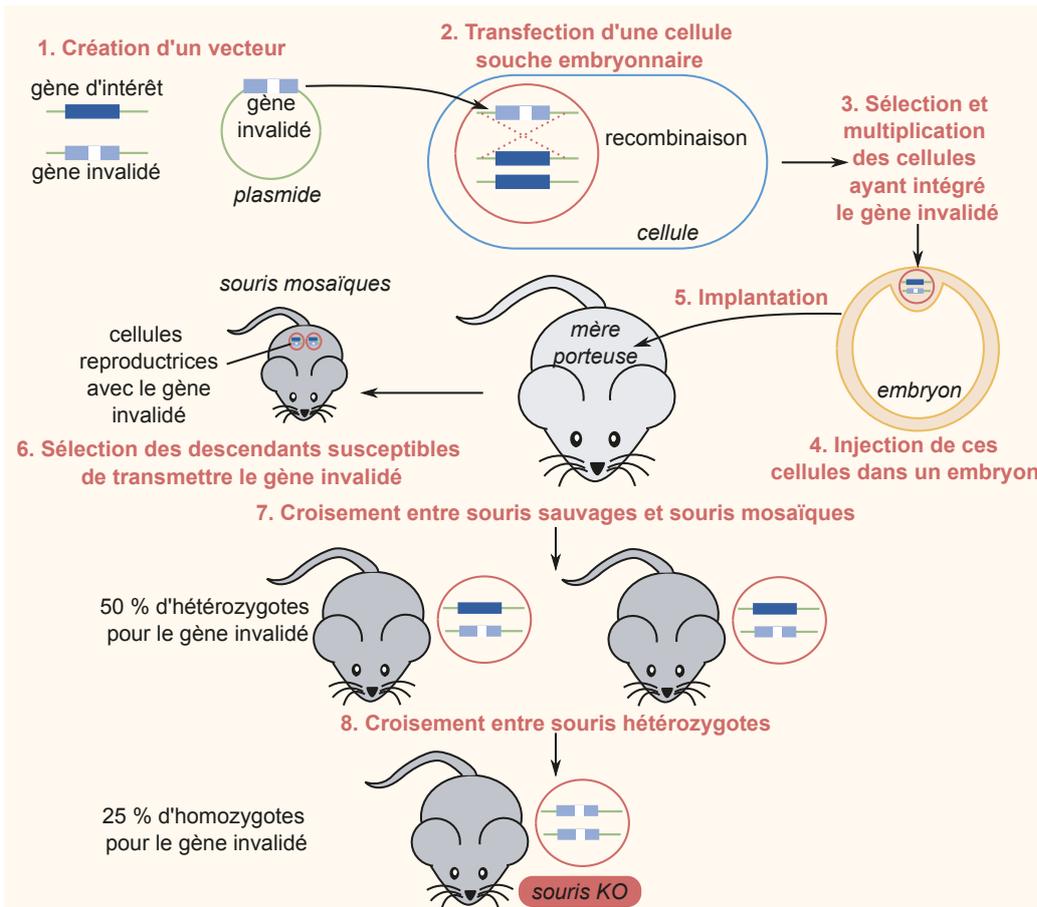
Elle permet de modifier spécifiquement le gène d'intérêt et d'en étudier les conséquences phénotypiques. Différentes techniques sont envisagées.

- **L'inactivation des gènes par Knock-Out (KO)**

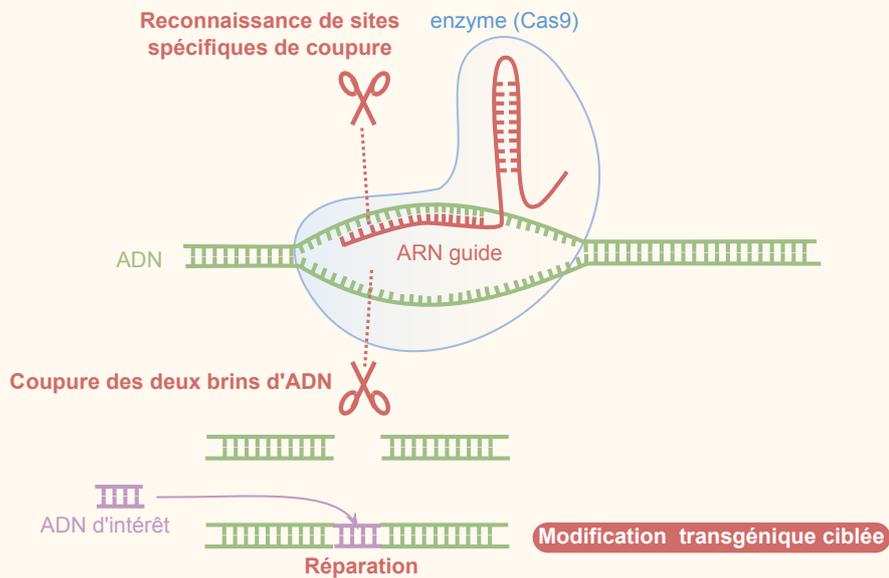
Cette technique consiste à **inactiver un gène**, par exemple chez la souris, en le remplaçant par une version non fonctionnelle (invalidée). Il est alors possible d'envisager des hypothèses sur le rôle de l'expression du gène, en comparant les phénotypes KO et sauvages. Cette méthode est très longue (plusieurs mois) et coûte cher. Des laboratoires sont exclusivement consacrés à la conception de telles souches expérimentales.

- **La transgénèse**

Cette méthode consiste à modifier le génome en insérant de manière dirigée un gène d'intérêt sur un site spécifique de l'ADN.



Principe de la mutagenèse dirigée par Knock-Out.

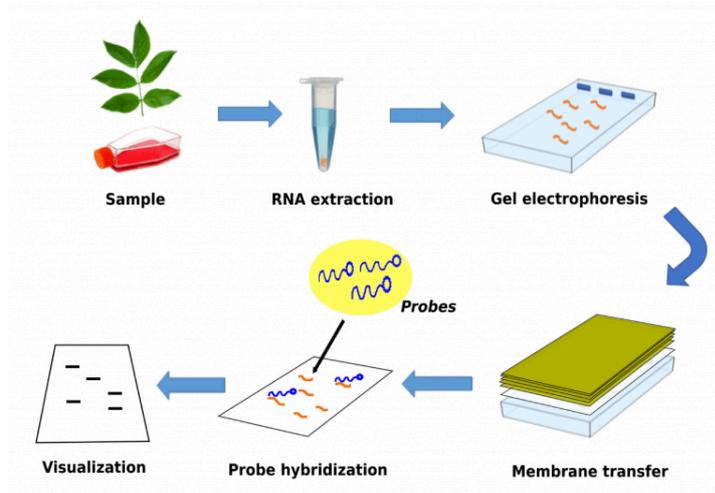


Principe de la mutagenèse dirigée par CRISPR-Cas9.

Le système CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) utilise pour cela un ARN-guide qui, en se liant à un site spécifique de l'ADN, oriente l'enzyme Cas-9 qui coupe alors l'ADN ; on parle de « ciseaux moléculaires ». La transgénèse utilise ces propriétés pour insérer entre ces extrémités libres une séquence d'intérêt (nouvelle séquence ou séquence inactivée) sous le contrôle d'un promoteur choisi ; La séquence d'intérêt fait alors partie du génome modifié.

Figure 3 : Etude de l'expression des gènes par étude des ARNm

Northern Blot (<https://tribioscience.com/>)



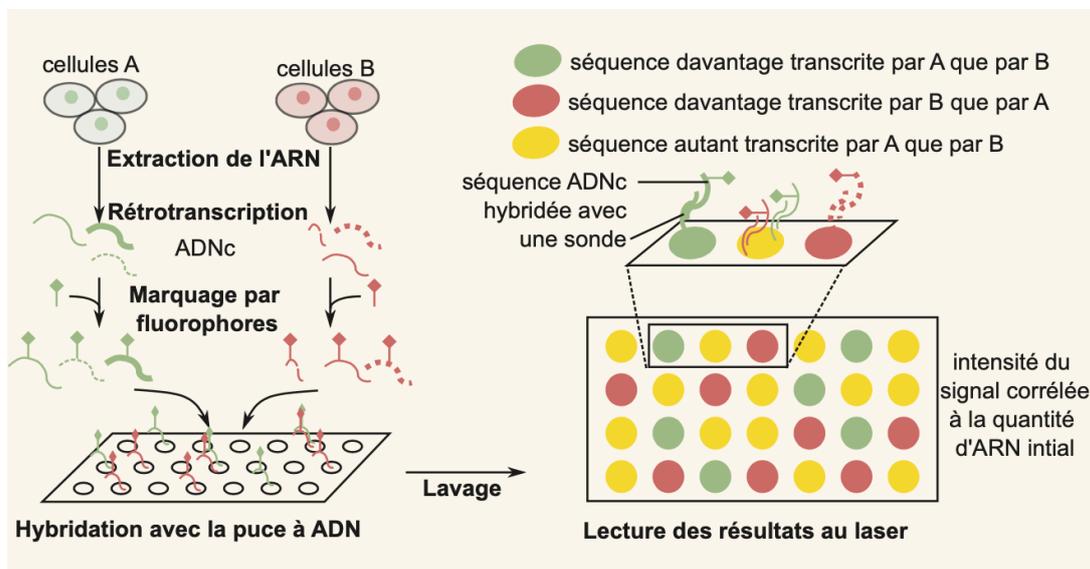
Puces à ADN : détermination du transcriptome (<https://www.imm.cnrs.fr/>, Dunod, 2021)

Les puces à ADN permettent d'étudier le **transcriptome** par l'observation simultanée de l'expression de plusieurs milliers de gènes dans une cellule ou un tissu donné, mesurant ainsi les modifications des différents états cellulaires. La technique des puces à ADN est basée sur le **principe d'hybridation** (Southern, Mir et al. 1999) qui stipule que deux fragments d'acides nucléiques complémentaires peuvent s'associer et se dissocier de façon réversible sous l'action de la chaleur et de la concentration saline du milieu.

Concrètement, une **puce** à ADN est un **support rigide** (verre ou nylon) de quelques centimètres carrés, sur lequel de **courtes séquences d'ADN ont été déposées** : ce sont les **sondes**.

Les sondes ont la particularité d'avoir été choisies de manière à être **spécifique** chacune d'un **seul et unique gène**. Ce microdispositif est mis au contact des **ARNs extraits des échantillons** à analyser appelés des "**cibles**". Ces cibles sont marquées par incorporation de radioéléments ou de fluorochromes.

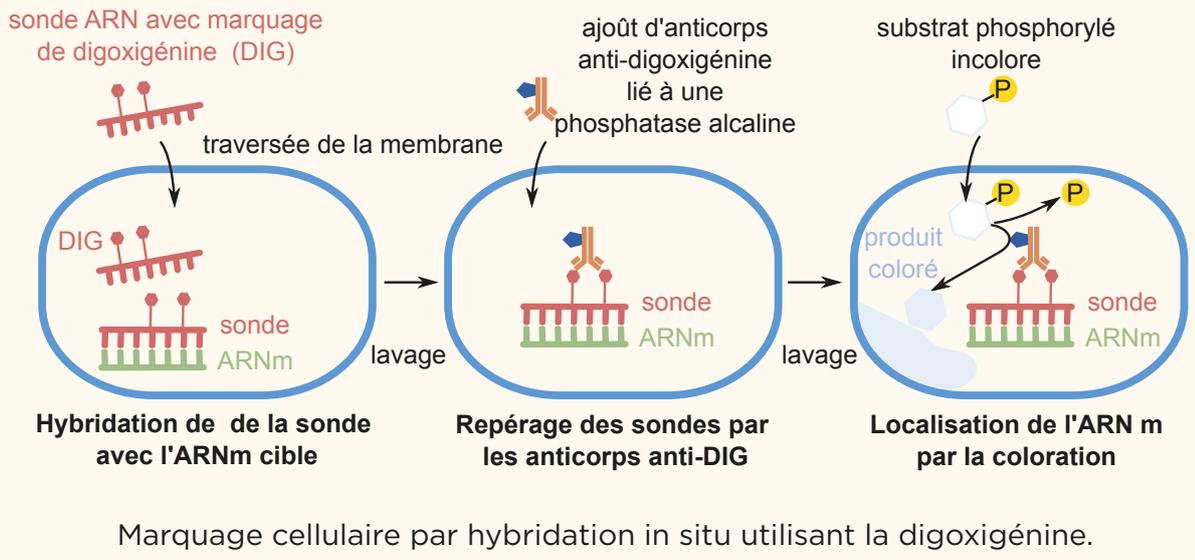
Après acquisition des images d'hybridation, la **quantification des signaux d'hybridation** reflète le **niveau d'expression**, dans l'échantillon initial, de chacun des gènes représentés sur la puce.



Hybridation in situ (in Dunod, 2021)

Cette technique utilise des sondes nucléotidiques pour localiser les séquences d'intérêt dans les tissus, les cellules, les organites et même au niveau des chromosomes : séquences sonde et cible s'apparient par **complémentarité des bases**. La sonde est marquée :

- soit par des isotopes radioactifs (H^3 , P^{32} , etc.) ;
- soit par des fluorophores (cyanine) ou des dérivés fluorescents (DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole, FITC *Fluorescein isothiocyanate*) ;
- soit par des produits non fluorescents comme la digoxigénine (une molécule lipophile capable de se lier ensuite à des anticorps) comme représenté ci-dessous.



La qRT-PCR (in Dunod, 2021)

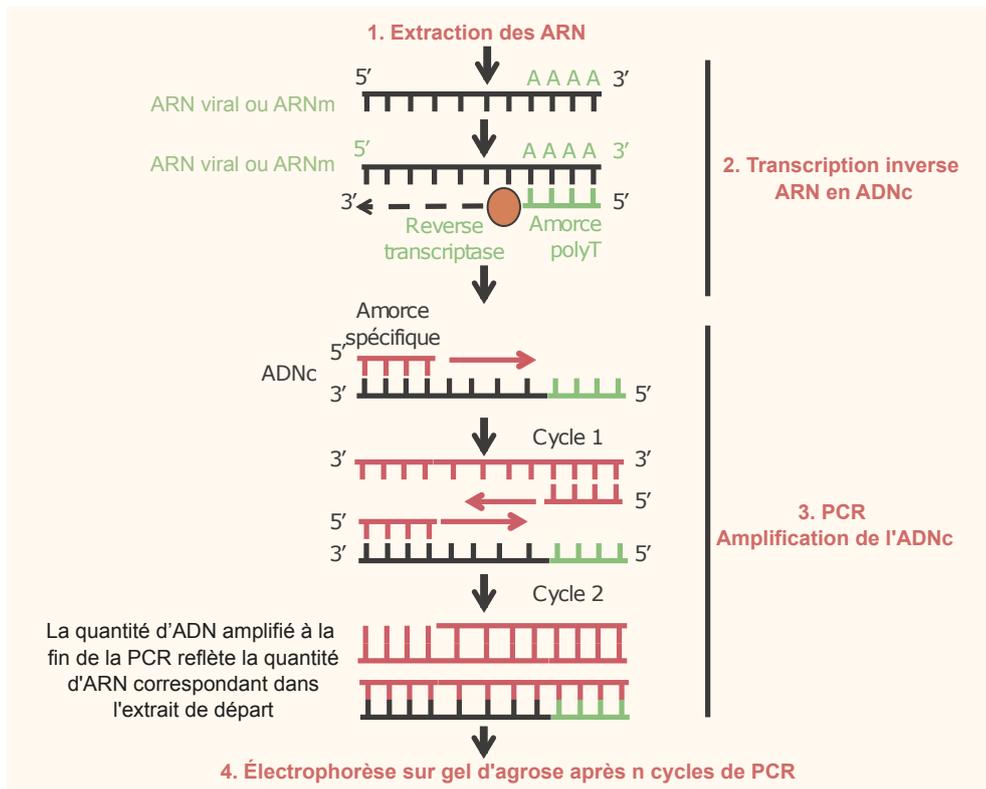
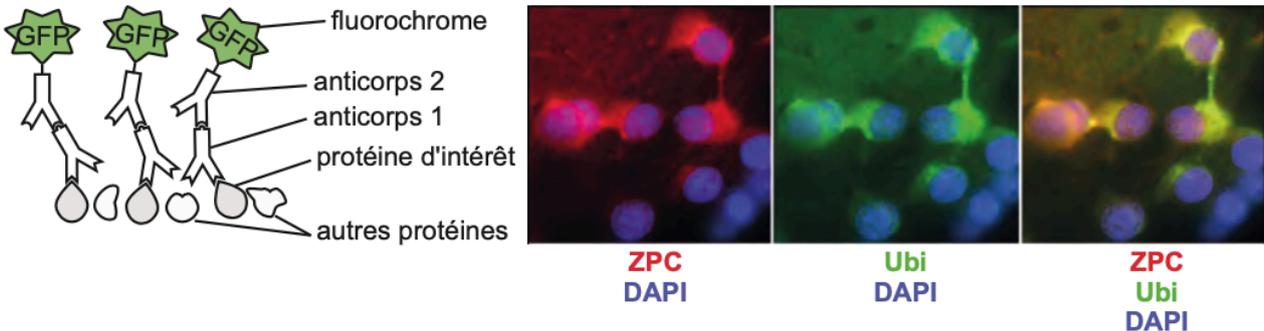


Figure 4 : Etude de l'expression des gènes par étude des protéines
(in Dunod, 2021)

Immunolocalisation



(a) principe de l'immunomarquage. **(b)** immunomarquage de ZPC et de l'ubiquitine.

(a) Après fixation des tissus et perméabilisation des membranes, les tissus sont traités par un anticorps primaire qui se fixe spécifiquement à la protéine d'intérêt. Après lavage, les tissus sont traités par un anticorps secondaire spécifiquement dirigé contre l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire a été au préalable modifié de façon à être détectable (radioactif, couplé à une enzyme, à une bille métallique, ou comme ici, à un fluorochrome). **(b)** Exemple d'immunomarquage. Dans des cellules d'ovaire, on a détecté les protéines ZPC (fluorochrome rouge) et ubiquitine (fluorochrome vert), ainsi que les noyaux, par coloration de l'ADN au DAPI (bleu). La 3^e image présente la superposition des deux fluorescences. La localisation des deux protéines est cytoplasmique, et le marquage jaune (droite) indique que les deux protéines colocalisent, donc sont probablement en interaction. (Modifié d'après Zimmerman et al., 2011., *PLoS ONE* 6(2): e17256).

Western blot

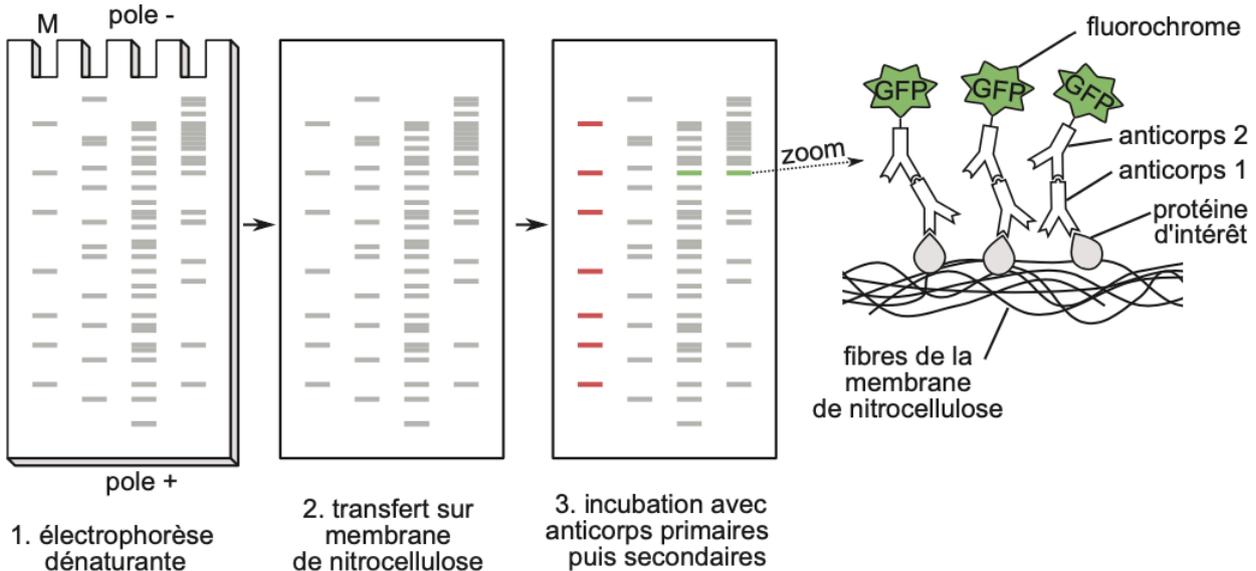


Figure 5 : Contrôle de la détermination des cellules musculaires

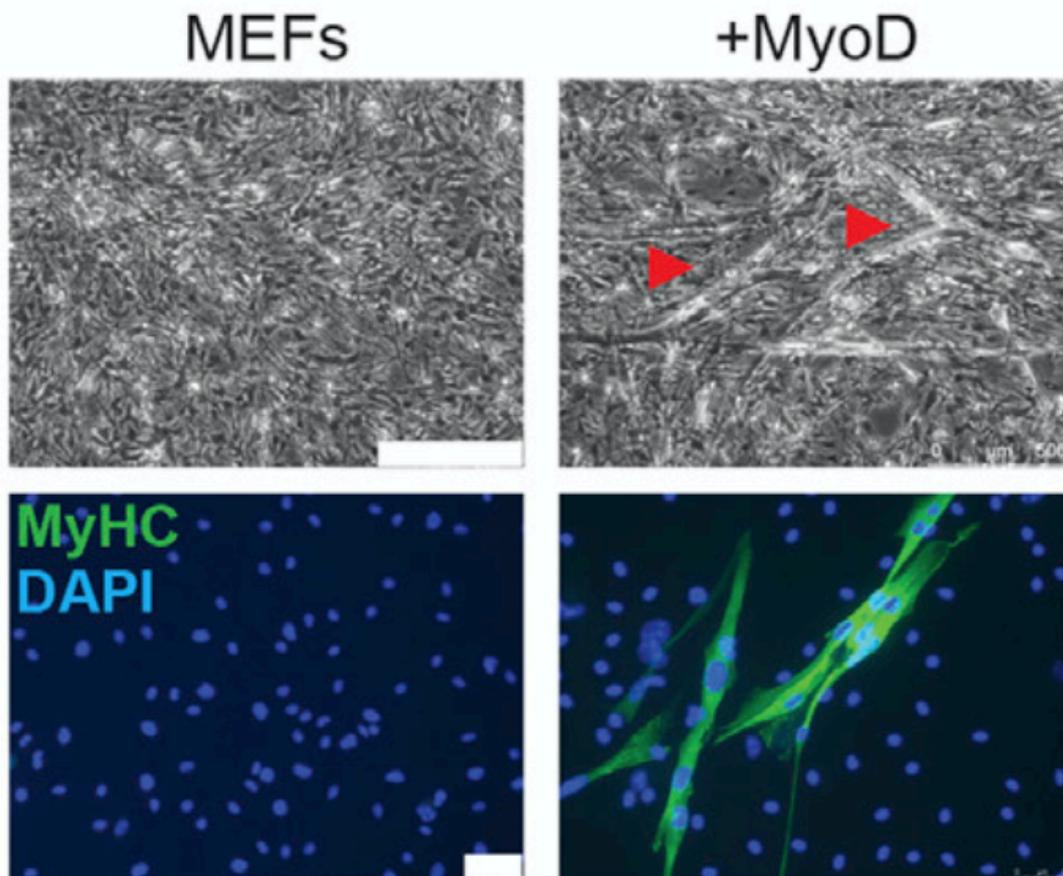
(Bar-Nur et al., 2018, Relaix et al., 2016)

Expérimentalement, des fibroblastes d'embryons de souris cultivés en présence de certains agents pharmacologiques se différencient en myoblastes = les cellules précurseurs des muscles. A partir de ce modèle expérimental on a pu étudier les gènes qui contrôlent la myogénèse = la formation de cellules musculaires à partir de cellules indifférenciées.

On teste ici l'effet de l'ajout du produit du gène MYoD sur des fibroblastes en culture (MEF : murine embryonic fibroblasts ; barre = 500µm). Les flèches indiquent les myotubes, des cellules en cours de différenciation en myocytes.

Deux immunomarquages ont été réalisés :

- DAPI : colore en bleu les noyaux des cellules
- MyCH : anticorps spécifique des chaînes lourdes de la myosine, protéine spécifique des cellules musculaires.

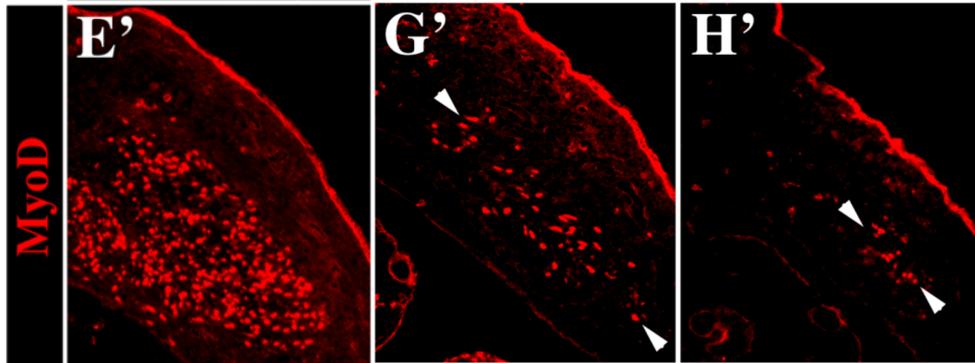


- quel est l'intérêt d'utiliser le DAPI? un anticorps anti MyCH?

- Conclure sur le rôle de MyoD

Une immunolocalisation a été réalisée avec des AC anti MyoD (en rouge) sur des tissus à l'origine de muscles chez des embryons de souris :

- sauvages : E'
- mutantes pour le gène Myf 5 : G'
- mutantes pour les gènes Myf 5 et Pax 3 : H'



Interpréter les résultats

Figure 6 : effet de la vernalisation sur le transcriptome d'*Arabidopsis thaliana*
(in Dunod, 2021)

Durées du traitement : 1 heure (F1h), 1 jour (F1J), 10 jours (F10J), 20 jours (F20J) et 40 jours (F40J).

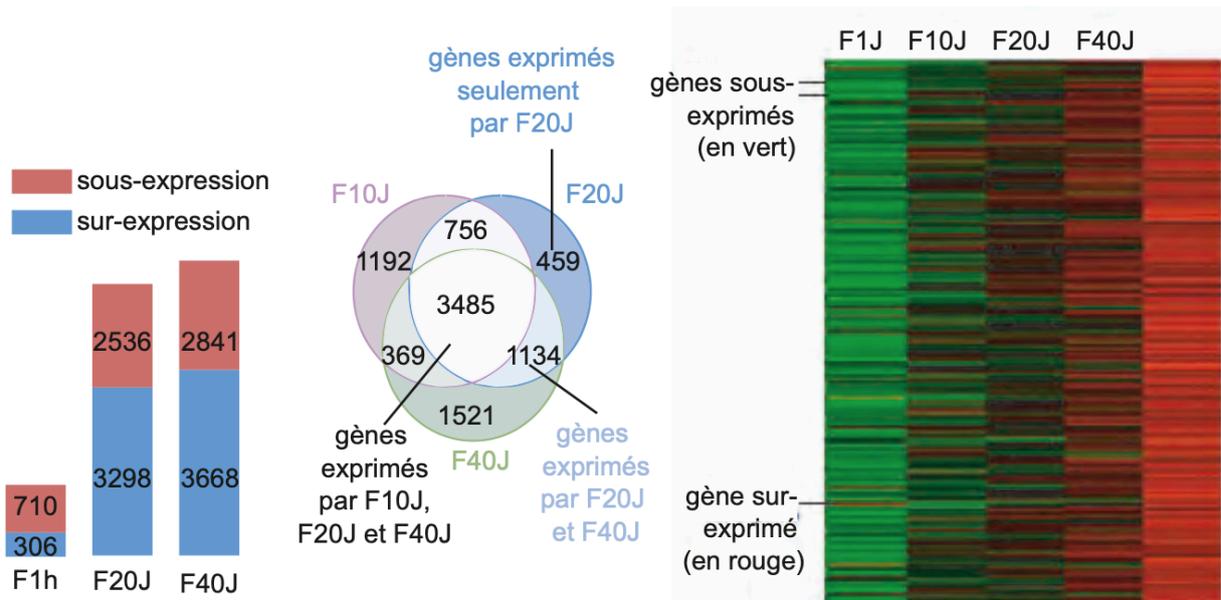


Figure 7 : effet de la gelée royale sur l'expression des gènes chez l'abeille

<https://planet-vie.ens.fr/thematiques/developpement/contrôle-du-developpement/la-différenciation-des-abeilles-en-reines-et>
 Yan et al., Apidologie, 2014, 45

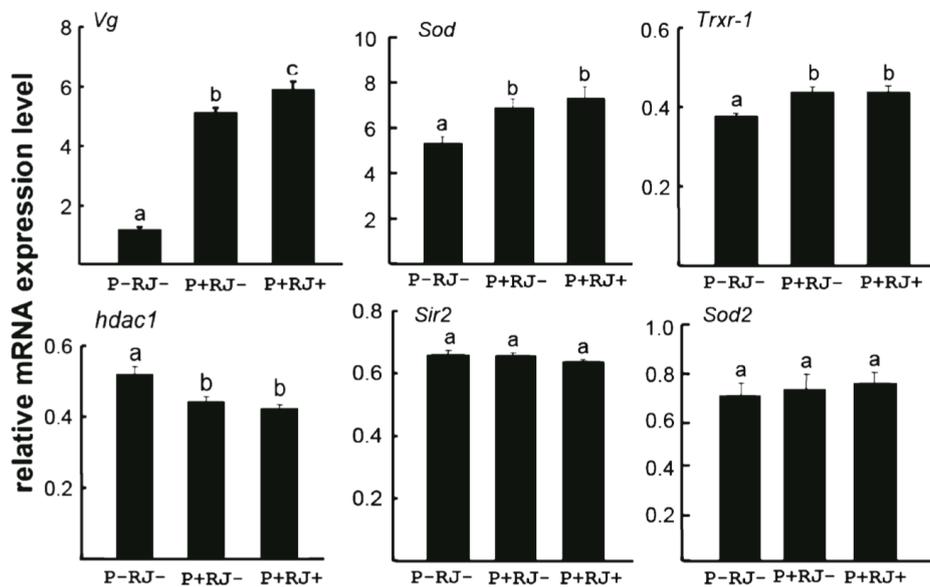
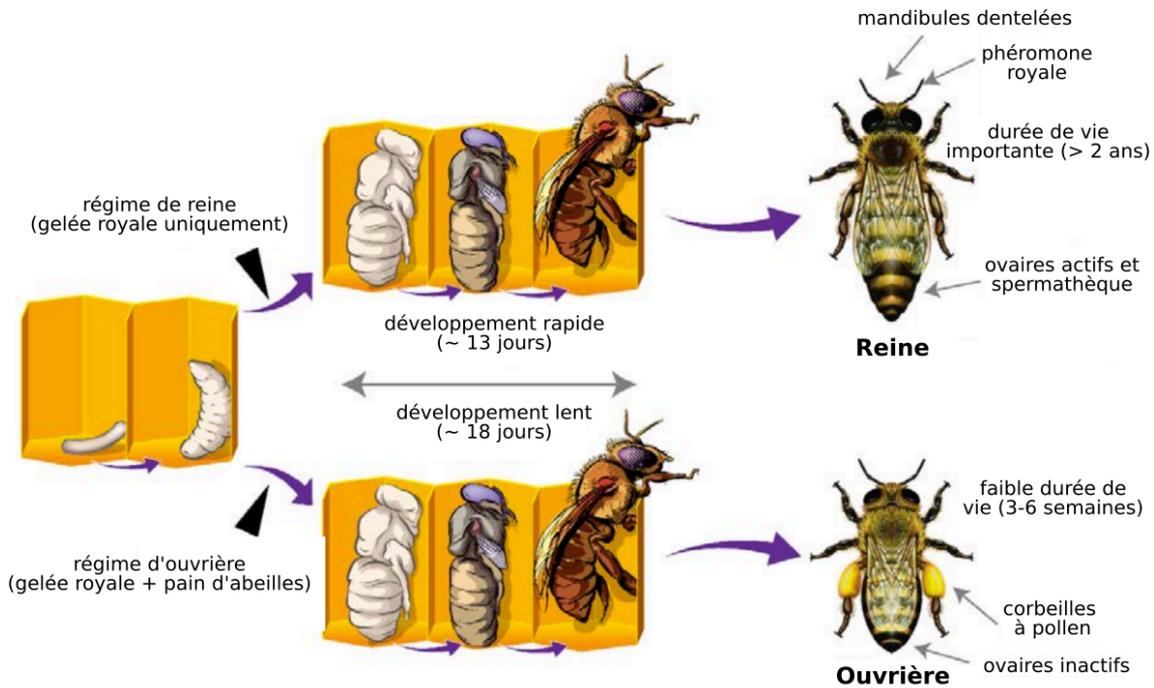


Figure 2. Expression levels of six genes relative to a reference gene *GAPDH-1* in the different nutrition group. Different letters on top of bars indicate significant difference ($P < 0.05$) between the groups. Relative expression data were transformed by square root transformation and presented hereafter transformation. Genes showing significant differences in expression level were further analyzed by ANOVA, using SPSS 16.0. Each bar corresponds to a single group represented as the mean \pm S.E of its biological replicates.

Bees were fed with pollen and royal jelly together (P+ RJ+), pollen only (P+ RJ-) and with neither pollen nor RJ (P- RJ-).

Figure 8 : voie de signalisation du gène *Sonic Hedgehog*
(Haraguchi et al., 2019)

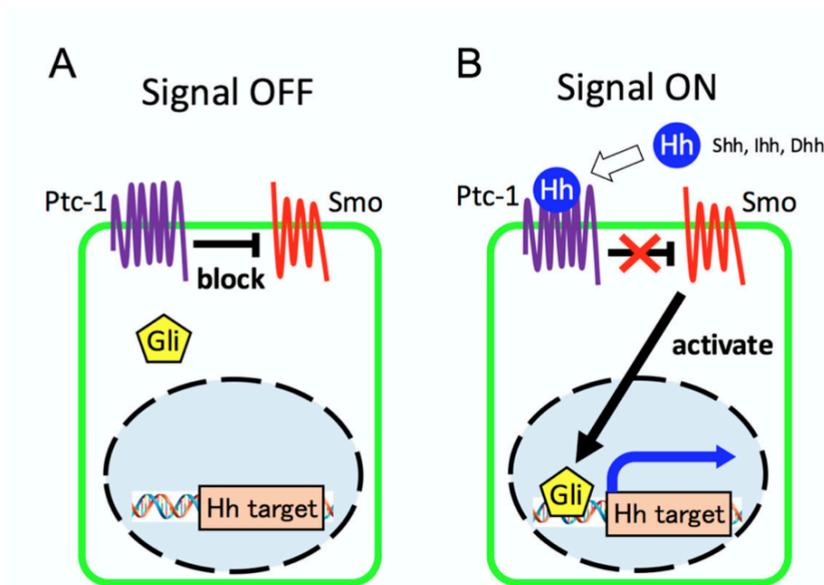


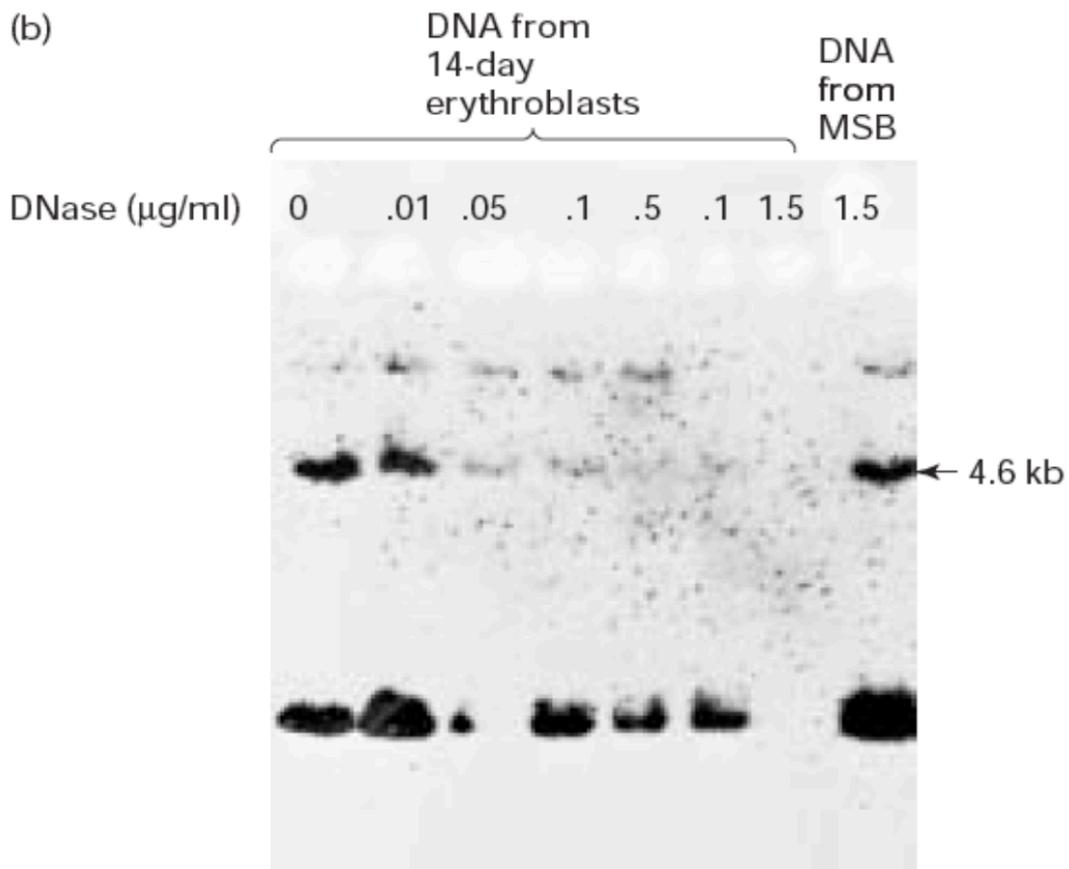
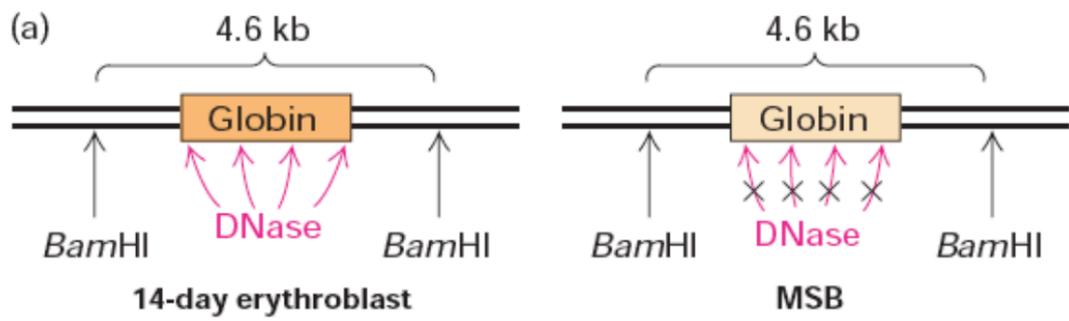
Figure 2. Overview of hedgehog signaling pathway. (A) In the absence of Hh ligands, Ptc-1 blocks Hh pathway activation through the repression of Smo. (B) Once the Hh ligand binds to Ptc-1, the repressive action to Smo is released, and Gli-mediated transcription leading to the regulation of downstream target Hh is activated.

Figure 9 : les gènes exprimés sont sensibles à la DNase I
(in Lodish et al., 5ème édition)

Les expériences sont réalisées à partir de noyaux d'érythroblastes qui expriment le gène de la globine et de noyaux de cellules MSB non différenciées.

- les noyaux purifiés intacts, sont traités pendant un temps court par de l'**ADNase I** (enzyme qui hydrolyse l'ADN) à des concentrations croissantes.
- L'ADN est ensuite extrait des noyaux et soumis à l'action d'une endonucléase de restriction qui libère un fragment de taille connue (4,6kb) contenant le gène de la globine.
- L'ADN digéré est ensuite traité par Southern blot avec une sonde complémentaire du fragment du gène de la globine.

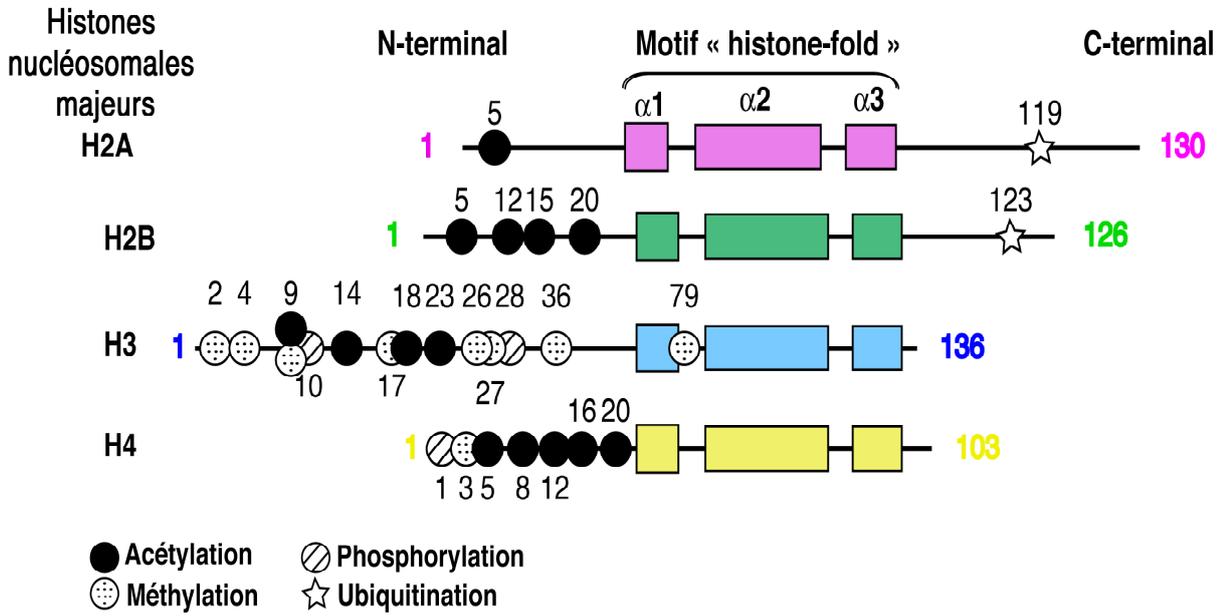
Nontranscribed genes are less susceptible to DNase I digestion than active genes.
Chick embryo erythroblasts at 14 days actively synthesize globin, whereas cultured undifferentiated MSB cells do not. (a) Nuclei from each type of cell were isolated and exposed to increasing concentrations of DNase I. The nuclear DNA was then extracted and treated with the restriction enzyme *Bam*HI, which cleaves the DNA around the globin sequence and normally releases a 4.6-kb globin fragment. (b) The DNase I- and *Bam*HI-digested DNA was subjected to Southern blot analysis with a probe of labeled cloned adult globin DNA, which hybridizes to the 4.6-kb *Bam*HI fragment. If the globin gene is susceptible to the initial DNase digestion, it would be cleaved repeatedly and would not be expected to show this fragment. As seen in the Southern blot, the transcriptionally active DNA from the 14-day globin-synthesizing cells was sensitive to DNase I digestion, indicated by the absence of the 4.6-kb band at higher nuclease concentrations. In contrast, the inactive DNA from MSB cells was resistant to digestion. These results suggest that the inactive DNA is in a more condensed form of chromatin in which the globin gene is shielded from DNase digestion. [See J. Stalder et al., 1980, *Cell* **19**:973; photograph courtesy of H. Weintraub.]



Résultats prédictibles :

Conclusion :

Figure 10 : Les histones peuvent subir des modification post-traductionnelles
(Annabelle Gérard et al., 2004)



Les queues N-terminales des histones peuvent subir des modifications post-traductionnelles

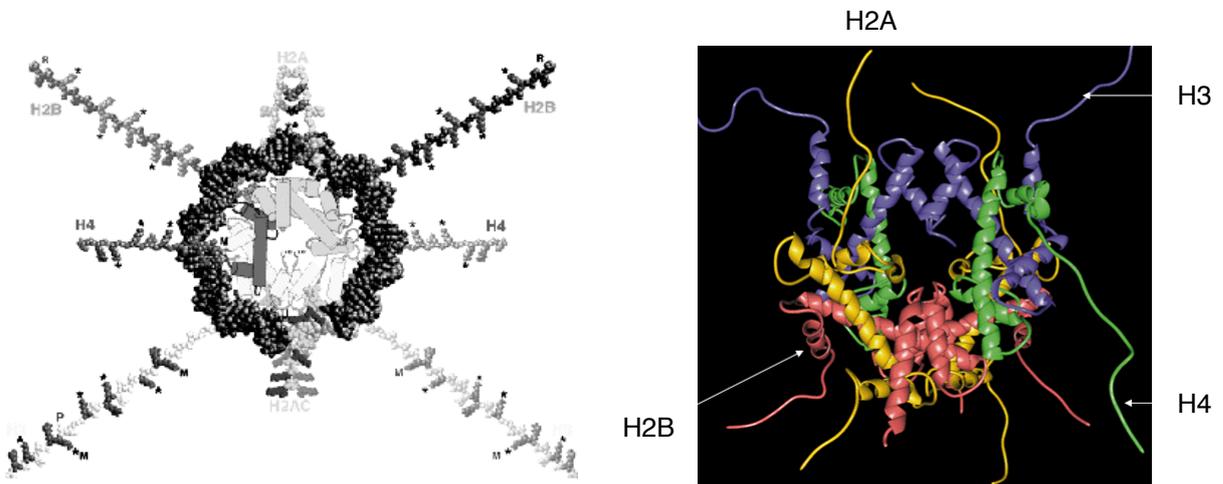


Figure 11 : contrôle de l'expression du gène flc et floraison
(in *Medicine Sciences*, 2005, 21)

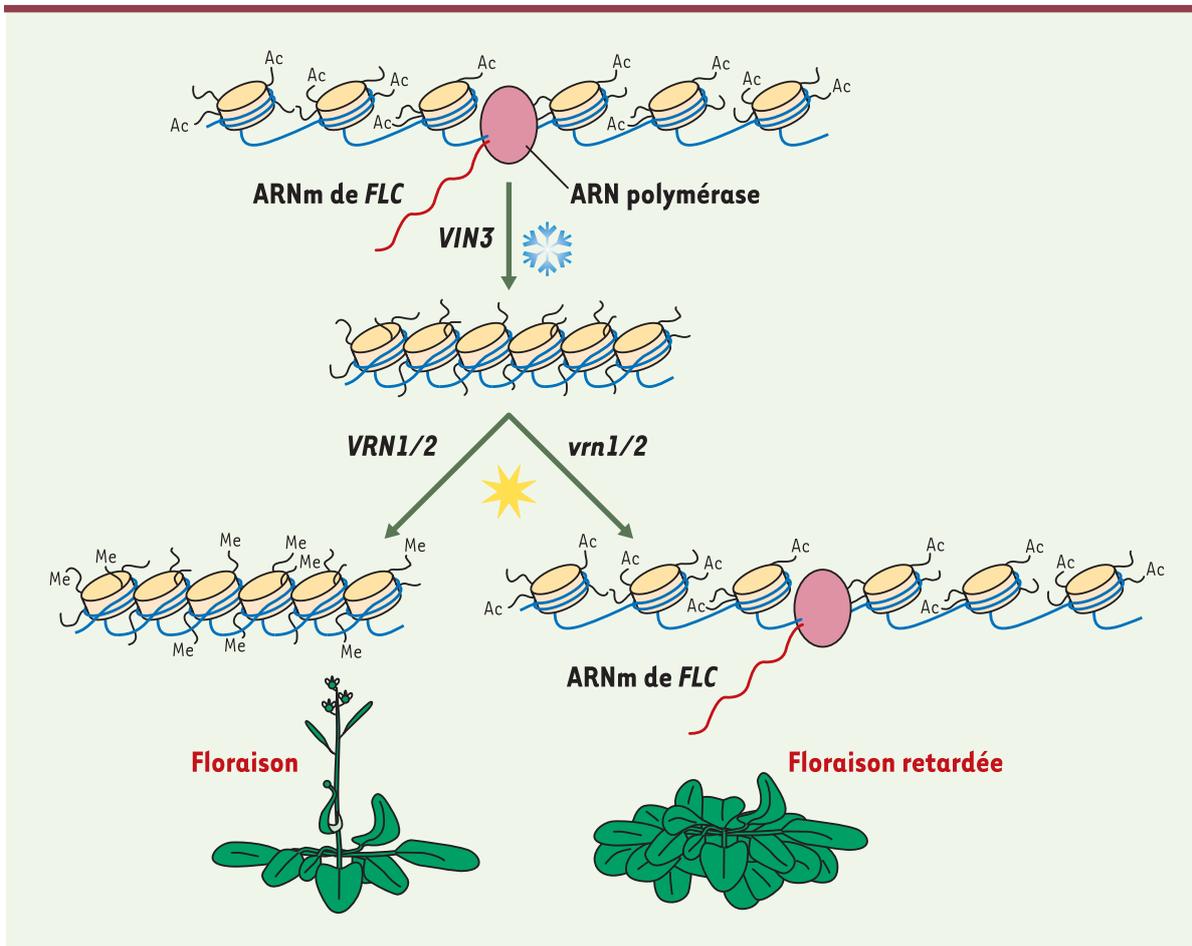


Figure 2. Modèle de répression du gène FLC par la vernalisation. En l'absence de vernalisation, le répresseur floral *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*) est dans une configuration chromatiniennne « ouverte » caractérisée par une hyperacétylation des histones H3 et H4 et une forte expression. Lors d'un traitement par le froid, l'expression du gène *VIN3* (*VERNALIZATION INSENSITIVE 3*) est induite et conduit à la désacétylation des histones H3 et H4 au locus *FLC* et à son inactivation. La répression transcriptionnelle de *FLC*, qui n'est que transitoire à ce stade, est maintenue par le complexe *VRN1/2* (*VERNALISATION 1* et *2*) impliqué dans l'ajout de groupements méthyles sur les lysines 9 et 27 de l'histone H3. C'est le maintien de cette inactivation qui permettra une floraison précoce lors de l'allongement des jours et de l'augmentation de la température. En contexte mutant *vrn1* ou *vrn2*, la répression de *FLC* n'est pas maintenue après vernalisation, ce qui conduit à un retard de la floraison.

Figure 12 : le code histone

L'expression d'un gène va dépendre en partie de la combinatoire des modifications post-traductionnelles des queues N-terminales de histones

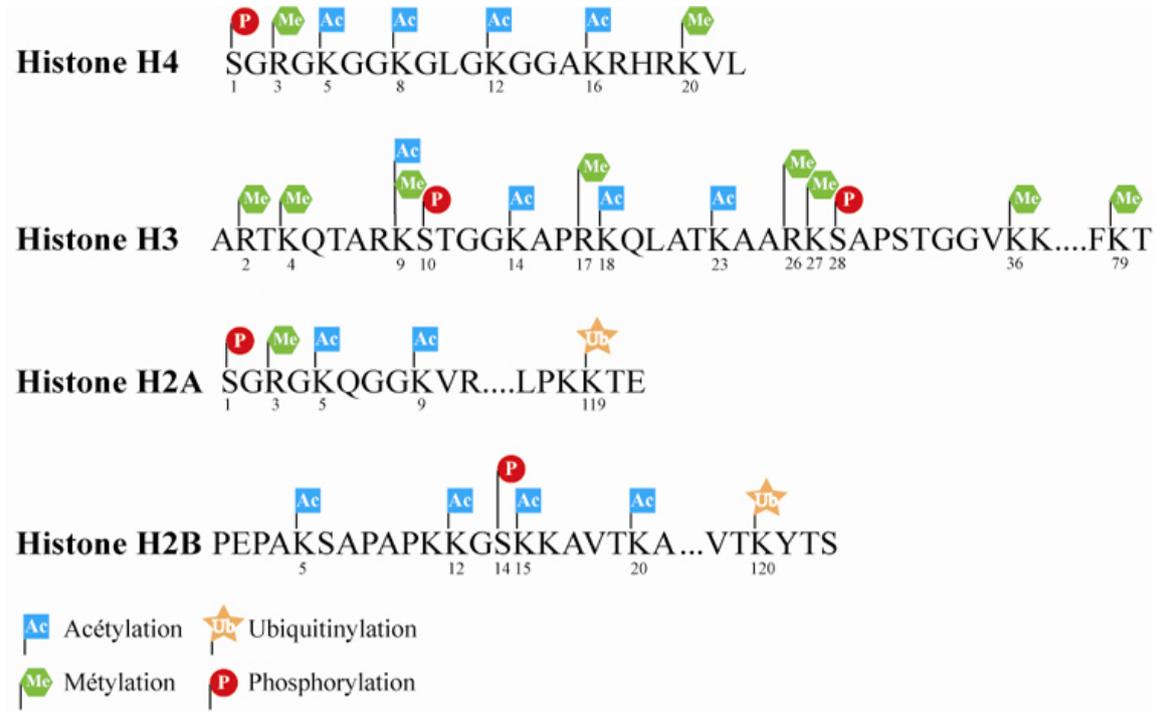


Figure 13 : expression des globines au cours du développement de l'homme

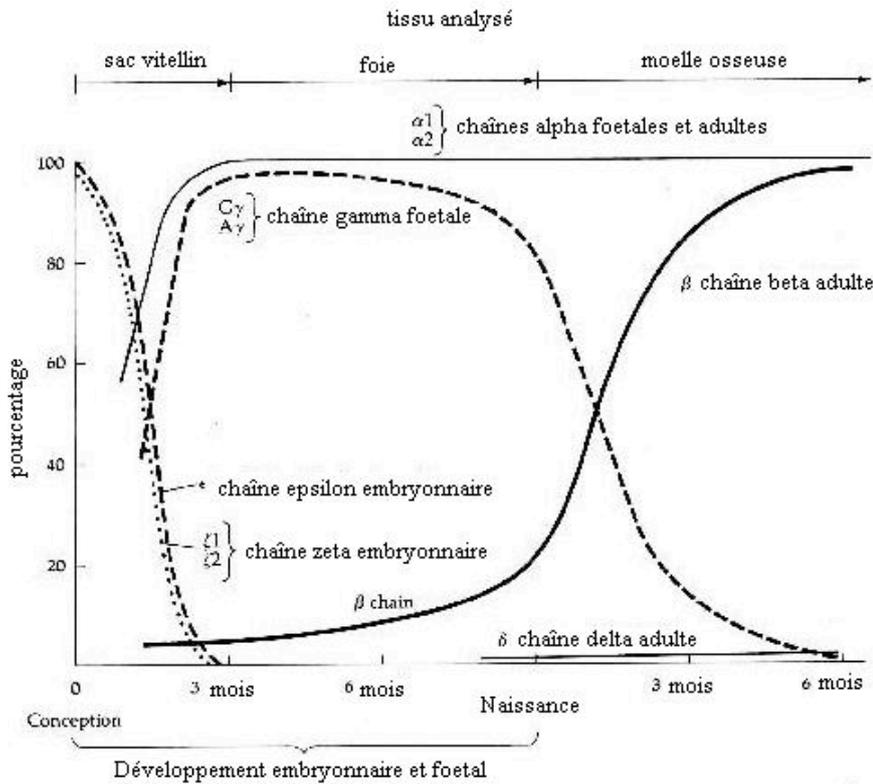
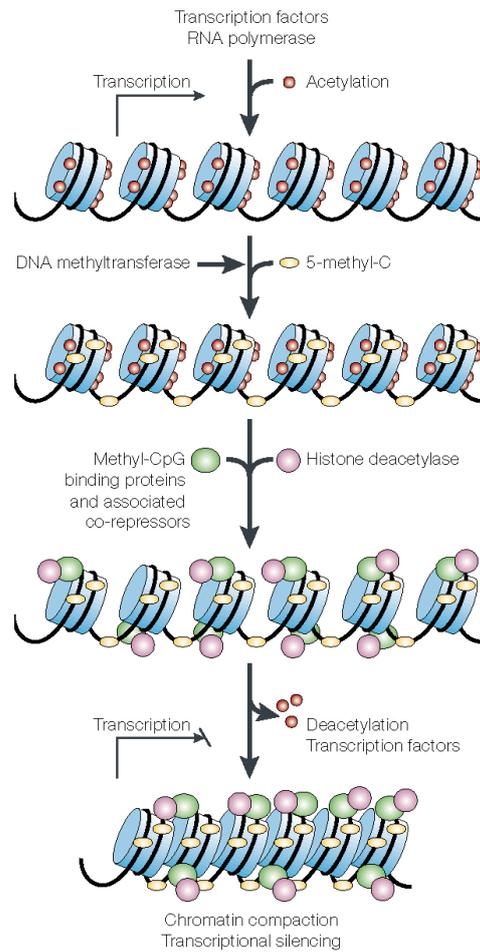


Figure 14 : la méthylation inhibe la transcription via 2 mécanismes



Nature Reviews | Genetics

Figure 15 : rôles de la méthylation de l'ADN et de l'acétylation des histones

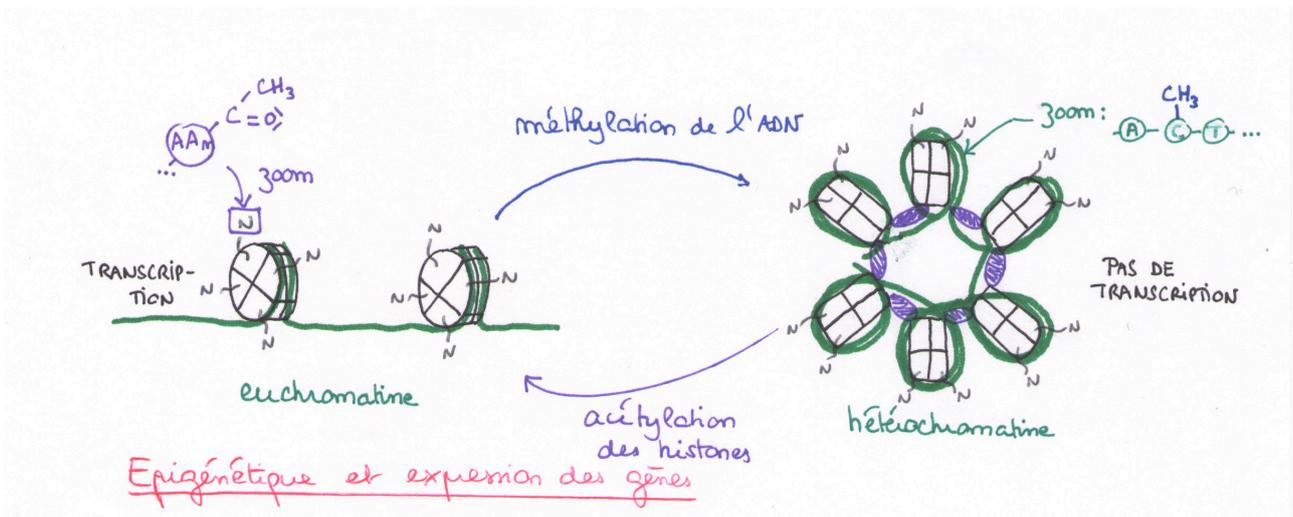


Figure 16 : inactivation de l'un des deux chromosome X chez les Mammifères femelles

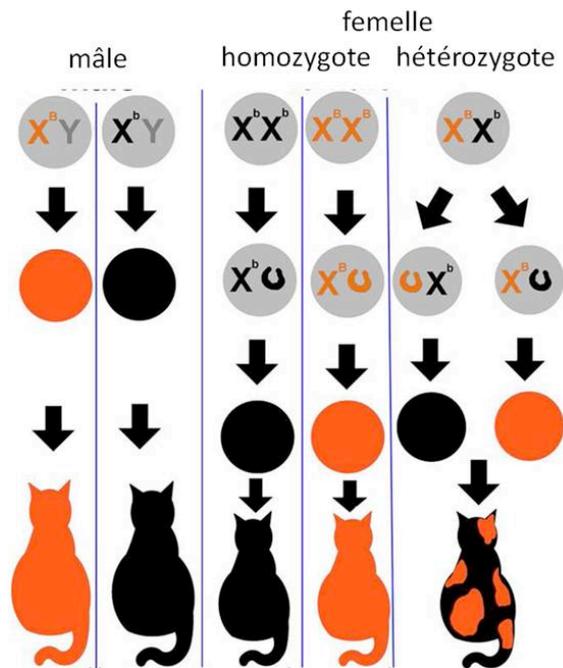


Figure 17: enhancer et silenseur sont des séquences régulatrices

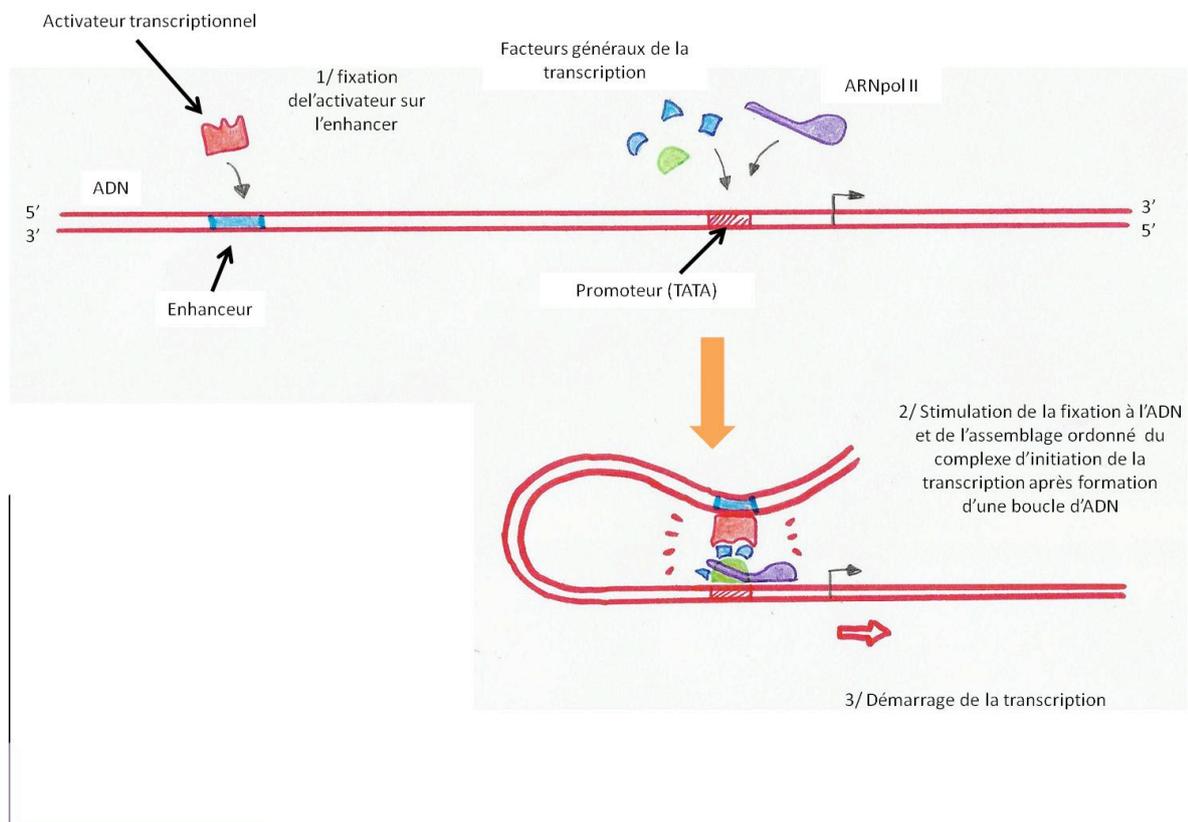
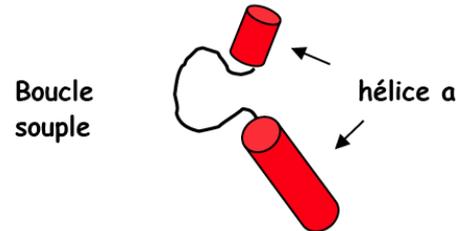


Figure 18 : structure des protéines qui se lient à l'ADN

Une protéine régulatrice reconnaît une séquence spécifique de l'ADN parce que sa **surface** est fortement **complémentaire de la surface de la double hélice** du gène → importance de l'interaction ADN-protéine, impptce de la structure III des protéines, des liaisons faibles etc...
Quels motifs permettent une fixation spécifique = une reconnaissance de séquence?

Motif hélice-tour-hélice (bHLH pour basic helix-loop-helix)

Deux hélices α reliées entre elles par une courte chaîne d'acide aminé. C'est un des motifs les plus simples et les plus communs (motifs des facteurs myogéniques, des protéines codées par les gènes homéotiques...).



Motif doigt de zinc (hors programme)

Une hélice α associée à 2 feuillet β par l'intermédiaire d'un atome de zinc. L'hélice α entre en contact avec l'ADN au niveau du grand sillon.

Les protéines activatrices de la transcription des ARN ribosomiques eucaryotes ont des motifs de ce type, les récepteurs aux hormones stéroïdes (oestrogènes par ex) aussi. Selon les facteurs, le nombre de doigts varie de 2 à plus de 60.

Motif glissière à leucine (hors programme)

Ce motif permet la dimérisation des facteurs, souvent nécessaire à l'activation de la transcription.
Mécanisme : ces facteurs possèdent des leucines tous les 7 résidus au niveau d'hélices α : les leucines sont des aa hydrophobes et leur présence tous les 7 aa permet la formation d'une hélice hydrophobe sur un de leur côté. Deux facteurs pourront ainsi s'associer au niveau de leur hélice par répulsion hydrophobe. Cette structure est appelée **fermeture éclair à leucine** ou **leucine zipper**.

2 hélice α s'imbrique pour former un Y à l'envers qui enserre l'ADN au niveau d'un grand sillon comme une sorte de pince à linge.

(in Gilbert, 5ème Edition, De Boeck)

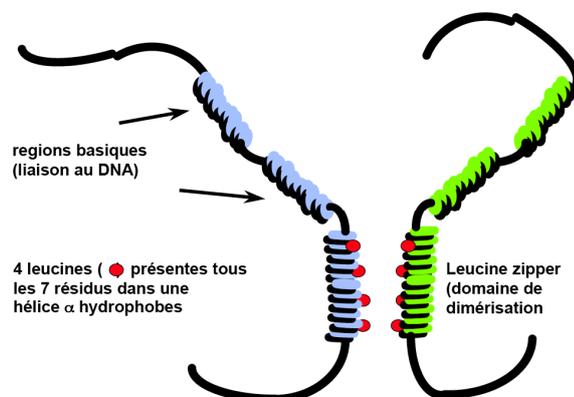


Figure 19 : formation d'un complexe d'initiation complet opérationnel
(in Dunod, 2021)

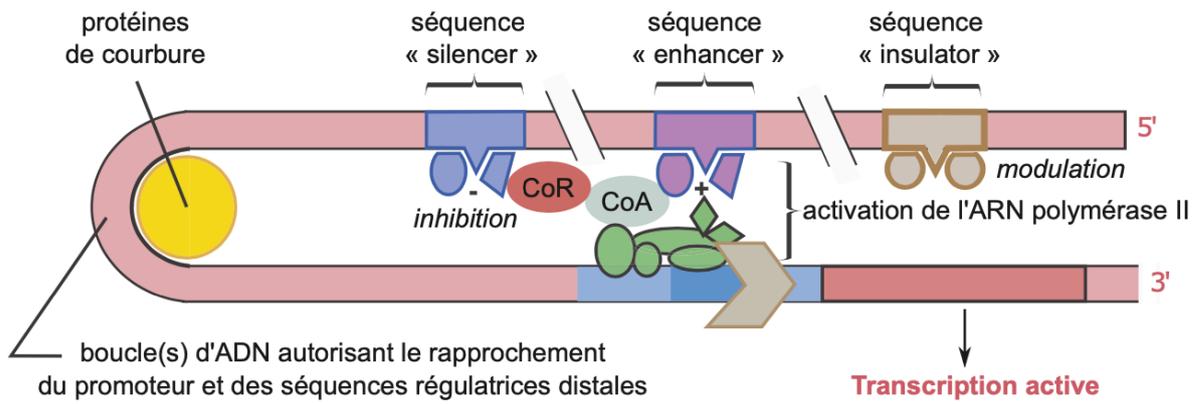


Figure 20 : bilan du contrôle de l'expression chez les Eucaryotes

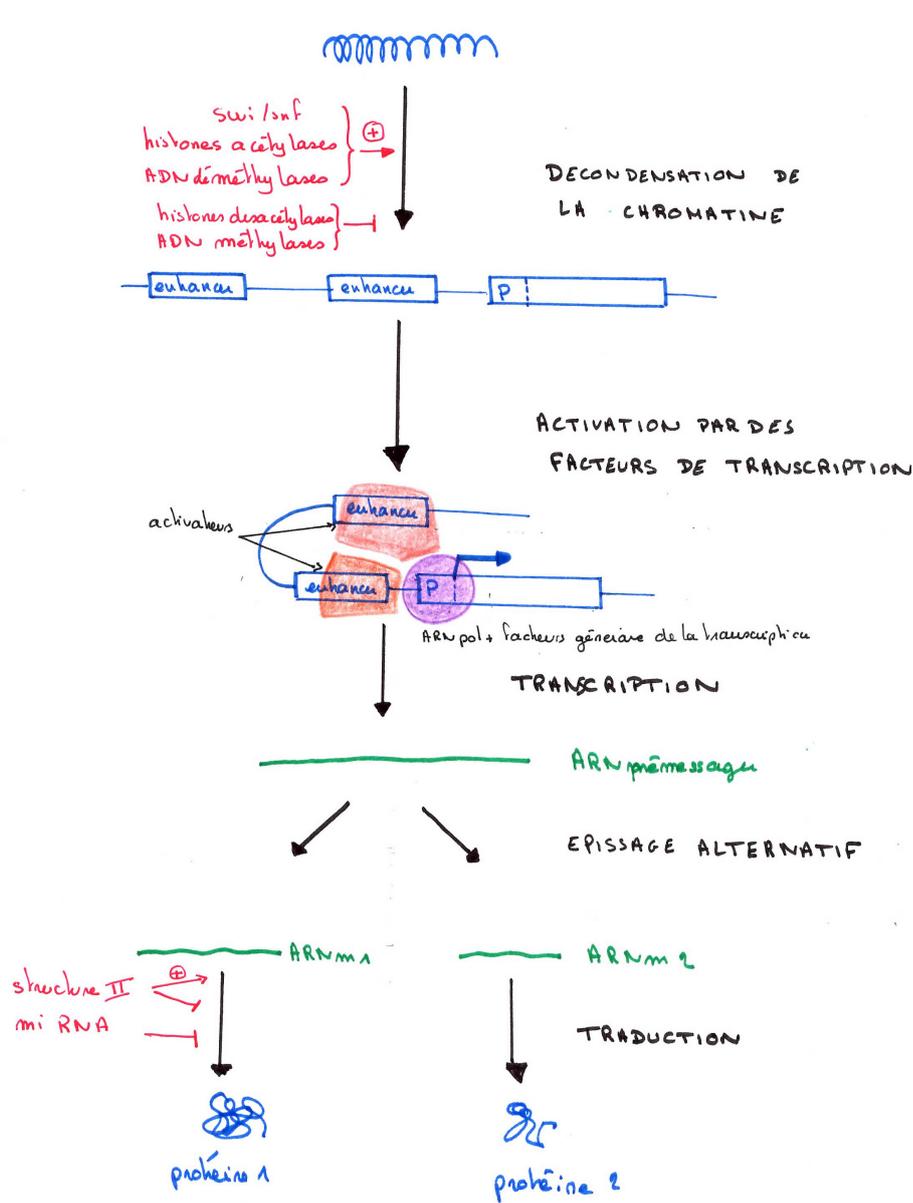
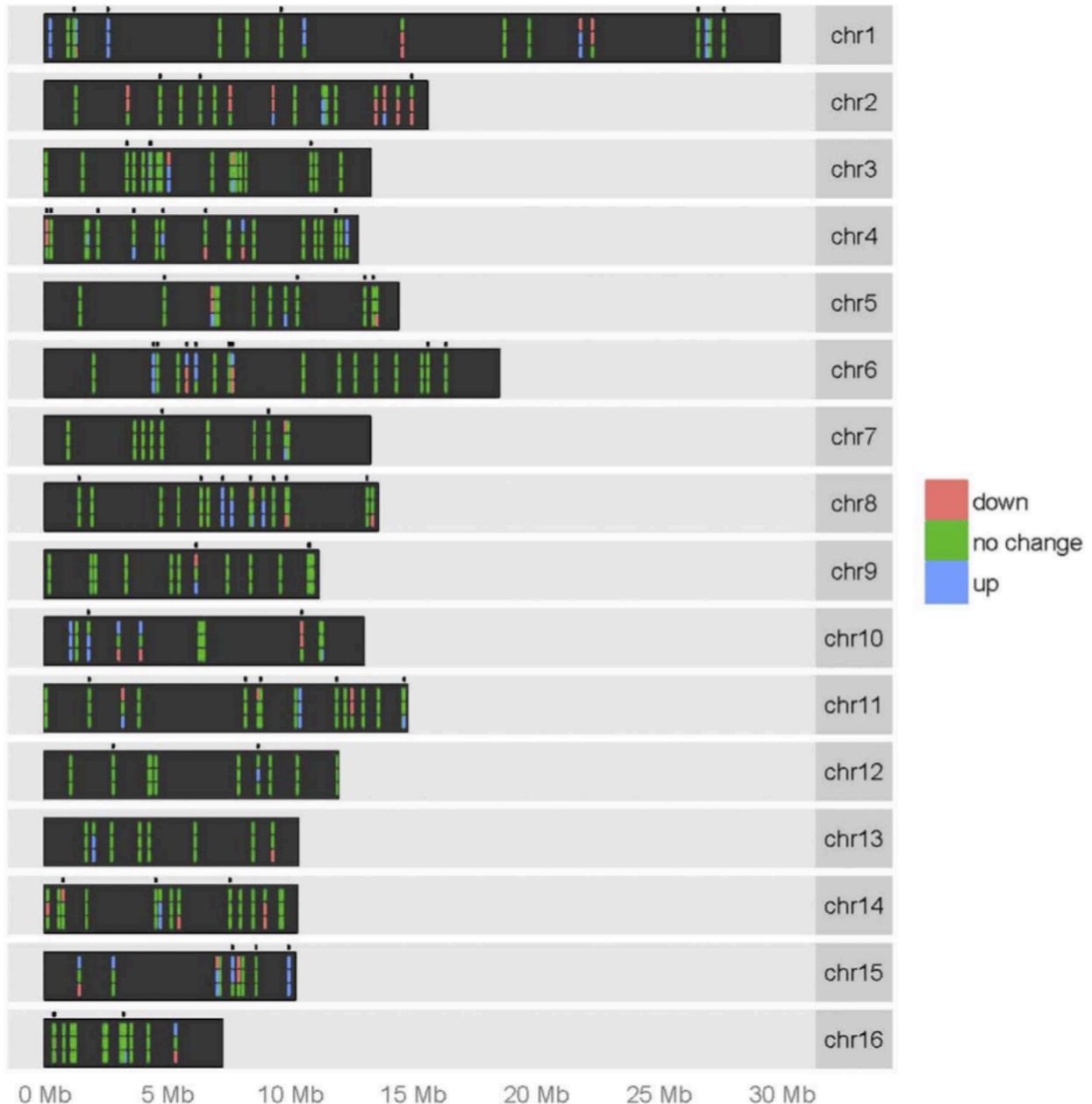


Figure 21 : mise en évidence d'un contrôle par les ARNi

<https://planet-vie.ens.fr/thematiques/developpement/contrôle-du-developpement/la-différenciation-des-abeilles-en-reines-et>

Ashby et ses collaborateurs ont étudié l'expression différentielle des miARN endogènes chez les larves et les ouvrières afin de déterminer leurs effets sur les profils d'expression des ARNm. Les résultats montrent des corrélations (négatives et positives) entre l'expression de certains miARN et ARNm.



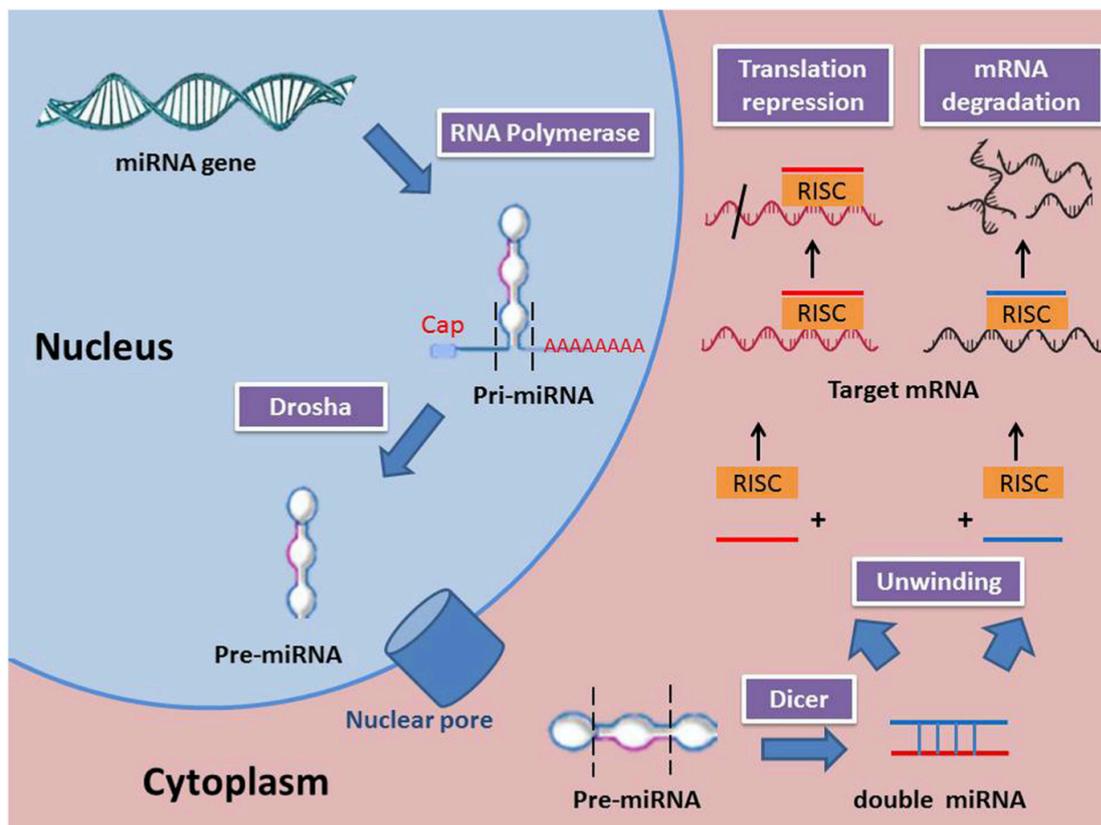
Auteur : Ashby et coll., 2016

Il existe de nombreuses **différences dans l'expression des miARN entre reines et ouvrières**. Aux 4e et 5e jours de développement (stade larvaire), les profils d'expression de certains miARN et ARN messagers diffèrent significativement entre les ouvrières et les reines.

- Les **ARNm qui sont plus exprimés chez les reines** que chez les ouvrières sont ceux qui codent des protéines impliquées dans le **métabolisme** protéique et les voies énergétiques.
- Les ouvrières présentent un nombre plus important de transcrits codant des protéines impliquées dans la digestion, dans les voies de signalisation du développement embryonnaire (MAPK/ERK, etc.), de l'orientation cellulaire (chimiokines, etc.) et dans le développement synaptique (glutamatergique, dopaminergique, etc.). Ceci pourrait expliquer les capacités remarquables de navigation et d'orientation dans l'espace des ouvrières, comme cela a pu être supposé par d'autres travaux bien que les mécanismes ne soient pas encore clairement connus.

Les chercheurs observent que les miARN endogènes et la méthylation de l'ADN participent à la régulation de gènes différents. La méthylation de l'ADN s'effectue surtout au niveau des gènes des voies physiométraboliques tandis que les miARN ciblent principalement les transcrits (et donc l'expression des gènes) de la maturation neuronale et des différences structurelles de l'abeille.

**Figure 22 : Rôle des si et mi RNA
(Soliman et al., 2018)**



miRNA biogenesis and mechanisms of action (RISC, RNA-induced silencing complex; Pri-miRNA, Primary miRNA; Pre-miRNA, precursor miRNA).