

**TP SV
F3**
GENETIQUE MOLECULAIRE : ETUDE DE L'EXPRESSION GENETIQUE

COURS : SV-F-1.1, SV-F-3, SV-D-2.3, SV-D2.4 TP : SV-D1, SV-D2, SV-F1



Au-delà d'études sur la structure des génomes et des gènes (TP F1), les techniques de génétique moléculaire permettent d'étudier l'expression des génomes.

Le but de ce TP est d'envisager différentes méthodes d'étude de l'expression génétique.

Programme officiel :

- Analyser des résultats issus d'expériences de transgénèse ou de mutagenèse.
- Analyser et interpréter des résultats expérimentaux utilisant les techniques d'hybridation *in situ* ou de puce à ADN.
- Analyser et interpréter des résultats expérimentaux utilisant les techniques de Southern blot, northern blot, western blot, PCR et RT-PCR.
- Identifier et justifier les témoins de charge des blots.

Compétences :

- Exploiter données utilisant des méthodes d'étude de l'expression des génomes :
 - transgénèse, mutagenèse dirigée et aléatoire
 - hybridation *in situ*, utilisation de gène rapporteur, puce à ADN
 - northern blot, western blot, PCR et RT-PCR

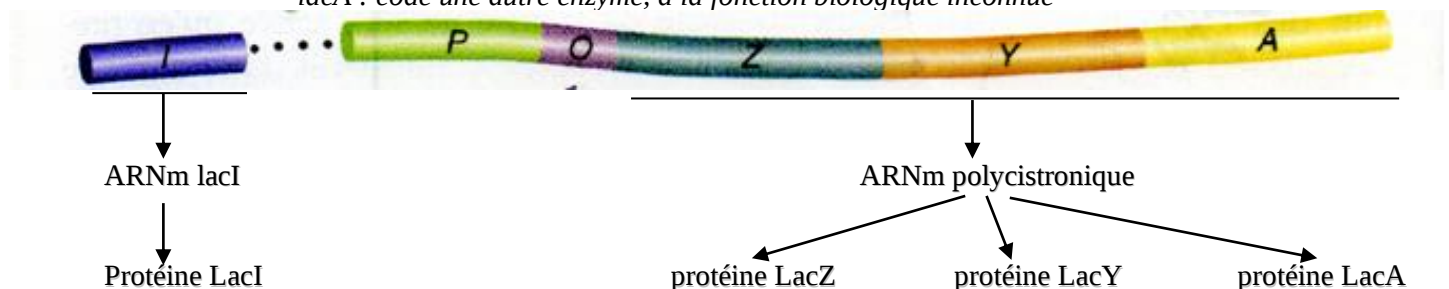
*Explications sur les différentes techniques :
Voir poly 1 - préparation*

6. Exercices

EXERCICE 1 : PUCE A ADN ET CONTROLE DE L'OPERON LACTOSE D'E. COLI

L'opéron lactose de la bactérie *Escherichia coli* correspond à

- Un gène régulateur (**lacI**) codant une protéine capable de se lier à l'ADN au niveau de l'opérateur
- Une unité transcriptionnelle comprenant :
 - o Un **promoteur**, permettant la fixation de l'ARN polymérase et donc la transcription d'un unique ARNm
 - o D'un **opérateur**, permettant la fixation de la protéine tétramérique LacI
 - o De trois gènes de structure :
 - **lacZ** : code la bêta-galactosidase, enzyme hydrolysant le lactose en glucose + galactose
 - **LacY** : code une perméase au lactose, permettant l'entrée du lactose dans la cellule
 - **lacA** : code une autre enzyme, à la fonction biologique inconnue



Deux souches d'*E. coli* sont testées pour étudier le fonctionnement de l'opéron lactose :

- La souche sauvage I⁺P⁺O⁺Z⁺
- La souche mutante I⁺P⁺o⁻Z⁺, mutée au niveau de la séquence de contrôle O (opérateur)

On cultive les souches en milieu soit riche en glucose, soit riche en lactose.

Les ARNm sont ensuite extraits puis marqués par une molécule fluorescente :

- Les ARNm de la souche sauvage sont marqués en vert
- Les ARNm de la souche mutante sont marqués en rouge

Les ARNm marqués sont ensuite hybridés sur une puce à ADN portant des sondes complémentaires :

- A lacI : protéine inhibitrice de l'opéron lactose
- A lacZ : bêta-galactosidase
- A CRP : gène codant la protéine CAP

I+P+O+Z+	I+P+o-Z+	lac I	Z	CRP	
glucose	glucose				 vert + rouge
glucose	lactose				 ARNm muté
lactose	glucose				 ARNm sauvage
lactose	lactose				 pas de signal

- 1) Analyser les résultats afin de proposer une hypothèse explicative pour la souche porteuse de la mutation o-

EXERCICE 2 : NORTHERN BLOT

La **figure 1** (page suivante) correspond à un northern blot réalisé sur des extraits d'embryon de Xénope de différents stades :

- Les stades de développement sont indiqués en haut, du stade 1 (cellule œuf) au stade 41 (têtard) ;
- L'ARNm du gène MyoD a été révélé par hybridation avec une sonde radioactive spécifique de ce gène ;
- L'ARNm de l'actine cardiaque a été de même révélée par hybridation avec une sonde radioactive spécifique (cette étape a été menée après le premier marquage, après avoir retiré les sondes MyoD hybridées : on a donc réalisé deux northern blot sur le même résultat d'électrophorèse) ;
- La ligne du bas correspond à une visualisation de l'ARNr 18S, témoin de charge

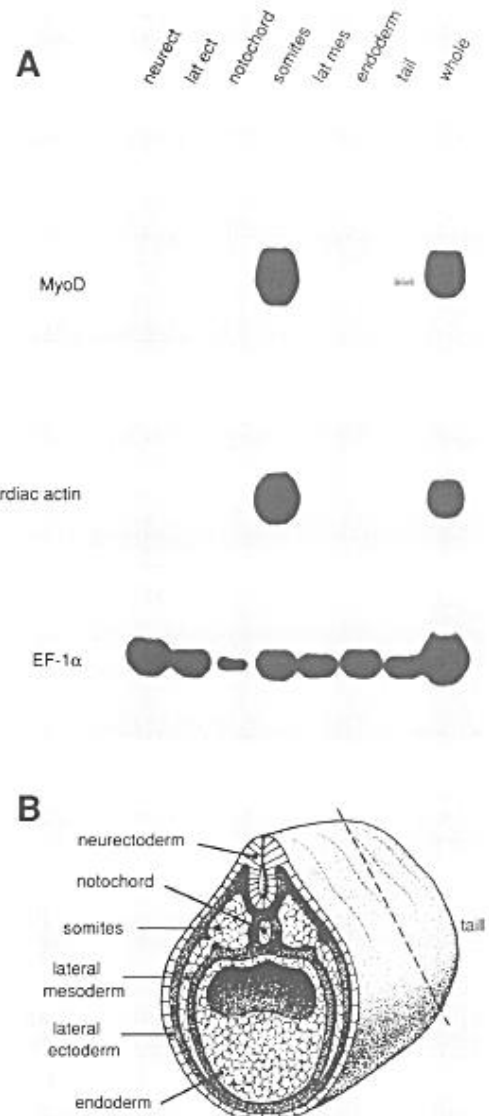
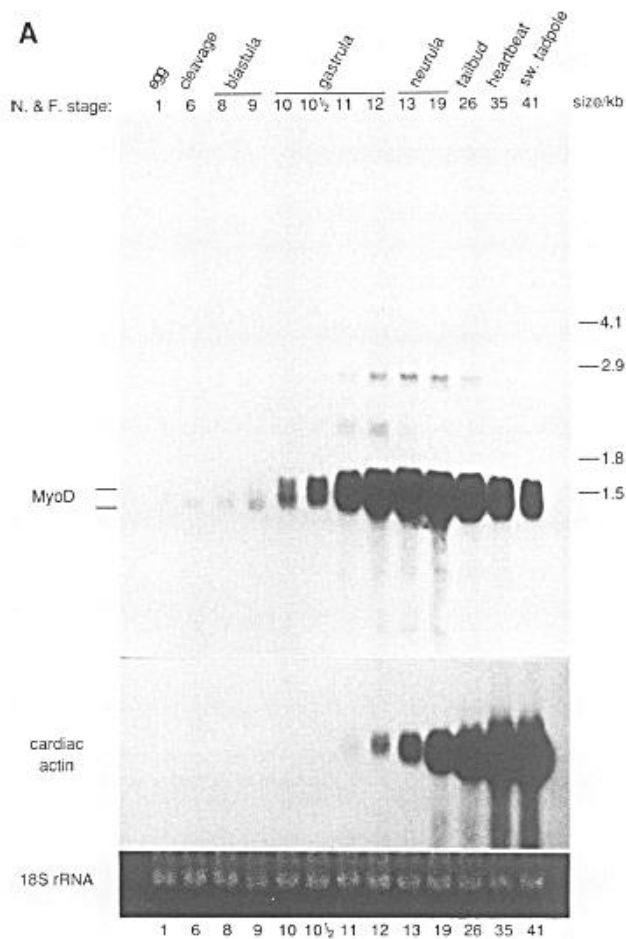
- 1) Que peut-on déduire de l'analyse de ce blot, par rapport à l'expression du gène MyoD au cours du développement embryonnaire chez le Xénope ?
- 2) Que montre l'expression de l'actine cardiaque ?

La **figure 2** montre le résultat d'un northern blot réalisé à partir de tissus embryonnaires disséqué à partir d'embryons de Xénope au stade 20 (bourgeon caudal, *tail bud*). A ce stade la polarité dorso-ventrale est en place, et divers tissus embryonnaires préfigure les futurs tissus de la larve (par exemple, le neurectoderme donnera la moelle épinière, l'endoderme le tube digestif, etc.). *whole* = *embryon en entier*.

On utilise successivement trois sondes :

- Complémentaire de l'ARNm MyoD (même sonde que pour la figure 1)
- Complémentaire de l'ARNm de l'actine cardiaque (même sonde que pour la figure 1)
- Complémentaire de l'ARNm EF-1 α , codant une protéine intervenant dans la traduction chez les eucaryotes

- 3) Quel rôle joue ici l'analyse de l'expression de EF-1 α ?
- 4) Que déduire de l'analyse des résultats pour MyoD et l'actine cardiaque ?
- 5) Quelle hypothèse peut-on tirer des deux documents quant au rôle de MyoD au cours du développement embryonnaire chez le Xénope ?

Figure 1 :**Figure 2 :**

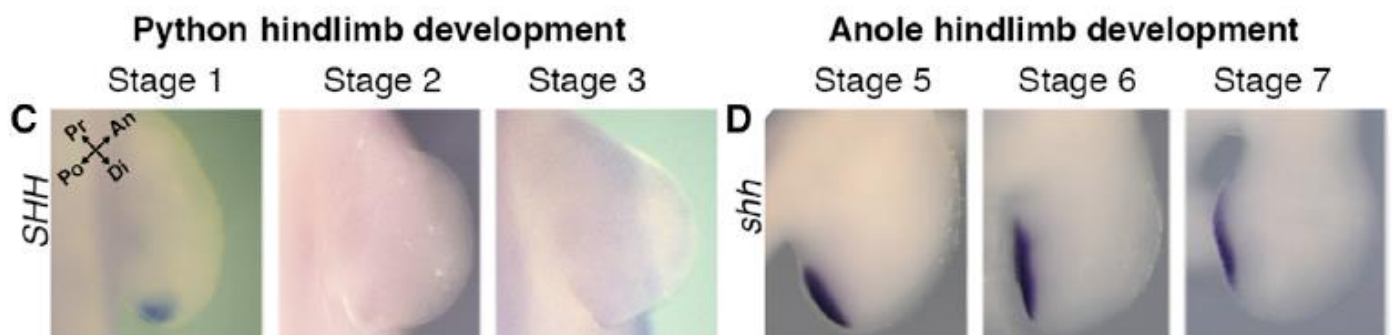
EXERCICE 3 : LE BOURGEON DE MEMBRE DES VERTEBRES – HYBRIDATION *IN SITU* ET MUTAGENESE

On cherche ici à étudier le bourgeon de membre des Vertébrés. Le bourgeon de membre est une masse cellulaire qui se développe pendant le développement embryonnaire et qui aboutit à la formation du membre.

On étudie en particulier le rôle de la région ZRS : il s'agit d'une région du chromosome 7 chez l'Homme, situé à environ 850 kb du gène *Shh* (Sonic Hedgehog).

1) Expression de *Shh* dans le bourgeon de membre

On étudie par hybridation *in situ* l'expression de *Shh* dans le bourgeon de membre postérieur du Python (un serpent possédant des membres rudimentaires) et de l'Anole (un lézard ; il possède des membres complets). L'expression de *Shh* serait similaire chez un Mammifère comme la Souris.



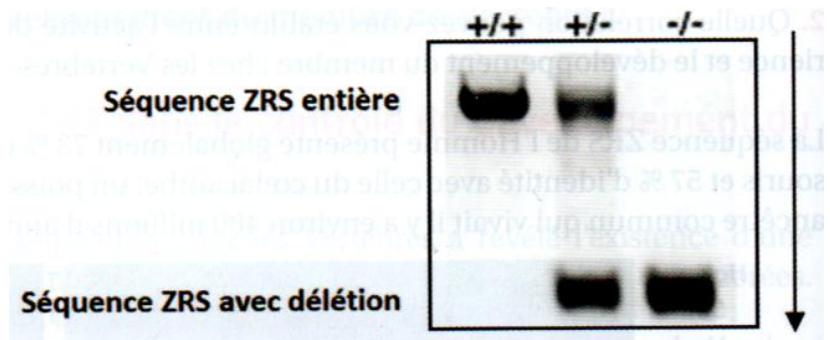
➡ En quoi ces observations sont cohérentes avec un rôle important de Shh pour le développement du membre ?

2) Recombinaison homologue

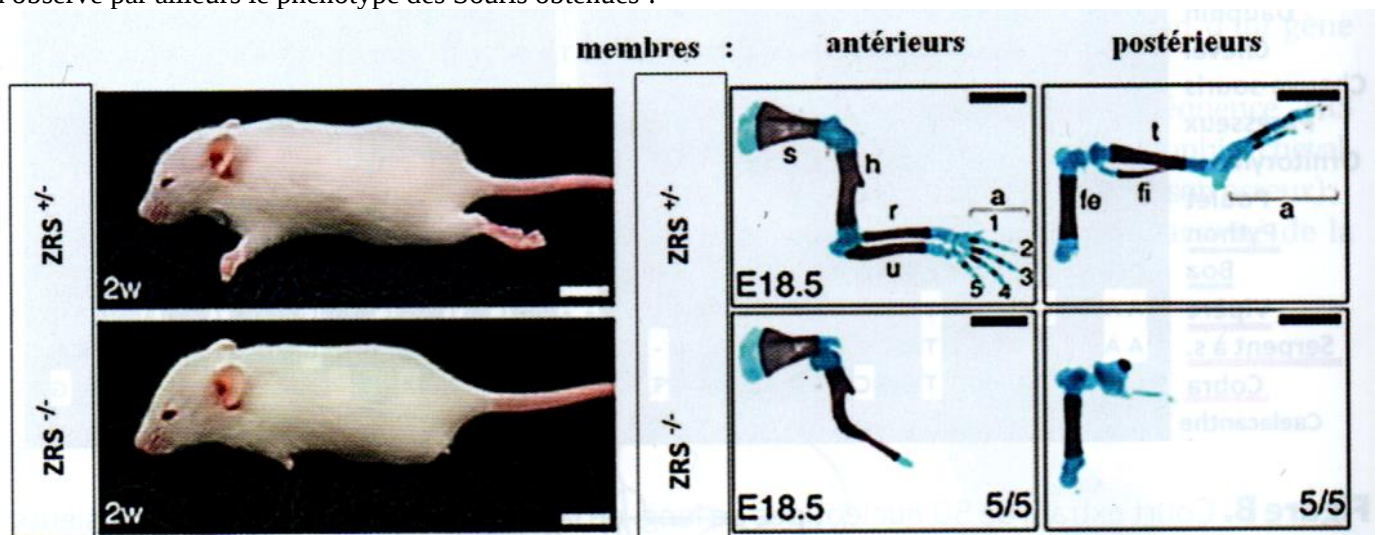
Des souris ont été produites par recombinaison homologues, afin :

- De réaliser une délétion de 1324 pb dans la région ZRS
- De placer le gène lacZ sous le contrôle de la région ZRS

On vérifie le génotype des Souris en réalisant une PCR utilisant des amorces complémentaires de la région ZRS.



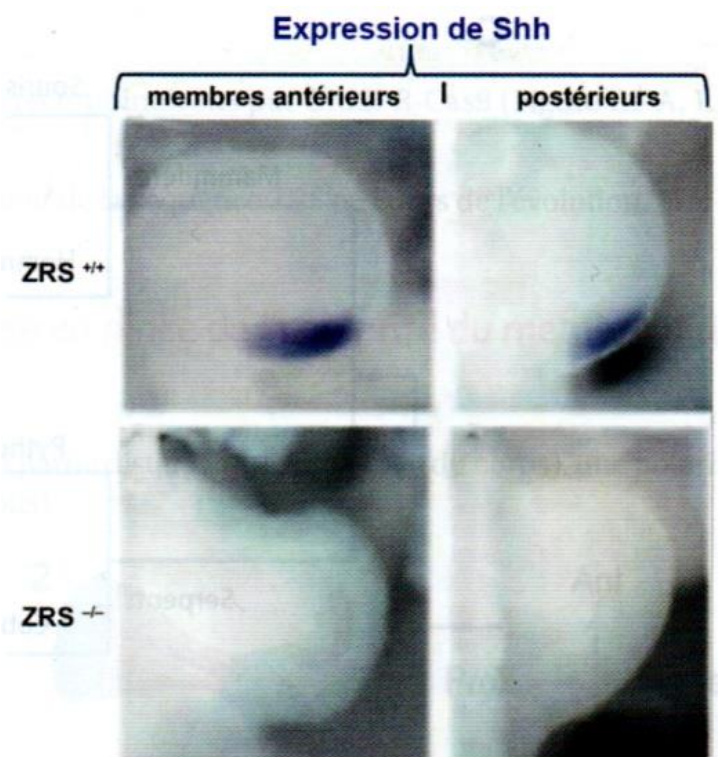
On observe par ailleurs le phénotype des Souris obtenues :



➡ Quel rôle semble jouer ZRS ?

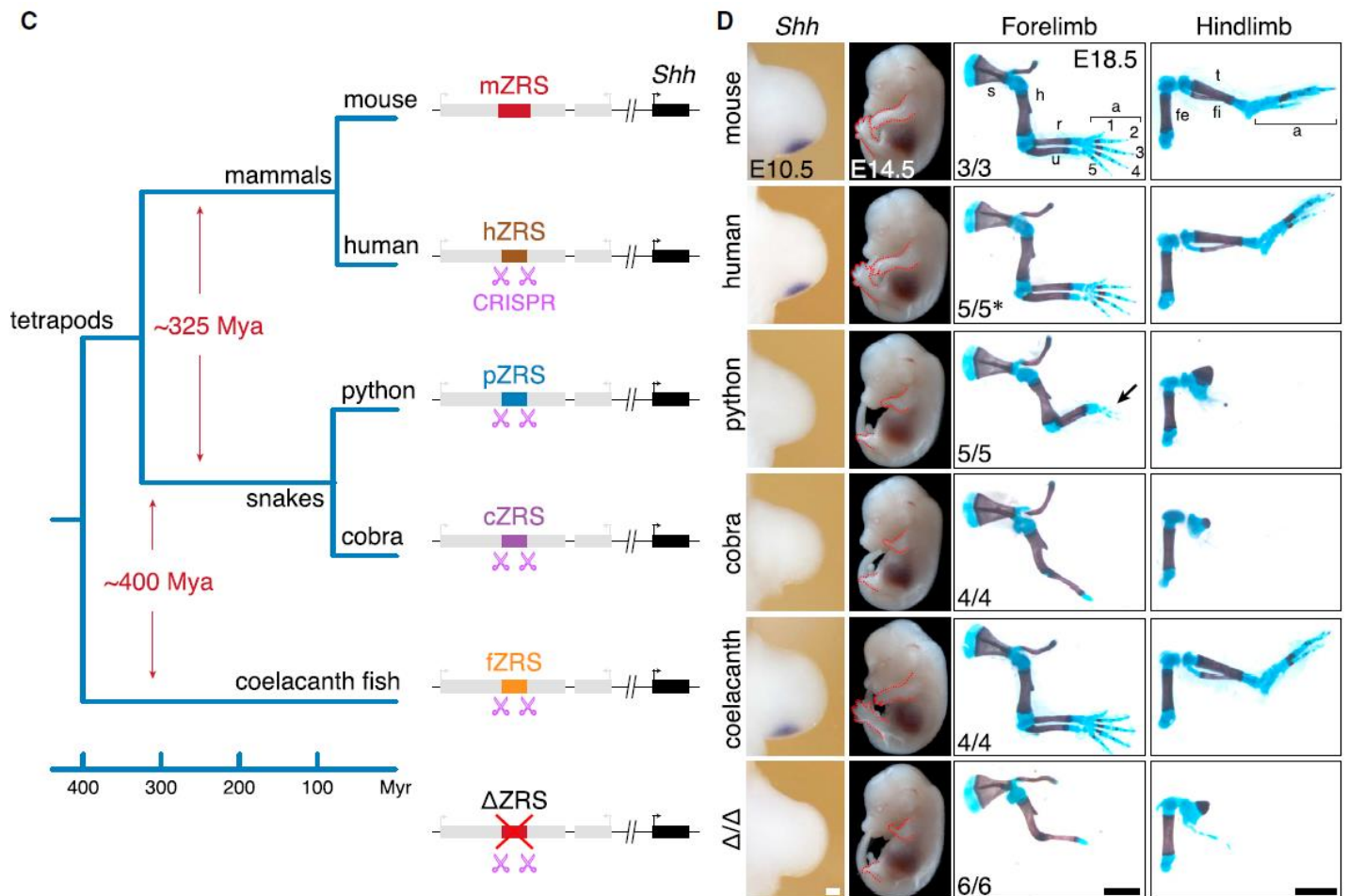
On réalise ensuite une hybridation *in situ* utilisant une sonde complémentaire à l'ARNm Shh (voir ci-contre).

➡ Quelle hypothèse peut-on émettre sur la relation entre la région ZRS et le gène Shh ?



3) Mutagenèse dirigée

On utilise le système CRISPR/Cas9 pour remplacer la région ZRS, chez des Souris, par la région ZRS de différentes espèces de Vertébrés : voir ci-dessous



Mouse : souris

Human : Homme

Python et cobra : serpents, présence de membres postérieurs très réduits

Cœlacanthe : poisson Sarcoptérygien

Δ ZRS : délétion de la région ZRS (voir partie 2)

➡ Ces résultats permettent-ils de confirmer l'hypothèse émise précédemment ?

➡ Qu'apporte l'observation chez le Cœlacanthe, d'un point de vue évolutif ?