**Etude de la fonction d’un gène : la surexpression et l’inhibition**

Il existe différentes manières d’étudier la fonction d’un gène. Celles expliquées par la suite se basent sur l’expression des protéines associées aux gènes étudiés. Pour cela, 2 angles d’attaques sont possibles :

* **Surexpression des protéines :**

Pour surexprimer une protéine, il existe principalement 2 solutions.

La première est d’augmenter la traduction du gène codant pour la protéine ciblée par l’introduction d’un promoteur fort, comme le promoteur 35S. Pour cela, on peut utiliser toutes les méthodes permettant de modifier un organisme supérieur, qu’il appartienne au règne animal ou végétal. (Voir fiche transformation organisme supérieur). Ces méthodes seront utilisées pour permettre la surexpression d’un gène dont la fonction pourra être étudié par le biais de l’impact de sa surexpression sur l’organisme modifié à différentes échelles (physiologique, cellulaire, …).

Tous les avantages et limites sont liés à la technique utilisée pour modifier le génome.

La deuxième méthode est d’utiliser un promoteur inductible, soit un promoteur qui réagit à un signal, que ce soit une molécule comme l’éthanol ou la tétracycline, ou une condition environnementale comme une température précise. Comme avec la technique précédente, il est possible d’activer un gène, et d’initier la synthèse de protéines et d’identifier ou de comprendre la fonction d’un gène, à un moment et/ou un endroit bien précis d’un transgène.

* **Inhibition des protéines :**

Pour inhiber l’expression d’une protéine, il existe également différentes méthodes :

* + **RNAi** :
		- Principe : voir fiche RNAi
		- Dans le cadre de l’étude d’un gène par inhibition, il faut introduire dans l’organisme étudié des ARN interférents (si ou mi, de taille suffisamment petite pour ne pas enclencher une réponse anti virale). Ceux-ci seront préalablement sélectionnés pour être plus ou moins complémentaire avec les ARNm dont on veut inhiber voire arrêter la traduction.
	+ **CRISPR-Cas9** :
		- Fonctionnement : voir fiche CRISPR-Cas9
		- Principe : Il faut introduire dans l’organisme étudié un complexe CRISPR-Cas9/ARN guide qui soit complémentaire à la séquence du gène que l’on veut inhiber. Deux cas sont alors possible : après coupure de l’ADN, il est laissé à la cellule le soin de réparer l’ADN ou une séquence d’intérêt inhibant ici la traduction/transcription du gène ciblé est introduit en même temps pour permettre son introduction dans le génome.
	+ **Banque de Mutant** :
		- Technique hasardeuse basée sur la possibilité de l’existence d’un mutant au niveau du gène ciblé, ce qui permet alors d’étudier les conséquences d’une telle mutation.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Avantages | Inconvénients |
| Promoteurs forts | Voir fiche « Modification d’organismes supérieurs » | Peut avoir un effet léthalS’active en général dans l’organisme entier (peu de contrôle spécifique possible) |
| Promoteurs inductibles | Précision du lieu, de l’instant, de la durée et de l’importance de l’activation du gène | Voir fiche « Modification d’organismes supérieurs » |
| RNAi | Rapide (24h)Gestion du temps d’impact de l’interférenceSpécifique (si on utilise les bons siRNAs)Inclus dans la « mécanique cellulaire »Peu onéreuse | Taille du siARN à introduire limitée à environ 21 nucléotides, particulièrement pour les vertébrés -> sinon réponse anti virale puissanteNécessité de connaître la séquence de l’ARNm que l’on veut dégrader |
| CRISPR-Cas9 | Voir fiche « CRSIPR-Cas9 » | Voir fiche « CRISPR-cas9 » |

**Application :**

L’application principale de ces techniques est de découvrir des fonctions d’un gène, et donc de pouvoir faire de la recherche dans de nombreux domaines : la recherche fondamentale, la médecine, l’agronomie, …

**Sources**

1. Promoteurs inductibles : <http://mastervrv.free.fr/S2/TBCV/Diaporamas/BKHCSV.pdf>
2. Rappel sur la préparation au clonage/préparation de vecteurs pour différents types d’organisme : <http://www.cetice.u-psud.fr/2007/ogm/doc/5_en_savoir_plus/biotechno/vecteurs_dexpression.pdf>
3. Fiches : CRISPR-Cas9, Modification d’organismes supérieurs, RNAi.