

L3S6 – Licence de Biologie Santé

Année universitaire 2024-25

UE SV306

Développement

TRAVAUX PRATIQUES ET TRAVAUX DIRIGES

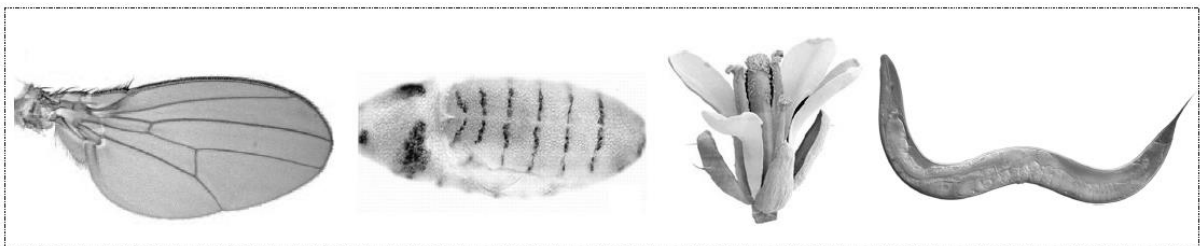


Table des matières

Table des matières	3
TD1 – Méthodologies couramment utilisées en génétique du développement.....	4
TD2 - Bioinformatique.....	8
TD3 - Réseau génétique et cascade de segmentation moléculaire – Partie I	13
TD4 - Réseau génétique et cascade de segmentation moléculaire – Partie II.....	15
TD5 - Dissection de séquences régulatrices d'un gène de développement.....	17
TD6 « EVO-DEVO » – Etude des gènes homéotiques.....	19
TD7 – Signalisation et développement végétal : exemple de SHR et SCR	25
TD8 - Photomorphogenèse.....	29
TD9 - La régionalisation du système nerveux embryonnaire	35
TD10 - Régionalisation antéro-postérieure du bourgeon de membre	40
TP-BV Signaux hormonaux : Effets sur le développement d' <i>A. thaliana</i>	45

Responsables/contacts :

Céline CHARON (IPS2-Bâtiment 630 – celine.charon@universite-paris-saclay.fr)

Marianne DELARUE (IPS2-Bâtiment 630 – marianne.delarue@universite-paris-saclay.fr)

Laurent THEODORE (Neuro-PSI – laurent.theodore@universite-paris-saclay.fr)

TD1 – Méthodologies couramment utilisées en génétique du développement

Gène rapporteur – Transgène – Génétique inverse – Knock-down – Gain ou perte de fonction

I. PREREQUIS : Ce travail est à réaliser avant cette séance.

Il ne sera pas corrigé en séance, mais il est nécessaire à la compréhension de celle-ci.

Q1 : Définir les notions d'allèles « perte de fonction » et « gain de fonction » d'un gène.

Q2 : Réviser les méthodes couramment utilisées pour détecter l'expression d'un gène eucaryote (déjà vues lors de vos études avant le S6), et faites la distinction entre les informations qualitatives et/ou quantitatives apportées par ces méthodes.

Un tableau synthétique vous est proposé pour résumer ces informations (à compléter avant la séance) :

Nom de la méthode	Outils de détection	Cible de la détection	Nature qualitative ou quantitative de l'information recueillie	Echelle d'observation
Northern Blot				
RT-PCR				
Hybridation <i>in situ</i>				
Western Blot				
Immuno-détection				

II. Exercice à réaliser après la séance :

Voie de signalisation

Q1 : Rappelez sous forme schématique la structure de base d'une voie de signalisation (du signal extracellulaire perçu jusqu'aux cibles de cette voie).

Q2 : Quelles sont les méthodes disponibles pour phénocopier (mimer) une perte ou un gain de fonction d'un gène codant un acteur d'une voie de signalisation ?

III. Gènes rapporteurs : principe et applications en génétique du développement

Exemple d'application chez les plantes (*Arabidopsis thaliana*)

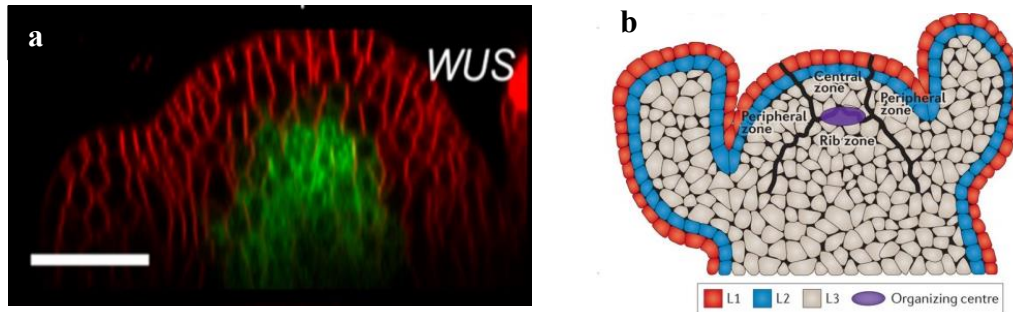


Figure 1 : (a) Méristème apical caulinaire (MAC) d'une plante transgénique montrant le domaine d'expression du gène codant pour la GFP sous le contrôle du promoteur du gène *WUSCHEL* (*pWUS::GFP-RE*). La fluorescence verte de la GFP est détectée dans le centre organisateur du MAC, au niveau du réticulum endoplasmique des cellules (grâce au signal d'adressage RE) (Yadav *et al.*, 2009 ; 2013). Les membranes plasmiques des cellules sont marquées en rouge grâce au fluorochrome FM64-4. (b) Rappel de l'organisation en couches (L1, L2 et L3) et en zones du MAC.

Q1 : Quels sont les avantages à utiliser le gène *GFP* comme gène rapporteur par rapport au gène *lacZ* ? Quelles en sont les applications ?

Q2 : Des plantes sauvages d'*Arabidopsis thaliana* ont été transformées avec une construction correspondant à un fragment de 4,5 kb en amont du codon ATG du gène *WUSCHEL* (*WUS*), fusionné avec la séquence codante du gène de la GFP et un signal d'adressage RE permettant de retenir la protéine GFP dans le réticulum endoplasmique des cellules. Cette construction est appelée *pWUS::GFP-RE*. La Figure 1a montre la localisation de la fluorescence verte de la GFP observée chez ces plantes (observation au microscope à épifluorescence). Pourquoi utiliser un signal d'adressage ? Quelle(s) autre(s) méthode(s) pourrait-on utiliser pour détecter le produit du transgène *pWUS::GFP* ?

Q3 : Chez *A. thaliana*, la taille moyenne des promoteurs distaux, incluant les séquences CIS régulatrices est de 500 pb en amont du codon ATG. Décrire une stratégie pour définir plus précisément la taille du promoteur distal du gène *WUSCHEL* incluant les séquences CIS-régulatrices permettant de diriger spécifiquement l'expression du gène dans le centre organisateur du MAC.

Q4 : Cette méthode permet-elle de localiser la protéine *WUS* au sein du MAC ?

Q5 : Quelle construction utilisant la GFP pourrait-on utiliser pour localiser la protéine *WUS* au sein de plantes transgéniques ?

Q6 : Sachant que la protéine *WUS* est un facteur de transcription, où s'attend-on à trouver la protéine de fusion *WUS::GFP* exprimée sous contrôle du promoteur distal de *WUS* ?

L'expérience a été réalisée et montre en fait une distribution de WUS::GFP hors du territoire où le promoteur distal est actif (couches L1 et L2). Que peut-on en conclure ?

IV. Méthodes de génétique inverse pour l'étude de la fonction d'un gène

Partie 1 : Exemples d'approche chez les animaux

Q7 : Représenter un gène codant une protéine (nommée COCO) possédant trois exons, un promoteur et une région amont contenant des séquences régulatrices. Compléter votre schéma en incluant les produits du gène (ARNm et protéine(s)) et les processus correspondants, en plaçant un codon initiateur situé vers le milieu du premier exon, un codon stop situé vers le milieu du troisième exon, et positionnez la phase ouverte de lecture.

Q8 : Citer différents types de mutations susceptibles d'engendrer une perte de fonction complète du gène.

Q9 : Méthode de Knock-down dérivée de la stratégie ARN antisens : utilisation d'un oligonucléotide antisens morpholino.

a) Positionner l'oligonucléotide morpholino sur votre schéma de la Q7. Comment peuvent être affectées la transcription et la traduction en présence d'un oligonucléotide morpholino dirigé contre les messagers de *coco*?

b) Quels changements pourront être détectés si une RT-PCR est réalisée ? Préciser les contrôles nécessaires à cette expérience.

c) Quels changements pourront être détectés si un western-blot ou une immuno-détection sont réalisés ? Préciser les contrôles nécessaires à réaliser.

Q10 : Méthode de Knock-down via ARN interférence (cf. cours de BM S5)

a) Positionner un ARNi sur le schéma du gène *coco* (cf. Q7).

b) Quel est le génotype des cellules exprimant l'ARNi ?

c) L'analyse phénotypique des embryons injectés avec l'ARNi révèle un défaut de structure oculaire. Quelle conclusion tirer quant à la fonction du gène *coco* ?

c) Comment tester si l'expérience phénocopie (mime) une perte de fonction partielle ou totale du gène *coco* ?

Partie 2 : Exemple d'approche chez les plantes via CRISPR-Cas9

Le système CRISPR-Cas9 permet l'édition de génomes de manière précise. Il est particulièrement utile pour générer des mutants (type knock-out) dans des espèces où on ne

maîtrisait pas jusqu'à présent la position des mutations, par exemple chez les plantes. Pour cela, il suffit d'apporter par transgénèse à l'organisme d'intérêt :

- La séquence d'ADN codant l'enzyme Cas9
- La séquence d'ADN correspondant à l'ARN guide → c'est lui qui va cibler le gène d'intérêt à muter. Il doit être à proximité d'une succession de 3 nucléotides de type NGG (autrement appelée séquence PAM).

L'enzyme Cas9 coupe le gène d'intérêt dans la séquence complémentaire à l'ARN guide et 3 nucléotides en amont de la séquence PAM. La coupure est une cassure double-brin qui va être reconnue par le système de réparation de l'ADN. C'est lors de la réparation que des erreurs peuvent être introduites, conduisant à des mutations.

Des chercheurs ont utilisé ce système pour générer des mutants dans le gène *RIN* chez la Tomate.



Figure 2 : Structure du gène *RIN* de tomate et séquence utilisée pour guider Cas9 sur ce gène (Guide 1). Les exons sont représentés par les rectangles blancs, les introns par les lignes brisées entre les exons. Les rectangles gris correspondent aux régions UTR.

Q11 : D'après vous, pourquoi le guide utilisé pour induire une mutation par CRISPR a-t-il été choisi dans un exon et pas dans un intron ?

Voici les séquences nucléotidiques d'une partie de l'exon 2 (brin sens) dans les plantes sauvages et dans une lignée de plantes mutantes obtenues avec la technique CRISPR (lignée RIN-CRISPR-3) :

Séquence sauvage 5'- TATGTCCAAGACATTGGAGAGATACCACAGATACAATTATG-3'

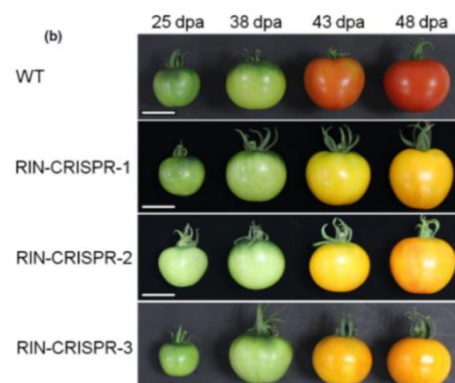
Séquence mutante #3 5'- TATGTCCAAGATCATTGGAGAGATACCACAGATACAATTATG-3'

Q12 : Sur la séquence sauvage, encadrer la portion d'ADN correspondant au guide 1 et localiser la séquence PAM.

Q13 : Localiser et décrire la mutation présente dans les plantes de la lignée mutante RIN-CRISPR-3.

Q14 : Quelles peuvent être les conséquences d'une telle mutation sur la protéine RIN ? Comment le vérifier ?

Figure 3 : Le phénotype des fruits de 3 lignées mutantes *RIN*-CRISPR indépendantes a été comparé à celui de plantes sauvages (WT) à différents stades de maturation (dpa: day post anthesis, anthèse = ouverture de la fleur).



Q15 : Qu'observez-vous pour les trois lignées mutantes *RIN*-CRISPR ? Conclure sur le rôle du gène *RIN*.

TD2 - Bioinformatique

Ce TD a pour objectif une première découverte des différentes bases de données couramment utilisées par les chercheurs, et d'outils bio-informatiques simples pour l'analyse des séquences.

Introduction

La 5- α -réductase (ou 3-oxo-5 α -stéroïde 4-déshydrogénase 1) est une **enzyme clef du métabolisme des stéroïdes** chez l'Homme. Elle réduit la liaison $\Delta_{4,5}$ de la testostérone pour la convertir en dihydrotestostérone (réaction NADPH-dépendante). Cette enzyme est essentielle notamment pour le développement embryonnaire des organes génitaux externes et de la prostate (Wilson *et al.*, 1993 ; Russell and Wilson, 1994).

Chez l'Homme, il existe **3 gènes codant pour 3 isoenzymes** (enzymes qui diffèrent de par leur séquence protéique, mais qui catalysent la même réaction chimique) : **SRD5A1**, **SRD5A2** et **SRD5A3**. L'expression de ces gènes varie au sein des tissus et des organes au cours de l'âge. L'activité de ces enzymes au cours de la puberté amène notamment à une production excessive de sébum, qui confère un aspect luisant à la peau, conduisant à l'acné (!). D'un point de vue subcellulaire, ces enzymes se localisent au niveau du réticulum endoplasmique lisse.

Q1 : A votre avis, cette enzyme, la 5- α -réductase, existe-t-elle chez les Plantes ? Comment identifier les gènes codant pour cette enzyme chez *Arabidopsis thaliana* ?

- Rechercher sur le Web la séquence protéique du gène *SRD5A1* humain. Pour cela, aller sur le site du NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), sélectionner « **Protein** » au lieu de « All data bases » (en haut à gauche de la fenêtre), mettre « **SRD5A1 Homo sapiens** » et lancer la recherche avec « Search ». Copier/coller la séquence protéique de *HsSRD5A1* (= **Isoform1**) dans un fichier Word au format FASTA (c'est-à-dire >SRD5A1 ↵ séquence protéique sans chiffre, ni symbole).

Q2 : Quelle est la taille de la protéine *SRD5A1* humaine (isoform1) ?

I. Identification des gènes codant pour la 5- α -réductase chez *Arabidopsis thaliana*

En utilisant la séquence protéique de *HsSRD5A1*, rechercher les gènes homologues chez *Arabidopsis thaliana* :

- Aller sur le site du NCBI Home (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), choisir l'outil « BLAST » dans la colonne de droite « Popular Resources ». Le programme BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) permet de rechercher, dans une ou plusieurs banques de données, les gènes/protéines présentant le plus de similarité avec une séquence donnée (= Query).
- Choisir d'effectuer la recherche au sein du génome d'*Arabidopsis thaliana*. Pour cela, dans « **BLAST Genomes** », cliquer sur « **Arabidopsis thaliana (taxid :3702)** » dans la liste des organismes proposés, puis valider en cliquant sur « Search ».

- Ensuite, comme la séquence utilisée (HsSRD5A1 = Query) est une séquence protéique, choisir dans les onglets en haut à gauche, l'onglet « **tblastn** » (Interrogation à l'aide d'une séquence protéique de l'ensemble des banques nucléotidiques traduites). Copier la séquence HsSRD5A1 au format FASTA dans le cadre dessous « Enter Query Sequence » et lancer la recherche en cliquant sur « BLAST ».

Q3 : Combien de séquences présentant une homologie avec HsSRD5A1 (correspond aux Blast Hits indiqués sur le Graphic Summary) trouve-t-on dans les banques de données génomiques d'*A. thaliana* ? Identifier sur quel(s) chromosome(s) se trouve(nt) ces séquences ?

Q4 : Basé sur leur description, combien de gènes/locus présentant un alignement significatif ($E\text{-value} < 10^{-5}$) avec HsSRD5A1 trouve-t-on dans les banques de données génomiques d'*A. thaliana* ?

Description/Locus	Query cover	E-value	% Identity

Q5 : Combien finalement de gènes homologues à HsSRD5A1 existent-ils chez *A. thaliana* ? Sur quel(s) chromosome(s) ?

- Cliquer sur le lien « **GenBank** » de la séquence correspondante (et non pas sur « GenBank » à côté de « Download » car séquence complète du chromosome dans ce cas !).

Chaque gène/locus identifié chez une espèce donnée dont le génome est entièrement séquencé, possède un identifiant commençant toujours par le nom de l'espèce (« At » pour *Arabidopsis thaliana* par exemple), suivi du numéro du chromosome sur lequel se situe ce locus (1, 2, 3, 4, ou 5 pour *A. thaliana*), puis de la lettre « g » (pour gène), et enfin de la position du gène/locus sur le chromosome en question.

Q6 : Pour chaque locus, identifier le gène correspondant (nom potentiel et identifiant) et remplir le tableau suivant (à l'aide de chaque fiche GenBank) :

Identifiant	Nom potentiel	Rôle potentiel

Q7 : Quelles remarques pouvez-vous faire ?

Q8 : Pourquoi trouve-t-on plusieurs noms pour un même gène/locus ?

II. Etude du gène *DET2/DWARF6* chez *Arabidopsis thaliana*

Vous allez maintenant concentrer votre étude sur le gène ***DET2***, homologue putatif du gène *HsSRD5A1* chez *Arabidopsis thaliana*, et collecter un certain nombre d'informations le concernant.

1 - Introduction

- Retourner sur le site du NCBI Home (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), sélectionner « Nucleotide » au lieu de « All data bases » (en haut à gauche), mettre « **DET2 Arabidopsis thaliana** » en mots clefs et lancer la recherche en cliquant sur « Search ».

Q9 : Combien obtient-on de liens (=résultats) spécifiques ? A quoi correspondent les autres ?

Q10 : Combien obtient-on de liens pour l'ARNm potentiel du gène *AtDET2* (*At2g38050*) ? A votre avis, pourquoi plusieurs, et non pas un lien unique ?

Rq : Il est aussi possible de faire une recherche similaire en sélectionnant « Gene » au lieu de « Nucleotide », avec les mêmes mots clefs. Mais cette recherche est souvent plus restrictive.

2 – Structure du gène

- A partir des résultats précédemment obtenus, cliquer sur le lien correspondant à l'ARNm le plus long pour *AtDET2*. Vous accédez ainsi à la **fiche NCBI de l'ARNm *AtDET2*** (NCBI Reference Sequence: NM_129361.5 de GenBank).

Q11 : Quelle est la taille de cet ARNm ?

- Sur cette fiche, vous allez trouver un certain nombre d'informations, notamment au niveau des « features » (en bas de la fiche). « **Gene** » correspond à la séquence transcrite du gène (ARNm), donc sans son promoteur (et sans les introns !). « **CDS** » (pour « Coding DNA Sequence ») correspond à la séquence codante du gène, c'est-à-dire à l'ARNm mais sans les régions 5' et 3' non codantes (5'UTR et 3'UTR, pour « Untranslated Region »). Cette séquence commence donc (normalement) toujours par un ATG (codon initiateur) et finit par un codon stop (ex : TGA). Ainsi la comparaison entre ces 2 séquences (« Gene » et « CDS ») permet d'identifier les régions 5' et 3' non codantes du gène. Le lien « **protein_id** » permet d'accéder à la séquence protéique pour laquelle code ce gène. Le lien « **GeneID** » permet d'accéder à la fiche NCBI du gène *AtDET2*. Il est aussi possible d'accéder à cette fiche directement via le NCBI en sélectionnant « Gene » au lieu de « Nucleotide » dans la recherche du gène *AtDET2* (cf. remarque précédente en I.1).

- Pour déterminer la structure du gène *AtDET2*, cliquer sur le lien « GeneID:**818383** » de la fiche NCBI de l'ARNm *AtDET2*. On vous donne une représentation graphique du gène. Une façon de déterminer la taille de(s) intron(s) est de placer la souris sur la représentation graphique du gène *AtDET2*. S'affiche alors la longueur totale de l'ARNm + intron(s) (« Span on NC-003071.7 »), à comparer avec la taille de l'ARNm précédemment trouvé (« Aligned length »).

Q12 : Combien le gène *AtDET2* possède-t-il d'exons, et par conséquent d'introns ? Quelle est la taille de ce(s) intron(s) ?

Le site Web du NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) est donc un site qui permet d'accéder à un certain nombre de bases de données (comme GenBank), et de logiciels (comme BLAST) utiles dans l'analyse des séquences. Dans le cas d'*Arabidopsis thaliana*, il existe un site Web spécifique : le TAIR (The Arabidopsis Information Ressource) (<http://www.arabidopsis.org/>).

- Pour vérifier les informations obtenues sur le site du NCBI et compléter la structure du gène *AtDET2* (notamment obtenir la position exacte de(s) intron(s)), aller sur le site du TAIR. Sur la page d'accueil, tout en haut à droite, mettre « **AtDET2** » et lancer la recherche en cliquant sur « Search ».
 - Cliquer ensuite sur le locus AT2G38050 (numéro AGI/identifiant de *AtDET2*) pour accéder aux informations disponibles pour ce gène. Dans la section « Séquence » (au milieu de la page), vous avez accès cette fois à la séquence génomique (ARNm + intron(s)) du gène (« **Full length genomic** ») (mais toujours sans son promoteur). Copier/coller cette séquence ainsi que la séquence « **Full length CDS** » (séquence codante) dans un fichier Word.
 - Comparer ces deux séquences entre elles. Pour cela, aller sur le site MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>), et copier dans la fenêtre « Sequence data » vos 2 séquences en sautant une ligne entre chaque séquence (>AtDET2_genomic ↵ séquence « Full length genomic », saut de ligne, >AtDET2_CDS ↵ séquence « Full length CDS »). Lancer l'alignement de vos 2 séquences en cliquant sur « Start MultAlin ! ».
- Rq : La présence de chiffres (si la séquence n'est pas en version FASTA) ne gêne pas pour l'alignement avec MultAlin.
- A partir de l'alignement généré pour ces 2 séquences, identifier les régions 5'UTR et 3'UTR du gène *AtDET2*. Vérifier la présence d'un unique intron et sa taille.

Q13 : A l'aide de toutes les informations collectées précédemment, essayer de remplir le tableau récapitulatif suivant :

AtDET2	
Chromosome sur lequel il est situé	
Nom AGI (<i>locus_tag</i>)	
Noms synonymes	
Fonction potentielle	
Mécanismes dans lesquels il serait impliqué	
Taille de l'ARNm	
Taille de la protéine	
Taille de la région 5' non codante	
Taille de la région 3' non codante	
Nombre d'exons	
Nombre d'introns, taille et position	

Q14 : Réaliser un schéma (à l'échelle) de l'unité de transcription du gène AtDET2.

3 – Etude de l'expression du gène AtDET2

Q15 : A votre avis (et sans vous occuper des éléments présents sur la fiche TAIR), où s'attend-t-on à retrouver le produit de ce(s) gène(s) au niveau de la plante (organes, tissus, stades de développement ...) ?

Le site ePlant (<https://bar.utoronto.ca/eplant>) regroupe l'ensemble des données concernant chaque gène d'*Arabidopsis thaliana*.

Q16 : En utilisant ce site, pouvez-vous proposer un (des) organe(s) où l'on retrouve préférentiellement l'expression du gène AtDET2 ?

Q17 : De même, quelle est la localisation subcellulaire prédite pour la protéine AtDET2 ? Comparez avec celle de HsSRD5A1.

TD3 - Réseau génétique et cascade de segmentation moléculaire – Partie I

Mots clefs : plan d'organisation, segmentation moléculaire, relation génotype/phénotype
profil d'expression, enhancer, interactions géniques, réseau génétique

1. Analyse phénotypique d'un embryon mutant perte de fonction *bicoid*.

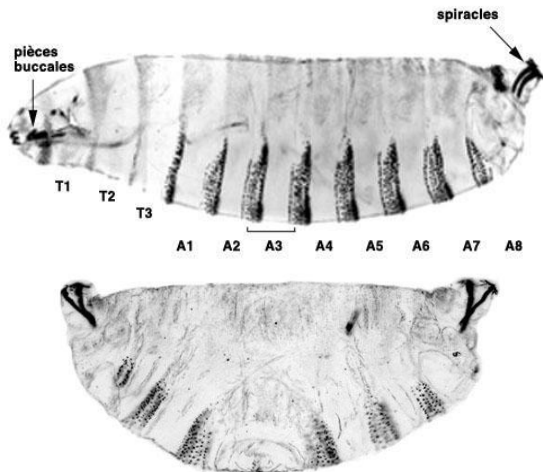


Figure 1 : Préparations cuticulaires d'un embryon sauvage et d'un embryon mutant perte de fonction *bicoid*. Stade 17 (fin d'embryogenèse juste avant le stade larvaire). Embryon sauvage (haut) et mutant (bas). L'allèle mutant est amorphe (= nul). Vues latérales. Antérieur à gauche. T1-T3 : segments thoraciques. A1-A8 : segments abdominaux.

- Décrivez le plan d'organisation de l'embryon de référence en utilisant tous les marqueurs disponibles.
- Décrire les phénotypes de l'embryon mutant mis en évidence par les marqueurs.
- Schématiser les phénotypes sauvages et mutants.
- Conclure sur les rôles du gène *bicoid*.
- Modéliser sous forme d'un schéma très simple le rôle de *bicoid* sur la formation des structures antérieures et postérieures.

2. Profil d'expression des produits du gène *bicoid*.

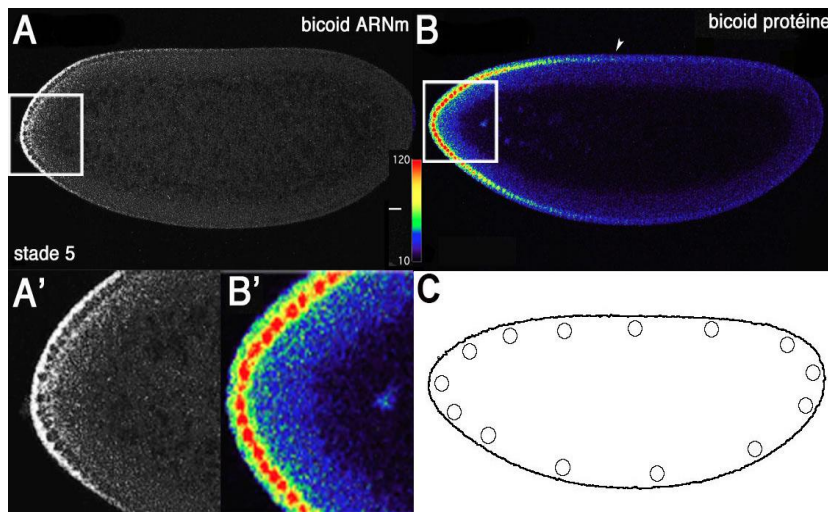


Figure 2 : Comparaison des profils d'expression de l'ARNm et de la protéine Bicoid en fin de segmentation. (A, B) Vues sagittales d'embryons au stade blastoderme syncytial tardif (stade 5). La flèche indique la présence de protéine. (A', B') zoom des encadrés définis en A et B. (B, B') Représentations en mode 16 couleurs. Le code couleur indique l'intensité du signal. (C) Schéma d'un embryon syncytial dans lequel seule une partie des noyaux de la monocouche légèrement grossie

a été représentée. Antérieur à gauche. Dorsal en haut.

- Décrire le profil d'expression spatial des transcrits *bicoid* d'une part et de la protéine Bicoid d'autre part, en précisant également les localisations subcellulaires (A', B').
- Schématiser sur la figure 2C la distribution des transcrits *bicoid* et des protéines Bicoid dans différentes régions de l'embryon syncytial.
- Proposer une expérience permettant de faire un lien entre expression de *bicoid* et structures embryonnaires formées le long de l'axe A/P.

3. Profil d'expression de différents gènes *gap*.

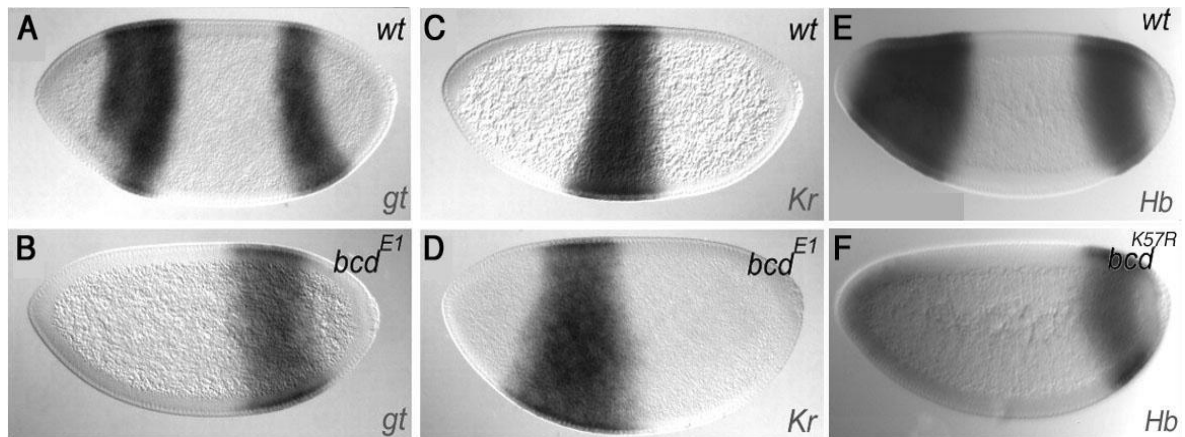


Figure 3 : Profil d'expression des transcrits *giant* (*gt*), *krüppel* (*kr*) et *hunchback* (*Hb*), en présence ou en absence de la fonction *bicoid*. Les embryons sont au stade 5. Antérieur à gauche, dorsal en haut. (A,C,E) Embryons sauvages (wt). (B,D,F) embryons mutants *bicoid*. *bicoid*^{E1} et *bicoid*^{K57R} sont des allèles perte fonction du gène *bicoid*. (A,B) Détection des transcrits *gt*. (C,D) Détection des transcrits *kr*. (E,F) Détection des transcrits *hb*.

- Décrire les profils d'expression des transcrits *gt*, *hb* et *kr* dans les embryons sauvages.
- Schématiser sur un même embryon contrôle, les profils d'expression superposés de *hb*, *kr* et *gt* (A,C,E).
 - Que met en évidence la superposition de l'expression de ces trois gènes *gap* ?
 - Compléter votre schéma en rajoutant un bandeau au-dessus de l'embryon pour modéliser les niveaux de *bicoid* selon l'axe A/P.
- Représenter le statut d'activation transcriptionnelle ON/OFF des 3 gènes à différentes positions, Que mettez-vous en évidence ?
- Décrire le profil d'expression des transcrits *gt*, *hb* et *kr* dans les embryons mutants (B,D,F).
- Conclure succinctement sur le rôle du gène *bicoid* et schématiser la relation génique unissant la fonction Bcd et chacun des trois gènes cibles.
- Sachant que Bcd exerce un contrôle direct sur l'expression des trois gènes cibles (liaison sur des sites de fixation dans les régions régulatrices), mettre en relation l'activité moléculaire de Bcd et les programmes cellulaires mis en route.

TD4 - Réseau génétique et cascade de segmentation moléculaire – Partie II

Mots clefs : plan d'organisation, segmentation moléculaire, profil d'expression, CRE, interactions géniques, réseau génétique

4. Identification de “Cis-regulatory sequences” (CRE) à l'aide de transgènes rapporteurs. Exemple du gène *pair-rule evenskipped*.

Pour étudier la régulation de l'expression du gène *evenskipped* (*eve*), un grand fragment génomique, *eveXL*, situé en amont du promoteur basal du gène *eve*, a été inséré en amont d'un gène rapporteur *lacZ*, et utilisé pour obtenir une lignée transgénique *eveXL-lacZ*.

Le profil d'expression du transgène *eveXL-lacZ* a été comparé à celui du gène *evenskipped* par détection simultanée de la protéine Evenskipped endogène et de l'activité de la β -galactosidase. Les profils d'expression d'*evenskipped* et du transgène sont superposés dans la Figure 4.

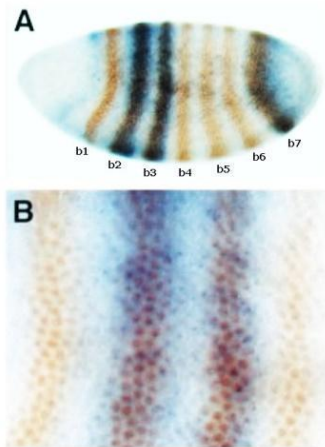


Figure 4 : Localisation de la protéine Eve et profils d'expression du transgène *eveXL-lacZ*. Embryon au stade 5. Antérieur à gauche, dorsal en haut. Détection simultanée de la protéine Evenskipped (ocre) et de l'activité de la β -Galactosidase (bleu foncé). Evenskipped est détectée grâce à un anticorps spécifique. L'expression du transgène est détectée à l'aide d'une coloration X-Gal. (B) Zoom de A. On détecte le signal Ocre dans les 4 bandes de cellules (b1-b4).

- Décrire le profil d'expression de la protéine Eve (ocre).
- Comparer le profil d'expression de la β -galactosidase (bleu) à celui de Eve (ocre).
- Le transgène *eveXL-lacZ* récapitule-t-il l'expression endogène du gène *eve* ? Que peut-on en conclure sur la régulation du gène *eve* ?
- Formuler une hypothèse quant au contrôle de l'expression du gène *evenskipped* dans les bandes 1, 4, 5 et 6 et dans toutes les zones interbandes.
- Présenter sous forme d'un schéma la correspondance entre les régions régulatrices du gène *evenskipped* et les bandes sur l'embryon.
Schématiser le gène sous l'embryon pour faciliter les correspondances et mettre en évidence s'il existe des CRE¹ pour les bandes considérées.
- Quelles sont les applications possibles du transgène *eveXL-lacZ* dans le cadre de l'étude de la cascade de segmentation ?

5. Caractérisation moléculaire des interactions entre gènes *gap* et gènes *pair-rule*. Exemple : *knirps* et *eve*

Dans une seconde expérience, *eveXS*, un sous-fragment de *eveXL*, a été placé en amont du rapporteur *lacZ* (Figure 5A, fragment génomique “wt”). L'expression du transgène *eveXS-lacZ* a été caractérisée par la détection de l'activité β -galactosidase dans les embryons transgéniques au stade 5 (Figure 5B).

- Décrire le profil d'expression observé avec le transgène *eveXS.wt-lacZ* (Fig 5B).
- Que peut-on en déduire sur le fragment *eveXL* ?

¹ CRE = cis-regulatory sequences

- Comparez le profil de *eveXS.wt-lacZ* avec celui du gène *gap knirps* (Fig. 5C, bien lire la légende).
- Quelle expérience permettrait de s'assurer que les flèches mauves et bleues sont correctement positionnées en B ?
- Décrire une expérience permettant de tester une interaction génétique éventuelle entre *eve* et *knirps*.
- Quelle hypothèse de travail le transgène *eveXS.mut-lacZ* permet-il de tester ?
- Interprétez le résultat observé avec *eveXS.mut-lacZ* (Fig. 5D).
- Proposez une approche permettant de conforter ce résultat à l'échelle moléculaire.
- A l'aide d'un schéma, représentez la relation entre *knirps* et *eve* dans l'embryon au stade 5.

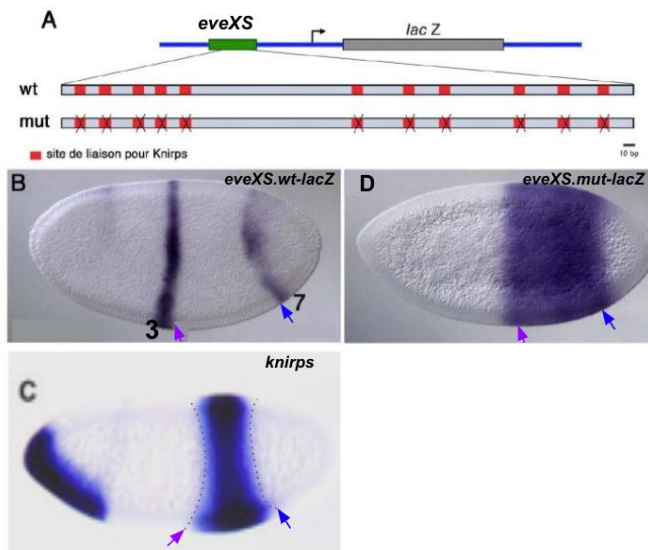


Figure 5 : Caractérisation des séquences *eveXS*. (A) Schéma des transgènes *eveXS.wt-lacZ* et *eveXS.mut-lacZ* utilisés dans l'expérience. Le transgène *mut* diffère du transgène *wt* uniquement par la mutation des 11 sites de fixation putatifs de Knirps. En B et D, détection de l'expression de la β -Galactosidase au stade 5 dans une lignée transgénique portant soit le transgène *eveXS.wt-lacZ* soit *eveXS.mut-lacZ* (D). (C) Profil d'expression du gène *knirps* au stade 5 révélé par hybridation *in situ*. En B, C et D, les flèches mauves marquent la limite postérieure de la bande 3 de *eve*, et les flèches bleues marquent la limite antérieure de la bande 7. Antérieur à gauche, dorsal en haut.

6. Contrôle de l'expression de *eve* dans la bande 2

D'autres expériences ont permis de montrer que :

- La limite antérieure du domaine d'expression de *eve* (bande 2) coïncide avec la limite postérieure du domaine de *giant* (*gt*) dans l'embryon sauvage, et la perte de fonction de *gt* élargit la bande 2 antérieurement.
- La limite postérieure du domaine d'expression de *eve* (bande 2) coïncide avec la limite antérieure du domaine de *krüppel* (*kr*) dans l'embryon sauvage, et la perte de fonction de *kr* élargit la bande 2 postérieurement.
- La bande 2 est absente dans les mutants nuls (perte de fonction) de *bcd* ou de *hb*.

Schématiser les résultats de ces expériences quant à la régulation de la bande 2 de *eve*.

7. Modélisation de l'ensemble des résultats

- Récapitulez sur un schéma général les données de contrôle de l'expression des bandes 2, 3 et 7 de *evenskipped*.

Vous représenterez un embryon sur lequel apparaîtront les domaines d'expression des marqueurs d'intérêt et les relations répression/activation mises en évidence, et vous illustrerez le fonctionnement d'un CRE, ses propriétés (mots clefs : combinatoire, affinité, dose, activateur, inhibiteur).

TD5 - Dissection de séquences régulatrices d'un gène de développement

Mots clefs : enhancer, régulation transcriptionnelle (cis et trans)

Introduction

Chez la drosophile, 5 mutations récessives (*bx*, *cbx*, *ubx*, *bxd* et *pbx*) présentent des phénotypes similaires (transformation partielle du balancier en aile) à l'état homozygote.

Q1.a : Prises deux à deux, les mutations *bx*, *cbx*, *bxd* et *pbx* se complémentent entre elles. Interprétez.

Q1.b : Les mutations *bx*, *cbx*, *bxd* et *pbx* ne complémentent pas la mutation *ubx*. Ce résultat est-il compatible avec votre interprétation de la question Q.1.1? Justifiez.

Un seul transcrit correspondant au locus (*ubx*) a été détecté par Northern Blot quel que soit le stade de développement. Il recouvre les loci *bx*, *cbx* et *ubx*, et il est transcrit de droite à gauche sur le schéma.

Q2 : Positionnez le transcrit *ubx* sur la carte (Figure 1).

Q3 : Quelle hypothèse pouvez-vous proposer quant à la fonction de *Pbx* et *Bxd* ?

Partie 1 : Caractérisation des séquences cis-régulatrices du gène *ubx*.

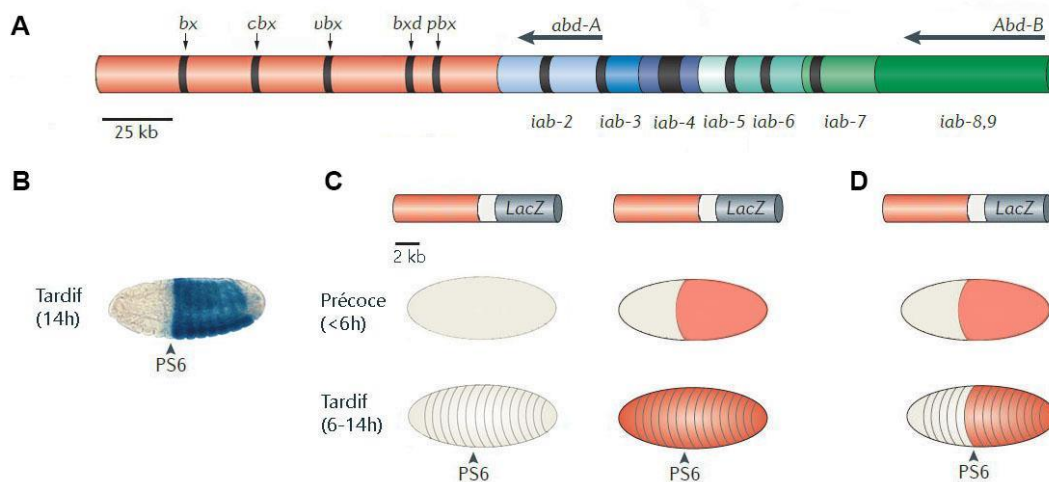


Figure 1 : Carte du complexe Bithorax. (A) Deux des trois gènes du locus sont positionnés (*abd-A* et *Abd-B*) ainsi que les transcrits correspondants. L'échelle en kilobases (kb) est indiquée. (B) Expression tardive de la β-galactosidase détectée dans un embryon porteur d'un transgène *ubx-LacZ* contenant toutes les séquences régulatrices du gène *ubx* placées en amont de *LacZ*. (C,D) Cartes (à compléter) des constructions ayant servi à produire des mouches transgéniques contenant les éléments individuels *pbx* (droite) ou *bxd* (gauche) (C) ou combinés (D) et placés en amont d'un promoteur minimal (gris clair) suivi d'un ADNc contenant la séquence codante *LacZ* (gris foncé). Les schémas en dessous montrent les domaines d'expression de la β-galactosidase (orange) observés à deux stades différents du développement sur des embryons possédant une copie du transgène (embryons hétérozygotes (représentatifs) issus de croisements de parents hétérozygotes). Les para-segments sont indiqués sur les embryons tardifs. PS6 : limite antérieure du para-segment 6. L'échelle en kilobases est indiquée.

Q4 : Compléter la Figure 1C en faisant apparaître les éléments *bxd* et *pbx* dans les constructions et le site d'initiation de la transcription d'*ubx*.

Q5 : Décrire les résultats de la Figure 1C et conclure sur la fonction des deux éléments régulateurs.

Q6 : Les deux éléments *pbx* et *bxd* ont été placés en amont d'un rapporteur *LacZ* (Figure 1C). Compléter la Figure 1D puis décrire les résultats. Quelle nouvelle hypothèse peut-on proposer pour la fonction de *Bxd* ? D'après ces résultats, quels types d'éléments de régulation sont contenus dans les loci *bxd* et *pbx* ?

Partie 2 : Identification de facteurs trans-régulateurs du gène *ubx*.

Deux loci indépendants (*rg1* et *rg2*) régulateurs de *Ubx* ont été identifiés.

Q7 : Décrire une stratégie expérimentale permettant d'identifier des loci trans-régulateurs tels que *rg1* et *rg2*.

Q8 : Chez un mutant perte de fonction de *Rg1*, le gène *ubx* est exprimé antérieurement dans le domaine où il est normalement silencieux au stade précoce du développement (stade 5).

- Quelle est la fonction de *Rg1* vis-à-vis de *Ubx* ?
- Sur quelle séquence *cis*-régulatrice pourrait-il agir ?
- Comment tester cette hypothèse ?
- Prédire le profil d'expression probable d'*ubx* dans un embryon exprimant *rg1* de manière ectopique.
- Proposer une expérience permettant de le tester.

Q9 : *rg1* est un allèle du gène *hunchback* (*hb*) dont l'expression a été documentée en TD4. Sachant que la frontière antérieure de l'expression d'*ubx* correspond à la frontière postérieure du domaine d'expression de *hb* au stade 5, décrire à l'aide d'un schéma les interactions au niveau du locus *ubx* permettant la régionalisation spatiale de son expression au stade 5. Indiquer l'interaction entre la protéine Hb et les séquences *cis*-régulatrices d'*ubx* concernées en faisant apparaître les éléments de régulation.

Q10 : Rédiger une conclusion synthétique reprenant les informations obtenues en Q1-Q9

Q11 : Le gène *hunchback* n'est plus exprimé dans l'épiderme à partir du stade 6, tandis que la transcription du gène *ubx* reste restreinte à la partie postérieure au para-segment 6 tout au long de l'embryogenèse. Proposer une hypothèse expliquant le maintien de la restriction spatiale de l'expression d'*ubx* à partir du stade 6. Quel élément *cis*-régulateur pourrait être impliqué dans la régulation d'*ubx* à ce stade ? Justifier.

Q12 : Chez un mutant perte de fonction *rg2*, l'expression précoce de *ubx* n'est pas altérée. L'expression d'*ubx* a été testée dans des embryons tardifs chez ce mutant *rg2* (mutant null) (Figure 2). Décrire la figure et interpréter le résultat. Comparer le résultat obtenu avec celui des questions Q1 et Q2. Est-ce en accord avec l'hypothèse formulée en Q6

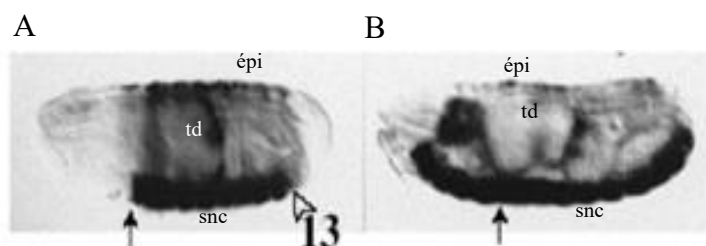


Figure 2 : Expression tardive d'*ubx* révélée par immunodétection. L'expression est détectée dans le système nerveux central (snc), l'épiderme (épi) et le tube digestif (td). (A) Embryon sauvage. (B) Embryon mutant perte de fonction *rg2*^{-/-}. La flèche correspond à la limite para-segmentale antérieure décrite en Figure 1. La tête de flèche montre la limite postérieure d'expression d'*ubx*.

Q13 : L'expression précoce de la bêta-galactosidase est inchangée dans des embryons mutants null pour *rg2* porteurs du transgène (*bxd+pbx*)-*LacZ*. En revanche l'expression tardive est altérée (expression ubiquitaire au stade 14). Que peut-on en déduire ?

Q14 : Rédiger une courte conclusion sur les informations apportées par les questions Q11-Q13.

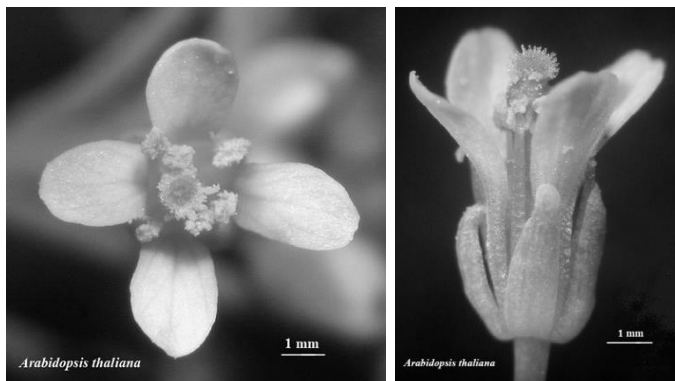
TD6 « EVO-DEVO » – Etude des gènes homéotiques

L'objectif de ce TD est d'étudier le déterminisme génétique de la mise en place des organes au cours du développement animal et végétal, chez différentes espèces présentant des variations. On ne s'intéressera pas au détail de la formation des organes mais aux processus de régulation déterminant la **position** des différents organes les uns par rapport aux autres. Les approches utilisées sont basées sur l'étude de mutants dits **homéotiques**. Il s'agit d'individus possédant une structure (un organe, un segment...) dont l'identité est modifiée par rapport aux organismes normaux (Bateman, 1894). Les mutations impliquées correspondent à des **pertes ou à des gains de fonction de gènes de régulation** (facteurs de transcription essentiellement). Ces gènes agissent comme des **commutateurs**. S'ils sont actifs ("position on"), ils induisent une cascade de régulation aboutissant à une structure X. S'ils sont absents ou inactifs ("position off"), la structure X n'est pas produite et une autre cascade peut aboutir à une structure Y.

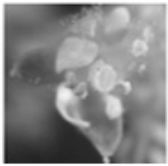
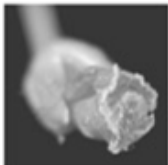
Partie 1 : Variations autour du modèle ABC chez les Angiospermes (d'après Dubois et al. 2010)

Dans la partie 1, on considérera que les allèles mutants sont uniquement récessifs.

Q1 : En vous aidant des deux photos ci-dessous (représentant des vues de dessus et de profil de la fleur), établir le diagramme floral d'une fleur d'*Arabidopsis thaliana*.



Q2 : En vous basant sur le modèle ABC, complétez le tableau ci-dessous en décrivant les mutants de perte de fonction pour chaque classe de gènes.

Catégorie	Phénotype	V1	V2	V3	V4	Nom des gènes pouvant être affectés	Dessin de la jeune fleur juste avant l'anthèse	Profil d'expression des gènes mutés dans la fleur sauvage
		Verticilles						
Fleur sauvage		S	P	E	C			
Mutant gène de la classe A						<i>APETALA1 (AP1)</i> <i>APETALA2 (AP2)</i>		
Mutant gène de la classe B						<i>PISTILLATA (PI)</i>		
Mutant gène de la classe C						<i>AGAMOUS (AG)</i>		

Q3 : D'après ce modèle, quel est le phénotype des mutants suivants ?

- Double mutant *apetala2 pistillata*
- Double mutant *pistillata agamous*
- Triple mutant *apetala2 pistillata agamous*

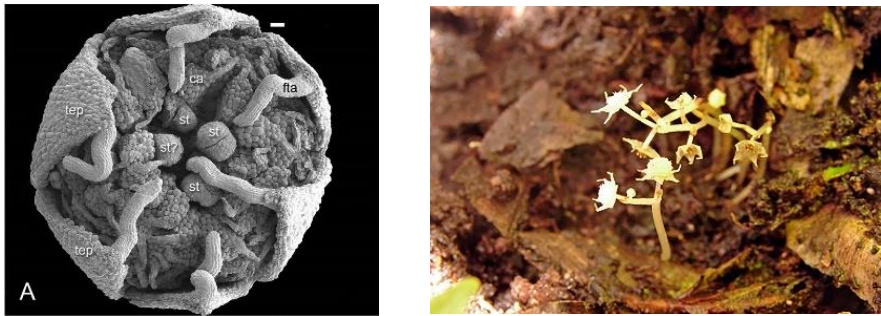
Q4 : Quelles stratégies peut-on envisager pour obtenir des fleurs possédant des étamines à la place des carpelles ?

Q5 : Chez la Tulipe, les sépales et les pétales sont remplacés par des organes identiques (forme, couleur) appelés « tépales » par les botanistes. En réalité, des expériences de transcriptomique indiquent que ces organes ont une identité cellulaire de pétales. Comment expliquer cette évolution à partir du modèle ABC ?



Proposez des expériences qui vous permettant de valider votre hypothèse.

Q6 : *Lacandonia* est la seule espèce d'Angiosperme possédant des étamines internes entourées de carpelles et d'une couronne de tépales. Comme précédemment, imaginez l'évolution du modèle ABC dans ce cas et proposez des expériences de validation.



Fleurs de *Lacandonia brasiliensis*. (A) Fleur en train de s'ouvrir, montrant 3-4 étamines centrales (st) entourées par les carpelles (ca), et les tépales (tep) avec des appendices filamenteux apicaux bien développés (fla), leurs extrémités étant insérées entre les étamines (Rudall *et al.* 2016). A gauche, observation de la fleur de *Lacandonia* en microscopie électronique.

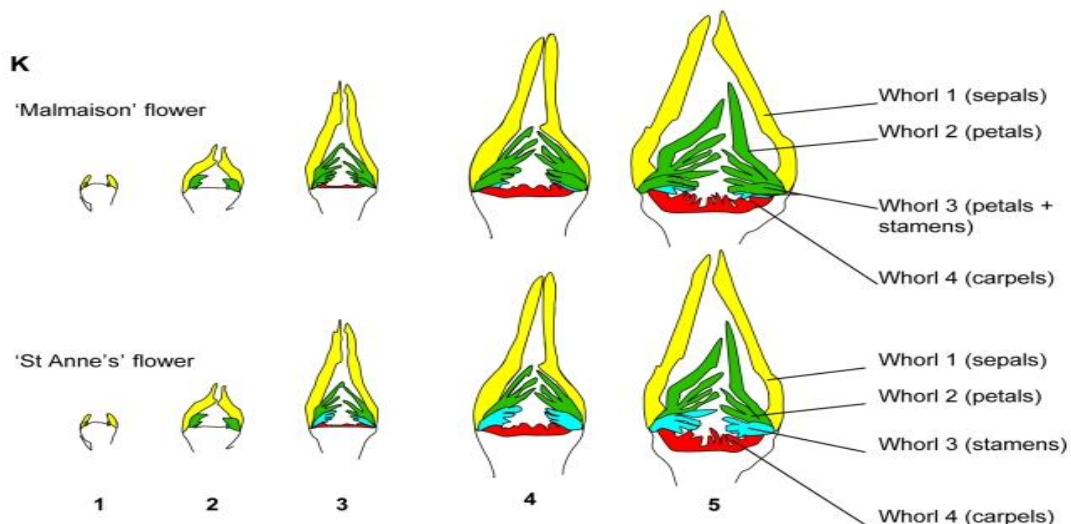
La domestication des Roses s'est faite en parallèle en Europe méditerranéenne et en Chine pour aboutir à l'obtention de Roses doubles possédant plusieurs dizaines de pétales. Un même évènement génétique est à l'origine de ce phénotype et a été sélectionné en parallèle.

L'exemple choisi est de celui de la Rose St Anne (10 pétales) comparée avec la Rose Malmaison (>100 pétales) (d'après Dubois *et al.*, 2010).



Q7 : Une analyse précise de l'évolution de l'anatomie des fleurs des deux variants a été réalisée (figure ci-dessous). Chaque verticille est représenté par un code couleur et 5 stades de développement de la fleur (notés 1 à 5) ont été analysés.

Interprétez ces observations :



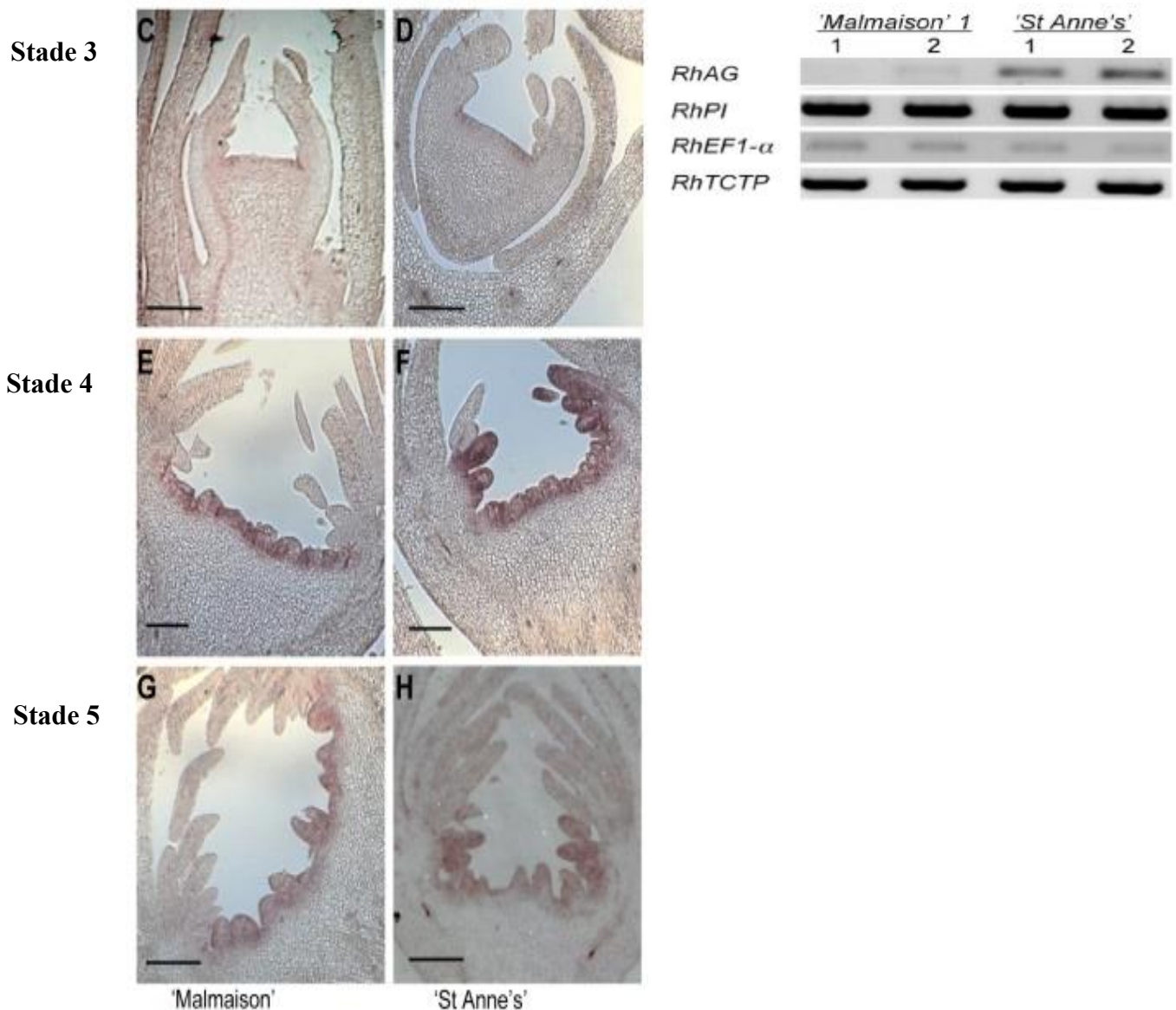
Q8 : L'expression de l'orthologue du gène *AGAMOUS* (*AG*) de la rose (*RhAG*) a été suivie et comparée au cours du développement de la fleur par hybridation *in situ* (Figure ci-dessous à gauche).

Planches C & D : stade 3 du développement de la fleur

Planches E & F : stade 4 du développement de la fleur

Planches G & H : stade 5 du développement de la fleur

La figure de droite représente le résultat d'une expérience de RT-PCR analysant l'expression des gènes *RhAG* et *RhPI* (orthologue du gène *PISTILATA*) sur de jeunes fleurs (stade 1 à 4). Les gènes *EF1-α* et *TCTP* sont considérés comme des gènes de « ménager ».

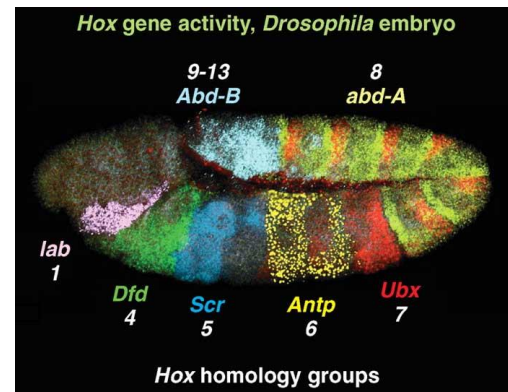


Q9 : Proposez un modèle théorique permettant de rendre compte de ces observations.

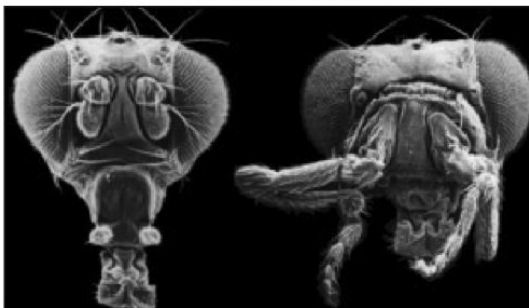
Partie 2 : Variations autour de la fonction d'un gène homéotique chez les Arthropodes (d'après Khadjeh et al. 2012)

Au cours du développement embryonnaire de la drosophile, le gène *Antp* est exprimé dans les 2 derniers segments thoraciques qui forment comme appendice des pattes.

Une mutation aboutit à mettre le gène *Antp* sous le contrôle d'un enhancer qui active son expression dans la tête. On obtient le phénotype suivant chez le mutant hétérozygote :

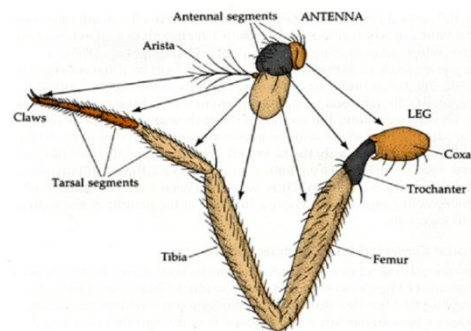


Tête vue de face



Drosophile sauvage

Drosophile mutante
Antennapedia



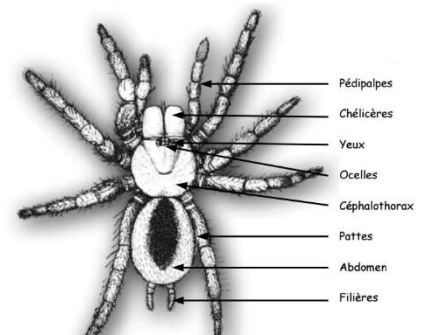
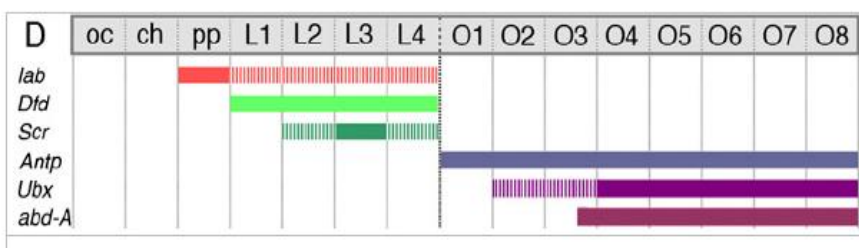
Homologie des structures entre une antenne et une patte d'insecte

Q1 : Interprétez les résultats obtenus.

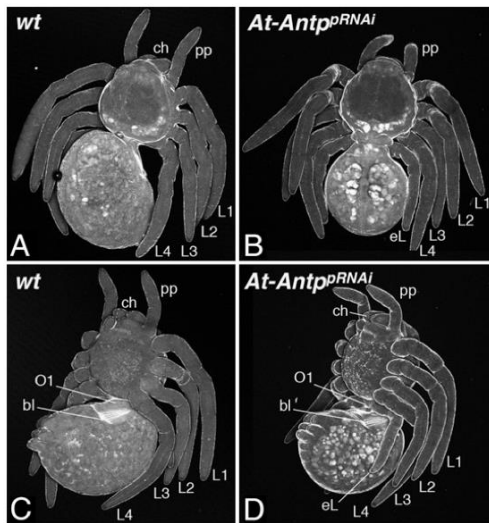
Une mutation perte-de-fonction d'*Antp* à l'état homozygote aboutit à l'absence de pattes sur le deuxième segment thoracique et le développement d'antennes à la place.

Q2 : Quelles informations supplémentaires nous apporte cette expérience ?

Achaearanea tepidariorum est une Arachnide. Le schéma suivant résume le patron d'expression des gènes du complexe homéotique au cours du développement embryonnaire de cette araignée. Les domaines d'expression sont indiqués dans les différents segments par des traits épais (des traits hachés lorsque l'expression est présente mais plus faible). L = segments portant les pattes (céphalothorax) ; oc = segment portant les ocelles ; ch = segment portant les chélicères ; pp = segment portant les pédipalpes ; O = segments de l'opisthosome (abdomen).



Q3 : Comparez le domaine d'expression d'*Antp* chez *A. tepidarorium* avec celui chez la drosophile.

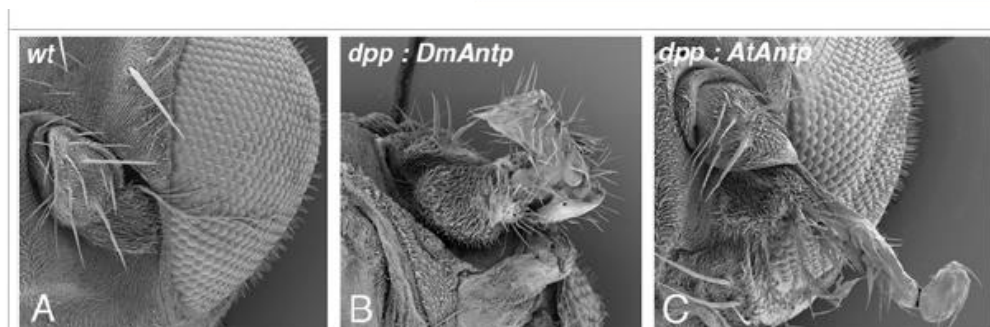
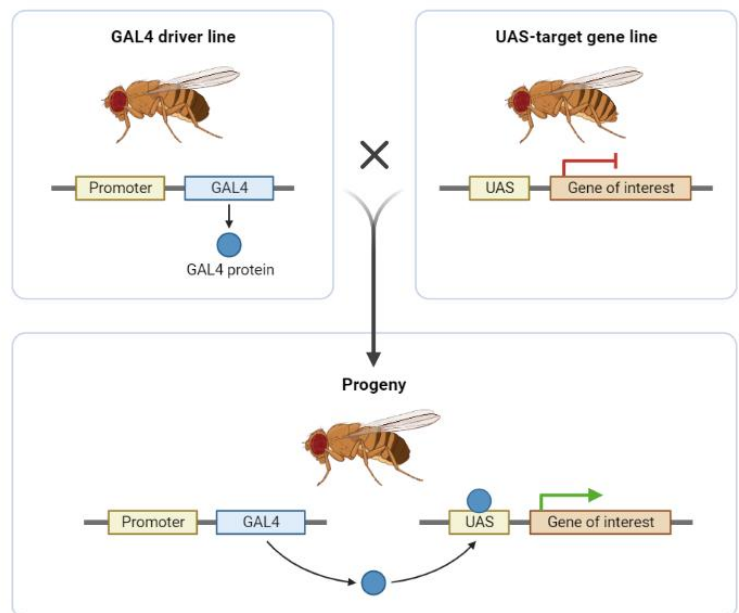


On fait exprimer dans l'embryon d'*A. tepidarorium* un ARN interférent (RNAi) qui inhibe l'expression d'*Antp*. On obtient l'adulte suivant (B, D). A et B sont des vues dorsales ; C et D sont des vues ventrales.

Q4 : Interprétez les résultats et proposez des hypothèses pour expliquer les différences avec la drosophile.

Afin de mieux comprendre le rôle respectif des deux orthologues du gène *Antp*, les chercheurs ont utilisé le système inducible à 2 composants UAS/Gal4 brièvement décrit ci-contre (d'après Southall et al. 2008).

Grâce à cette approche, les chercheurs ont généré des drosophiles transgéniques dans lesquelles soit *Antp* de drosophile (B), soit *Antp* d'*A. tepidarorium* (C) est exprimé dans le disque imaginal de l'antenne. On observe ensuite la région de l'antenne en microscopie électronique à balayage.



Q5 : Imaginez la stratégie de croisement génétique pour obtenir les drosophiles transgéniques ci-dessus sachant que l'on connaît un promoteur permettant de diriger l'expression d'un gène dans le disque imaginal de l'antenne.

Q6 : Que cherche-t-on à tester avec cette expérience ? Quelles conclusions tirez-vous du résultat ? Quelle(s) hypothèse(s) formulez-vous pour expliquer les différences entre le rôle d'*Antp* chez la drosophile et chez *A. tepidarorium* ?

TD7 – Signalisation et développement végétal : exemple de SHR et SCR

(D'après Cruz-Ramirez et al. Cell, 2012)

1. Le méristème apical racinaire (MAR)

Q1 : Légendez la figure ci-dessous représentant un méristème apical racinaire d'*Arabidopsis thaliana*.

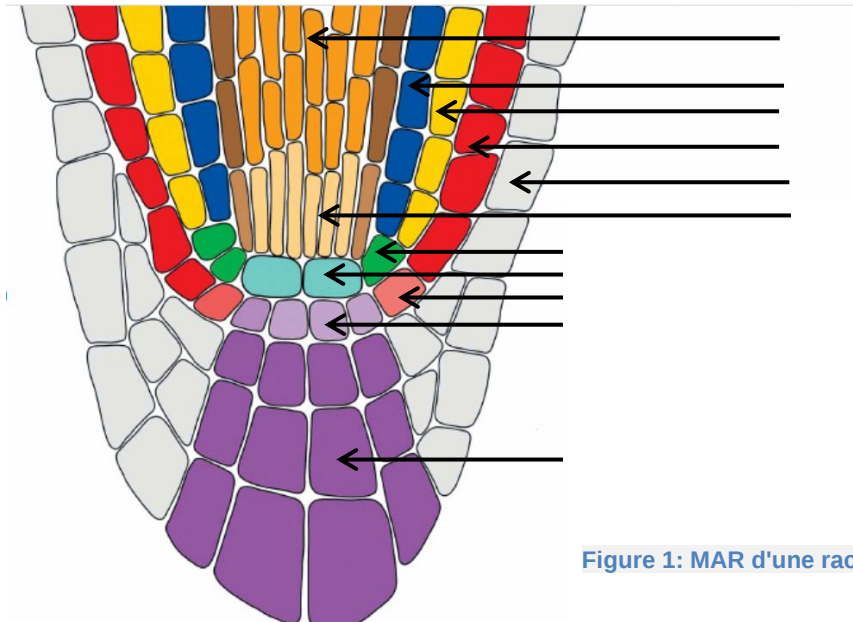


Figure 1: MAR d'une racine d'*A. thaliana*

Q2 : Schématisez la série de divisions conduisant à la formation du cortex et de l'endoderme. Décrire à chaque fois le type de divisions (symétrique, asymétrique, péricle ou anticline).

2. Caractérisation des mutants *short root* (*shr*) et *scarecrow* (*scr*)

Deux catégories de mutants de perte de fonction ont été identifiées chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Ces 2 mutants, *shr* et *scr*, se caractérisent par une racine plus courte et une couche cellulaire en moins comparé au type sauvage (Figure 2).

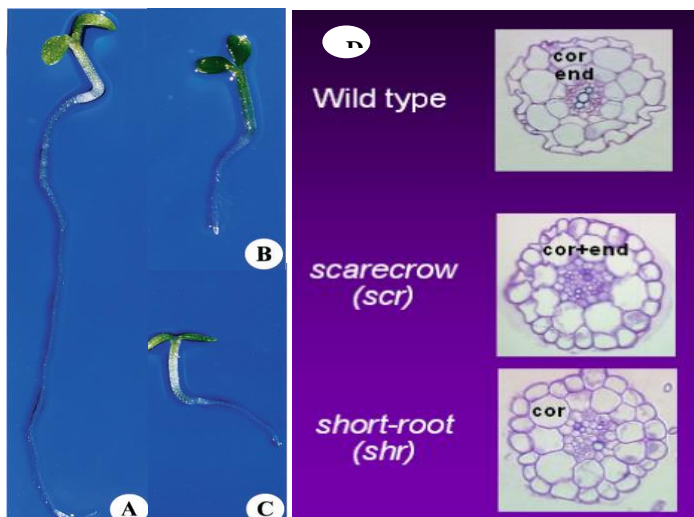


Figure 2: Phénotypes racinaires des mutants *scr* and *shr* comparés au type sauvage (WT). Plantules âgées de 7 jours (A : Type sauvage, B : mutant *shr* ; C : mutant *scr*). D : coupe transversale racinaire correspondante.

Q3 : D'après ces observations, en utilisant la même représentation qu'à la question Q2, schématisez les événements de divisions et/ou de différenciation survenant chez chacun des mutants.

Q4 : En déduire la fonction biologique des peptides SCR et SHR.

Q5 : Quelles informations ces expériences vous apportent-elles sur la fonction biochimique de ces peptides ?

3. Caractérisation de l'expression des gènes *SHR* et *SCR* et de la localisation subcellulaire des peptides.

Q6 : Expliquez la différence entre une fusion transcriptionnelle et une fusion traductionnelle. Quelles informations peuvent vous apporter la comparaison des résultats de ces deux expériences ?

Q7 : La figure 3 représente le résultat d'une fusion transcriptionnelle (Fig. 3A) et traductionnelle (Fig. 3B) du gène *SCR* avec le gène rapporteur *GFP*. Interprétez les résultats observés.

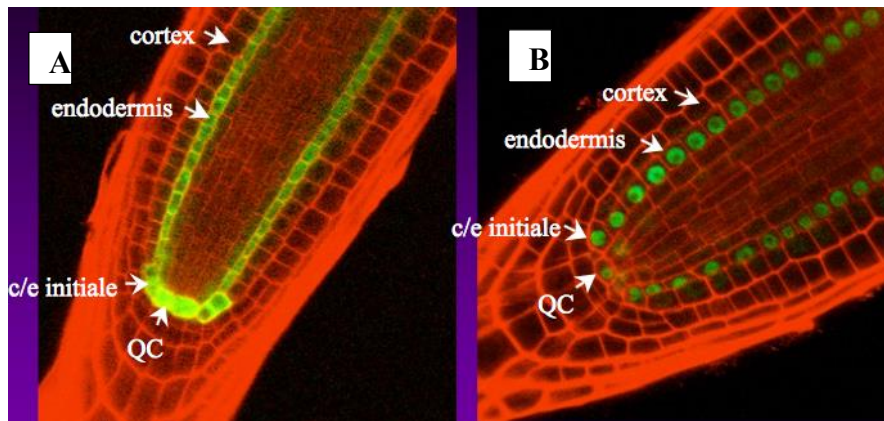


Figure 3 : Observation de racines d'*A. thaliana* transgéniques exprimant une fusion transcriptionnelle (A) ou traductionnelle (B) entre le gène *SCR* et le gène codant pour la GFP. Les parois des cellules sont marquées en rouge par l'iodure de propidium et le signal GFP est représenté en vert.

Q8 : La figure ci-dessous représente le résultat d'une fusion transcriptionnelle (Fig. 4A) et traductionnelle (Fig. 4B) du gène *SHR* avec le gène rapporteur *GFP*. Interprétez les résultats observés.

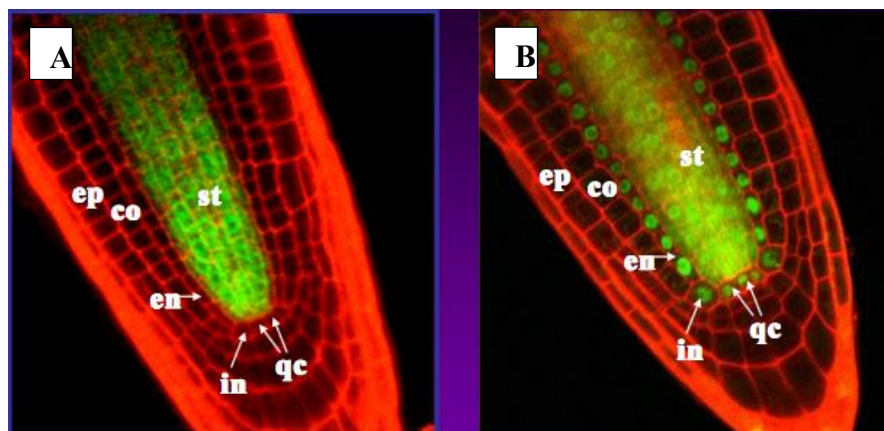


Figure 4 : Observations de racines d'*A. thaliana* transgéniques exprimant une fusion transcriptionnelle (A) ou traductionnelle (B) entre le gène *SHR* et le gène codant pour la GFP.

4. Régulation transcriptionnelle

Des mutant de perte de fonction *shr2* ont été transformés avec une construction *pSHR::SHR-GR*. *GR* correspond à la séquence codante du récepteur au glucocorticoïde (GR).

Q9 : Décrire le système inductible GR/Dexaméthazone (Dex).

L'expression du gène *SCR* a été analysée en RT-PCR quantitative après induction par la dexaméthasone en absence ou présence de cycloheximide (Cyc) (Fig. 5).

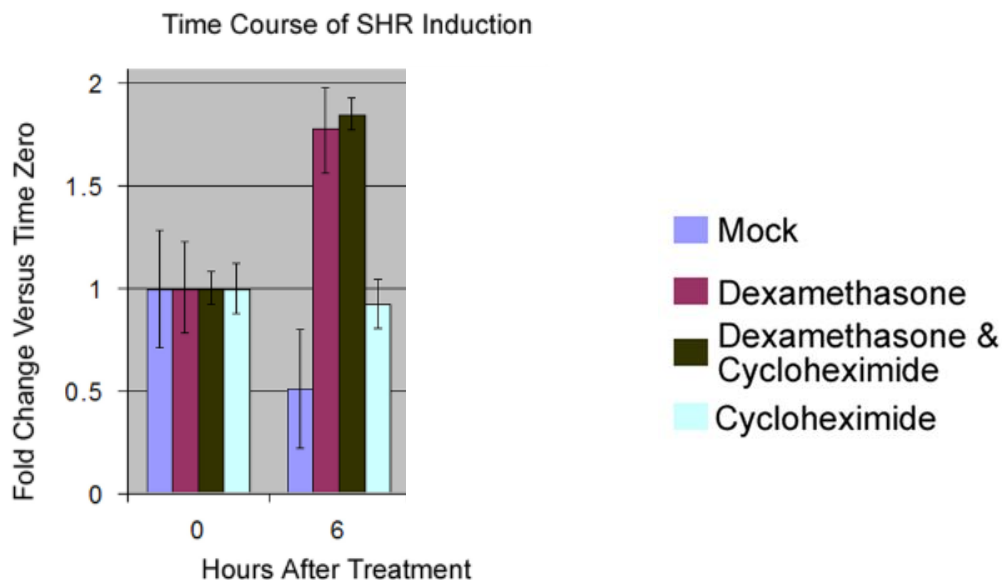


Figure 5 : Niveau d'expression du gène *SCR* mesuré par RT-qPCR, après traitement des plantes *shr-2 pSHR::SHR-GR* soit par une solution neutre (Mock), soit par 10 μ M Dex, soit par 10 μ M Dex plus 10 μ M Cyc, ou par 10 μ M Cyc.

Q10 : Réexpliquer le rôle de la dexaméthasone et de la cycloheximide dans cette expérience.

Q11 : Interprétez les résultats obtenus.

Q12 : Quelle(s) expérience(s) complémentaire(s) pourriez-vous envisager pour valider vos résultats ?

5. Interactions protéiques

Afin de mieux comprendre les interactions réciproques entre *SHR* et *SCR*, des expériences d'immunoprécipitations de protéines ont été réalisées.

Q13 : Rappeler le principe de la co-immunoprécipitation. Quels en sont les avantages et inconvénients ?

La figure ci-dessous représente le résultat d'une expérience de co-immunoprécipitation en utilisant un anticorps anti-GFP et des extraits protéiques totaux de plantes de type sauvage (WT) ou de plantes transgéniques exprimant les constructions *pSCR::SHR-GFP* ou *pSCR::GFP*.

Après incubation avec l'anticorps anti-GFP, les protéines ont été co-immunoprécipitées, séparées en électrophorèse dénaturante, et révélées grâce à un anticorps secondaire.

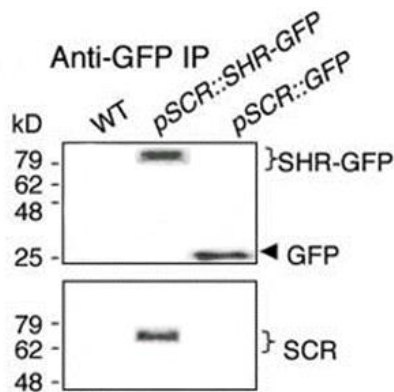


Figure 6: Expérience de co-immunoprécipitation avec un anticorps anti-GFP chez une plante de type sauvage (WT), des plantes exprimant la construction pSCR::SHR-GFP ou pSCR::GFP.

Q14 : Quel est l'intérêt d'utiliser un anticorps anti-GFP et pas anti-SHR ?

Q15 : Quels sont les témoins de cette expérience ?

Q16 : Interprétez le résultat obtenu.

6. Mouvement protéique

Pour mieux comprendre le rôle fonctionnel de l'interaction entre SHR et SCR, la localisation subcellulaire de SHR a été étudiée dans le contexte du mutant *scr* (Fig. 7).

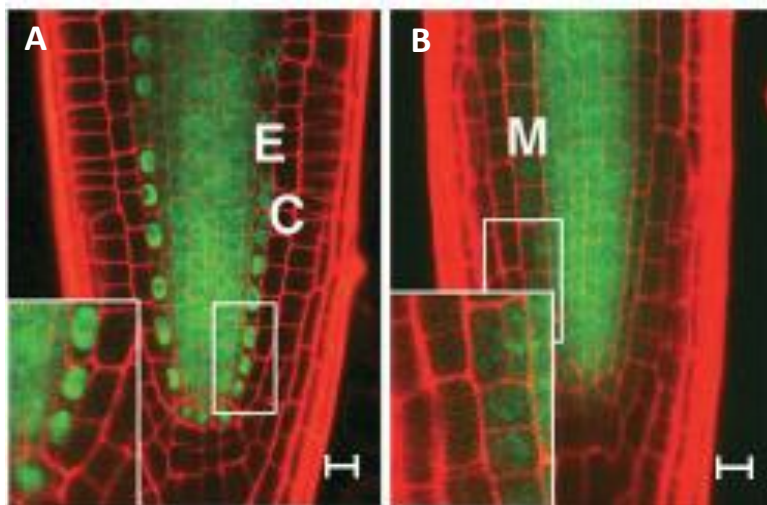


Figure 7 : Pointe racinaire d'une plante sauvage (A) ou (B) d'un mutant *scr* exprimant la construction pSHR::SHR-GFP. Les parois des cellules sont marquées en rouge par l'iodure de propidium et le signal GFP est représenté en vert. E = Endoderme ; C = Cortex ; M = tissu mixte endoderme/cortex.

Q17 : Interprétez les résultats observés ci-dessus.

7. Modèle d'action des facteurs SHR et SCR

Q18 : En synthétisant l'ensemble de ces résultats, proposez un modèle d'action des facteurs SHR et SCR lors de la différenciation de l'endoderme et du cortex racinaire.

Q19 : D'après ce modèle, quel serait l'effet d'une surexpression ectopique du gène *SHR* sous le contrôle d'un promoteur 35S ?

TD8 - Photomorphogénèse

(D'après Liu et al. *Molecular Plant*, 2021)

Ces travaux portent sur l'étude de la réponse d'évitement de l'ombre chez le Soja (*Glycine max*, famille des Fabacées).

Q1 : Pourquoi le Soja est une espèce d'importance agronomique majeure ?

Afin de comprendre le développement du Soja dans différentes conditions environnementales, des plantes de type sauvage ont été cultivées dans 4 conditions lumineuses (Figure 1).

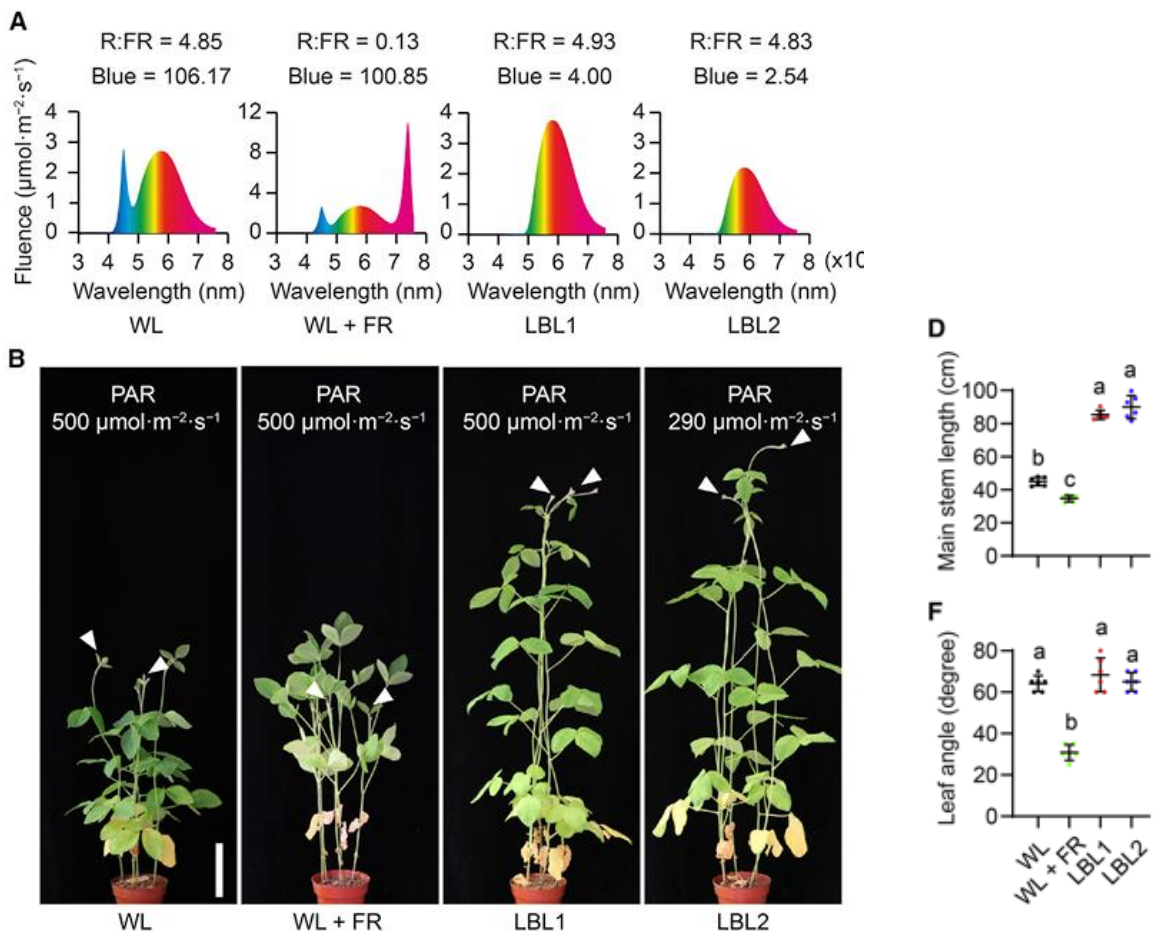


Figure 1 : (A) Compositions spectrales de la lumière blanche (WL), WL avec Rouge lointain (WL + FR), et faible lumière bleue 1 (LBL1) et LBL2. Le rapport R:FR et l'intensité de la lumière bleue sont indiqués au-dessus de chaque spectre lumineux. (B) Images représentatives des plantes de soja soumises aux différents régimes lumineux décrits en (A). Les plantes ont été cultivées 13 jours sous lumière blanche (WL) en jours longs (16 h de lumière/8 h d'obscurité), puis transférées sous le régime lumineux indiqué en dessous de la photo, toujours en jours longs pendant 18 jours additionnels. L'intensité du **rayonnement photosynthétiquement actif (PAR)** (400-700 nm) est indiquée pour chaque régime lumineux. Le triangle blanc représente l'apex de la tige. La barre d'échelle correspond à 10 cm. (D, F) Longueur de la tige principale (D) et angle des feuilles (F) des plantes en fonction du régime lumineux. Les données représentent les moyennes ± SD. Les lettres minuscules indiquent des différences significatives (p < 0,01, test ANOVA).

Q2 : Comparez les différentes conditions lumineuses utilisées (différentes longueurs d'onde et intensités lumineuses) et justifiez le choix de ces conditions dans le contexte de cette étude.

Q3 : Interprétez les résultats obtenus.

La Figure 2 représente une analyse phylogénétique des protéines cryptochromes (CRY) chez deux espèces différentes, *Arabidopsis thaliana* (At) et le Soja (Gm).

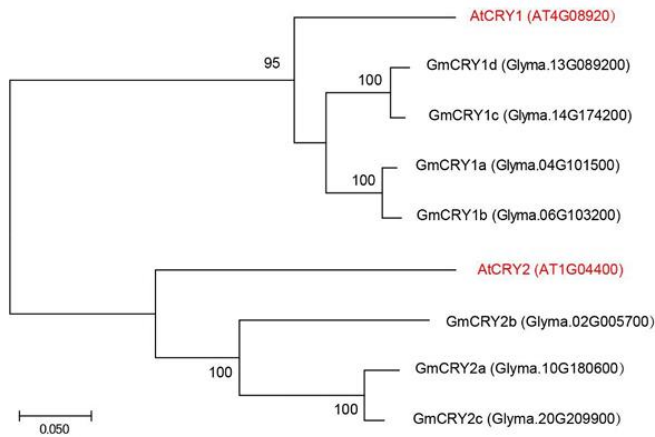


Figure 2 : Arbre phylogénétique des protéines cryptochromes d'Arabidopsis (At, en rouge) et de Soja (Gm, en noir).

Q4 : Rappelez le rôle biologique des cryptochromes.

Q5 : Quelles sont les informations apportées par cet arbre phylogénétique (Figure 2) ?

Afin d'identifier le rôle biologique des cryptochromes dans la réponse physiologique à la lumière bleue, les chercheurs ont créé des mutants dans chacun des 7 gènes codant pour des cryptochromes en utilisant la stratégie CRISPR/CAS9 (Figure 3).

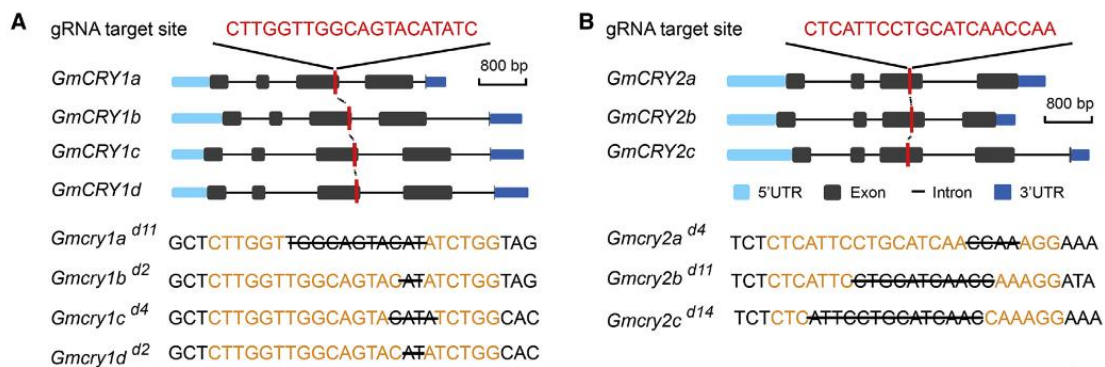


Figure 3 : Structure génomique des gènes *GmCRY1* (A) et *GmCRY2* (B). Les lettres rouges et les barres verticales indiquent les sites cibles conservés des ARNg conçus pour cibler simultanément les 4 gènes *GmCRY1* (A) ou les 3 gènes *GmCRY2* (B). Les boîtes bleu clair représentent les régions 5' non traduites (UTR) ; les boîtes noires indiquent les exons ; les lignes noires, les introns ; les boîtes bleu foncé indiquent les régions 3' UTR. Les séquences rayées (en dessous) indiquent les délétions de nucléotides au niveau des gènes *GmCRY1* dans le quadruple mutant *Gmcry1abcd* (*Gmcry1s-qm*) (A), ou au niveau des gènes *GmCRY2* le triple mutant *Gmcry2abc* (*Gmcry2s-tm*) (B).

Q6 : Rappelez le principe de l'édition des génomes via CRISPR/CAS9.

Q7 : A quoi correspond le « gRNA target site » (en rouge au-dessus des loci *GmCRY*) ?

Q8 : Pourquoi avoir choisi ces régions comme cible ?

La Figure 4 représente le phénotype du triple mutant *cry2* (*Gmcry2s-tm*) et du quadruple mutant *cry1* (*Gmcry1s-qm*).

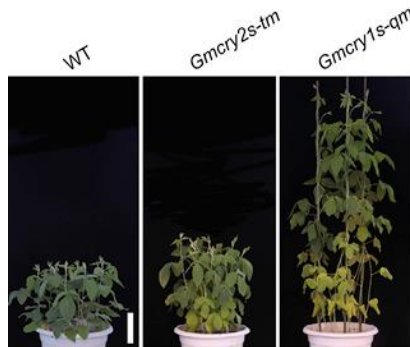


Figure 4 : Phénotype du triple mutant *cry2* (*Gmcry2s-tm*) et du quadruple mutant *cry1* (*Gmcry1s-qm*) comparé au type sauvage (WT) après 56 jours de croissance sous lumière blanche en conditions jours longs. Barre = 10 cm.

Q9 : Interprétez les phénotypes présentés sur la Figure 4.

En parallèle, les chercheurs ont généré des plantes surexprimant le gène *CRY1b* fusionné en amont (*CRY1b-YFP*) ou en aval (*YFP-CRY1b*) de la séquence codante pour la protéine de fluorescence jaune (YFP) (Figure 5).

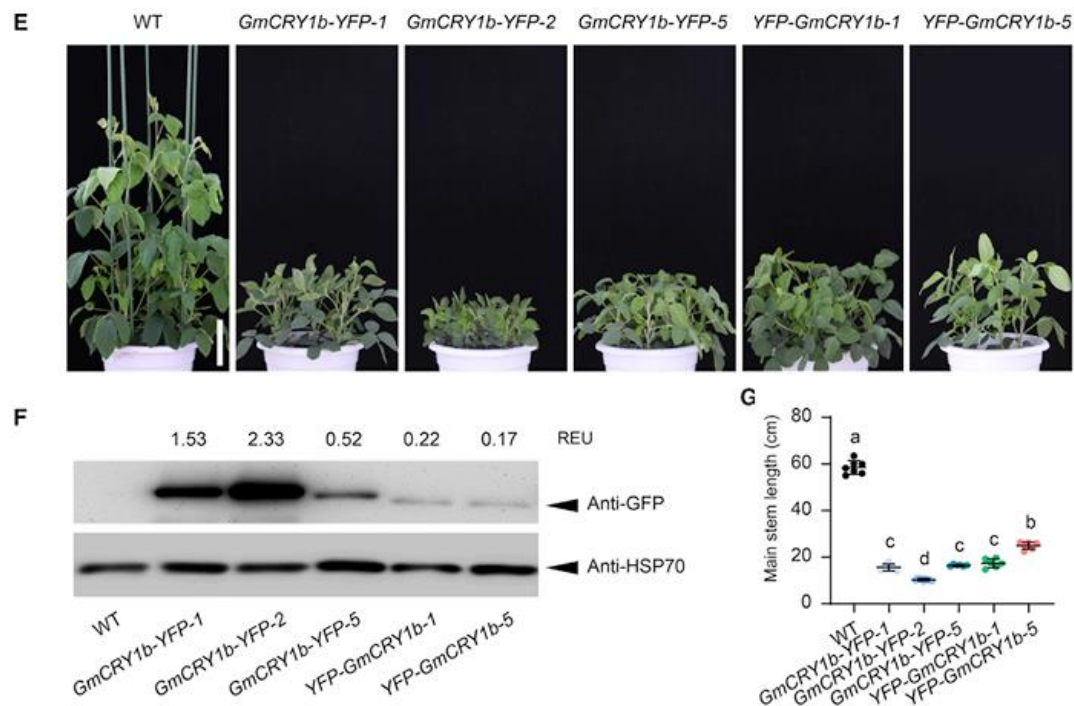


Figure 5 : (E) Phénotype des plantes transgéniques surexprimant le gène *CRY1b* comparées aux plantes sauvages (WT) après 56 jours de culture en conditions jours longs. Barre = 10 cm. (F) Quantification des protéines de fusion GmCRY1b-YFP et YFP-GmCRY1b au sein des plantes transgéniques par Western blot à l'aide d'un anticorps anti-GFP (les séquences de la protéine GFP et de la YFP ne variant que d'un unique acide aminé, l'anticorps anti-GFP est capable de reconnaître les protéines YFP). Les protéines reconnues par un anticorps anti-HSP70 ont été utilisées comme témoin de normalisation. La quantification a été normalisée et est indiquée en unité d'expression relative (REU). (G) Longueur de la tige principale des plantes des différents génotypes. Les lettres indiquent les différences significatives ($p < 0.01$, ANOVA test).

Q10 : Pourquoi plusieurs lignées ont-elles été analysées, et non pas une seule, pour chaque construction (*GmCRY1b-YFP* et *YFP-GmCRY1b*) ?

Q11 : Pourquoi avoir testé ces 2 constructions (YFP en amont ou en aval de CRY1b) ?

Q12 : Quel phénotype observe-t-on pour les plantes surexprimant CRY1b (Figure 5E et 5G) ?

Q13 : Après avoir rappelé le principe d'un western blot, interprétez les résultats de la Figure 5F. Que peut-on en conclure sur la fonction de CRY1b ?

La Figure 6 représente une analyse phénotypique des lignées mutantes (*Gmcry1s-qm*) ou surexprimant *CRY1b* dans différentes conditions lumineuses.

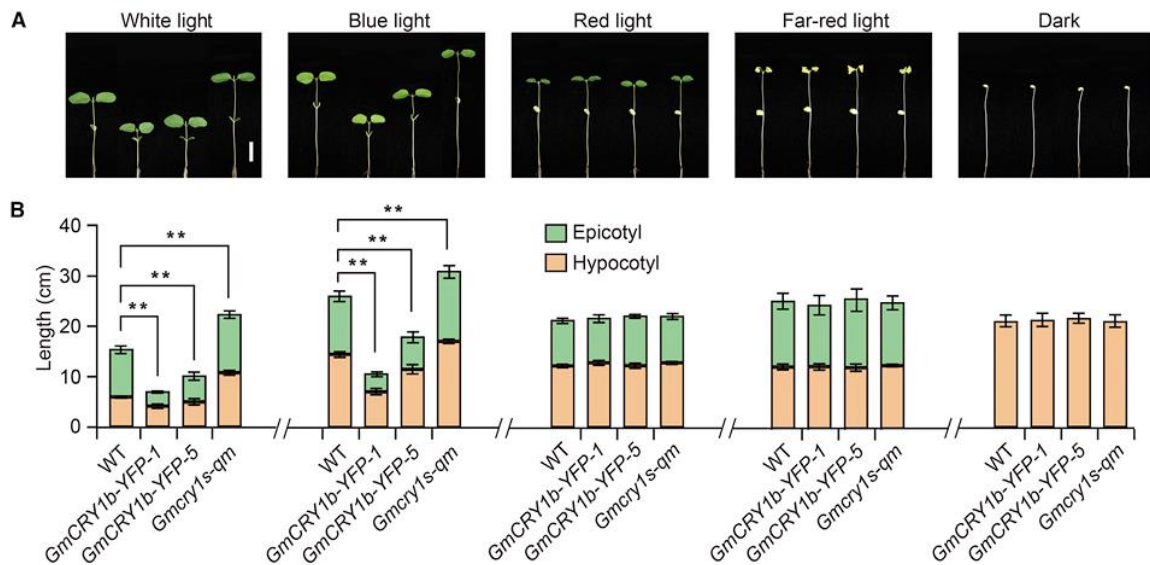


Figure 6 : (A) Plantes âgées de 11 jours cultivées sous différentes conditions lumineuses. Barre = 5 cm. (B) Longueurs des hypocotyles et des épicotyles des lignées illustrées en (A). Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ SD ($n > 5$ plantes). Les différences significatives ont été déterminées par un test t de Student bilatéral (** $p < 0,01$).

Q14 : Interprétez les phénotypes présentés sur la Figure 6.

Les gibbérellines (GA) correspondent à une classe de phytohormones comprenant plus d'une centaine de molécules selon leur structure (ex : GA_1 , GA_3 , etc...), et qui sont connues pour avoir un effet important sur l'élongation des tiges (Figure 7).

Figure 7 : Traitement de plantes de Colza par des GA (à droite) par rapport à des plantes témoins non traitées (à gauche).



Q15 : Quel est l'effet d'un traitement par des GA sur la croissance des plantes de Colza ?

Afin de vérifier si les GA pourraient avoir un rôle sur le phénotype des plantes médié par la réponse à la lumière bleue, les chercheurs ont quantifié la teneur en GA_1 au sein d'apex de plantes de différents génotypes (Figure 8).

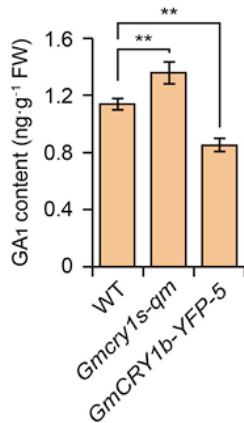


Figure 8 : Niveaux de GA₁ endogène dans les apex des lignées indiquées. Les niveaux de GA₁ ont été mesurés sur des plantules de 9 jours cultivées dans des conditions de lumière blanche continue. Les données sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ SD de trois répétitions biologiques. Les différences significatives ont été déterminées par un test t de Student bilatéral (**p < 0,01).

Q16 : Interprétez le résultat de la Figure 8. Quel lien pouvez-vous faire avec le phénotype des plantes présenté dans les figures 4 et 5 ? Quelle stratégie pourriez-vous utiliser pour valider votre ou vos hypothèse(s) ?

Sachant qu'aucun lien moléculaire direct entre les récepteurs CRY1 et les enzymes du catabolisme des GA n'était connu, les chercheurs ont analysé le transcriptome de plantes mutantes ou surexprimant CRY1 afin d'identifier des facteurs de transcriptions potentiellement impliqués dans cette voie de signalisation. Ils ont ainsi identifié 2 gènes codant pour des facteurs de transcription de type bZIP (STF1 et STF2), et présentant des variations d'expression (Figure 9).

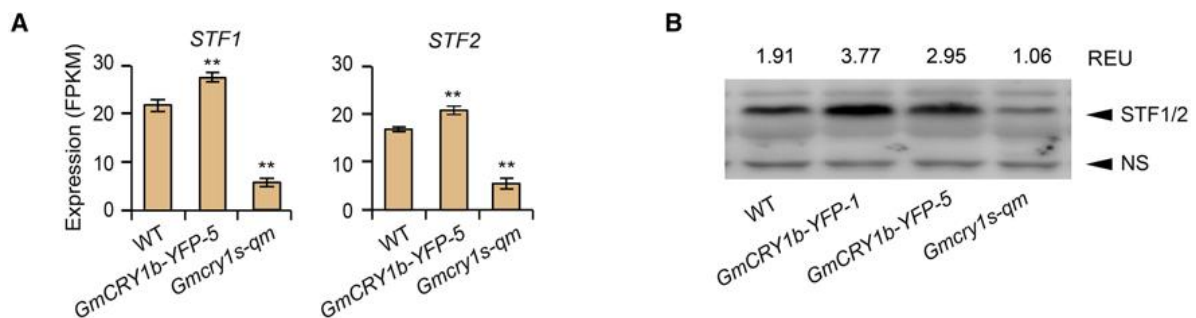


Figure 9 : (A) Niveaux d'expression de STF1 et STF2 dans les lignées indiquées. FPKM, fragments par kilobase par million de lectures cartographiées. **(B)** Comparaison par Western blot de l'abondance de STF1/2 dans chaque génotype indiqué. Les premières feuilles trifoliolées entièrement développées des plantes cultivées ont été récoltées pour l'extraction des protéines. Les extraits de protéines totales ont été fractionnés par SDS-PAGE, déposés sur membrane et analysés avec l'anticorps anti-STF1/2. Une bande non spécifique (NS) a été utilisée comme témoin de charge. Les niveaux de protéines STF sont présentés sous forme de REU calculée à l'aide de la formule : intensité du signal de STF/intensité du signal de HSP70 utilisé comme contrôle.

Q17 : Interprétez les résultats de la Figure 9.

Q18 : Les chercheurs ont ensuite généré des plantes surexprimant les facteurs STF. Quel est le phénotype attendu ?

Une des hypothèses proposées serait que les facteurs de transcription STF, lors de la photo-activation des photorécepteurs CRY1, se fixent directement sur les promoteurs des gènes GA2ox afin de provoquer le catabolisme des GA.

Q19 : Quelle approche expérimentale pourriez-vous envisager pour tester cette hypothèse ?

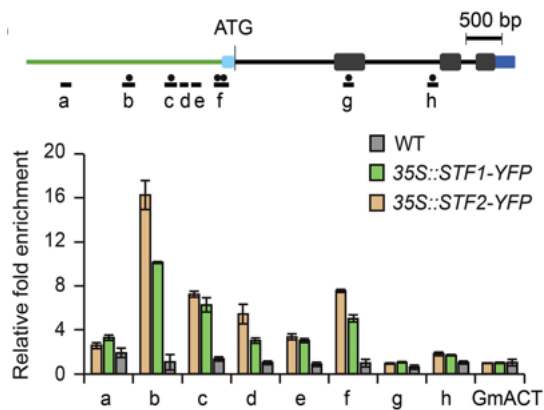


Figure 10 : Analyse de l'interaction entre les protéines STF1/2 et les régions chromatinienne de *GmGA2ox-7a* par immunoprécipitation de la chromatine et qPCR. Des fragments de chromatine (~500 bp) ont été immuno-précipités à l'aide de GFP-Trap et analysés par qPCR. Les barres noires sous le locus du gène *GmGA2ox-7a* représentent les amplicons d'immunoprécipitation de la chromatine, et les cercles noirs représentent les sites de liaison potentiels de STF1/2. La liaison au gène *GmACT* a été utilisée comme contrôle négatif.

Q20 : Interprétez les résultats de la Figure 10. Quelle stratégie expérimentale pourrait vous permettre de valider vos hypothèses ?

Q21 : Grâce à l'ensemble de ces données, proposez un schéma de synthèse résumant le rôle des facteurs CRY1, STF et GA2ox sur le phénotype de plantes de soja cultivées en lumière blanche ou à l'ombre.

TD9 - La régionalisation du système nerveux embryonnaire

Chez les vertébrés, l'induction du tissu neural primitif - induction neurale- donne naissance à des cellules de type neural antérieur (cerveau). Dès la gastrulation, les cellules du neur ectoderme postérieur (futurs niveaux moelle épinière et cerveau postérieur) sont soumises à des signaux qui leur confèrent une identité postérieure, marquée par l'expression régionalisée des gènes *Hox* (Figure 1A).

Ce TD explore les grands mécanismes de cette postériorisation neurale, principalement à travers l'étude de la voie de signalisation FGF et de ses cibles, mais également abordera brièvement le rôle d'une autre voie de signalisation majeure, la voie Wnt. Les expériences sont tirées des travaux de recherche suivants :

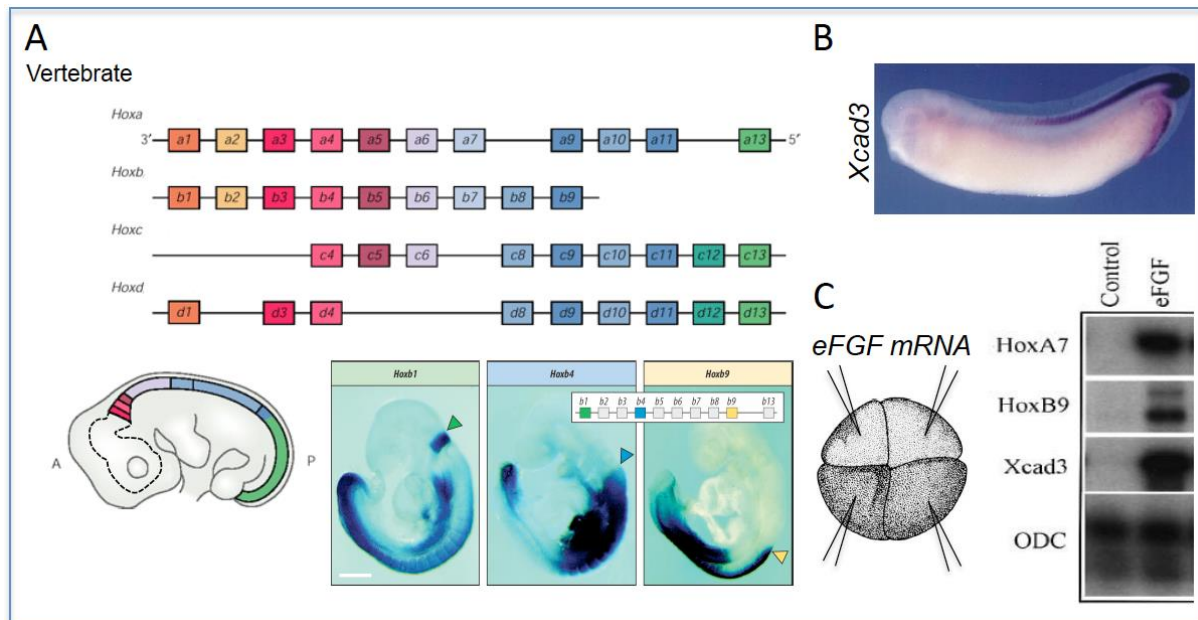
1- H. Isaacs, M. Elizabeth Pownall and J. M.W. Slack Regulation of *Hox* gene expression and posterior development by the *Xenopus* caudal homologue *Xcad3*. *EMBO Journal* Vol.17 No.12 pp.3413–3427, 1998

2- S. Bel-Vialar, N. Itasaki and R. Krumlauf, Initiating *Hox* gene expression: in the early chick neural tube differential sensitivity to FGF and RA signaling subdivides the *HoxB* genes in two distinct groups *Development* 129, 5103-5115 (2002)

3- Iain D. Keenan, R. Michael Sharrard, Harry V. Isaacs, FGF signal transduction and the regulation of *Cdx* gene expression, *Developmental Biology*, 2006, 478-488.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.040>

Partie I- Identification de gènes cibles de la voie de signalisation FGF, impliquées lors de la mise en place des structures postérieures de l'embryon.

Figure 1 :



Chaque niveau de l'axe antéro-postérieur du tube neural est caractérisé par l'expression de gènes *hox* spécifiques. Les limites antérieures des patrons d'expression de ces gènes sont répertoriées dans le schéma (**A**).

Q1 : En analysant les hybridations in situ de *Hoxb1*, *Hoxb4* et *Hoxb9* et les schémas ci-dessus, pouvez-vous établir un lien entre la position des gènes sur leur cluster et leur frontière antérieure d'expression dans le tube neural ?

Xcad3 est un membre de la famille des gènes *caudal*, gènes impliqués dans le développement des structures postérieures de nombreuses espèces, orthologue du gène *caudal* de *Drosophile*.

Q2 : D'après l'hybridation in situ de *Xcad3* chez *Xenopus*, décrivez son patron d'expression. (B).

En C, la voie de signalisation FGF est activée par injection de l'ARNm codant pour la protéine eFGF (= FGF4) dans les 4 blastomères d'embryons de *Xenopus* au stade 4 cellules. L'impact sur l'expression des gènes *HoxA7*, *HoxB9* et *Xcad3* est analysé par Northern Blot.

Q3 : Que détecte-t-on grâce à un Northern blot ?

Q4 : A quoi sert l'analyse de l'expression du gène ODC (ornithine décarboxylase) ?

Q5 : Décrivez puis interprétez le résultat de cette expérience.

Partie II- Le gène *Xcad3* régule la régionalisation embryonnaire et l'expression des gènes Hox.

Figure 2 :

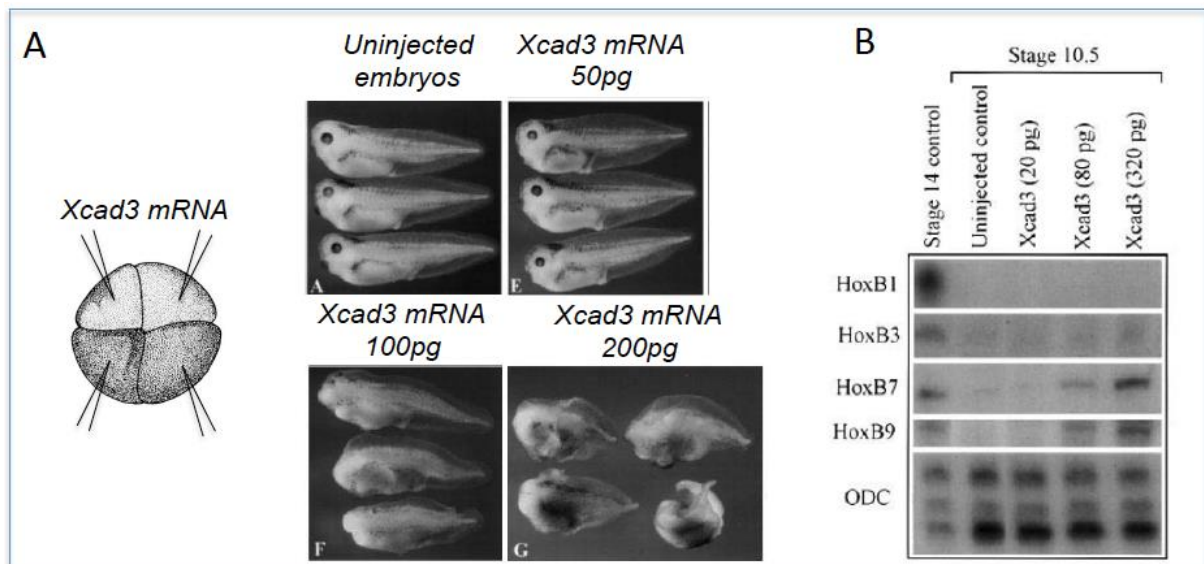


Figure 2A. L'ARNm de *Xcad3* est injecté à différentes doses dans les 4 blastomères d'embryons de *Xenopus* au stade 4 cellules.

Q1 : Pourquoi plusieurs embryons sont présentés sur chaque photo ?

Q2 : Décrivez la morphologie des embryons suite à l'injection des différentes doses de *Xcad3*. Que suggèrent vos observations quant au rôle de *Xcad3* dans le développement embryonnaire ?

Figure 2B. Selon la dose d'ARNm injectée, l'expression précoce des gènes *HoxB1*, *HoxB3*, *HoxB7* et *HoxB9* est analysée par Northern Blot.

Q3 : A quoi sert l'analyse d'embryons contrôles au stade 14 ?

Q4 : Décrivez puis interprétez les résultats de l'expérience.

Figure 3 :

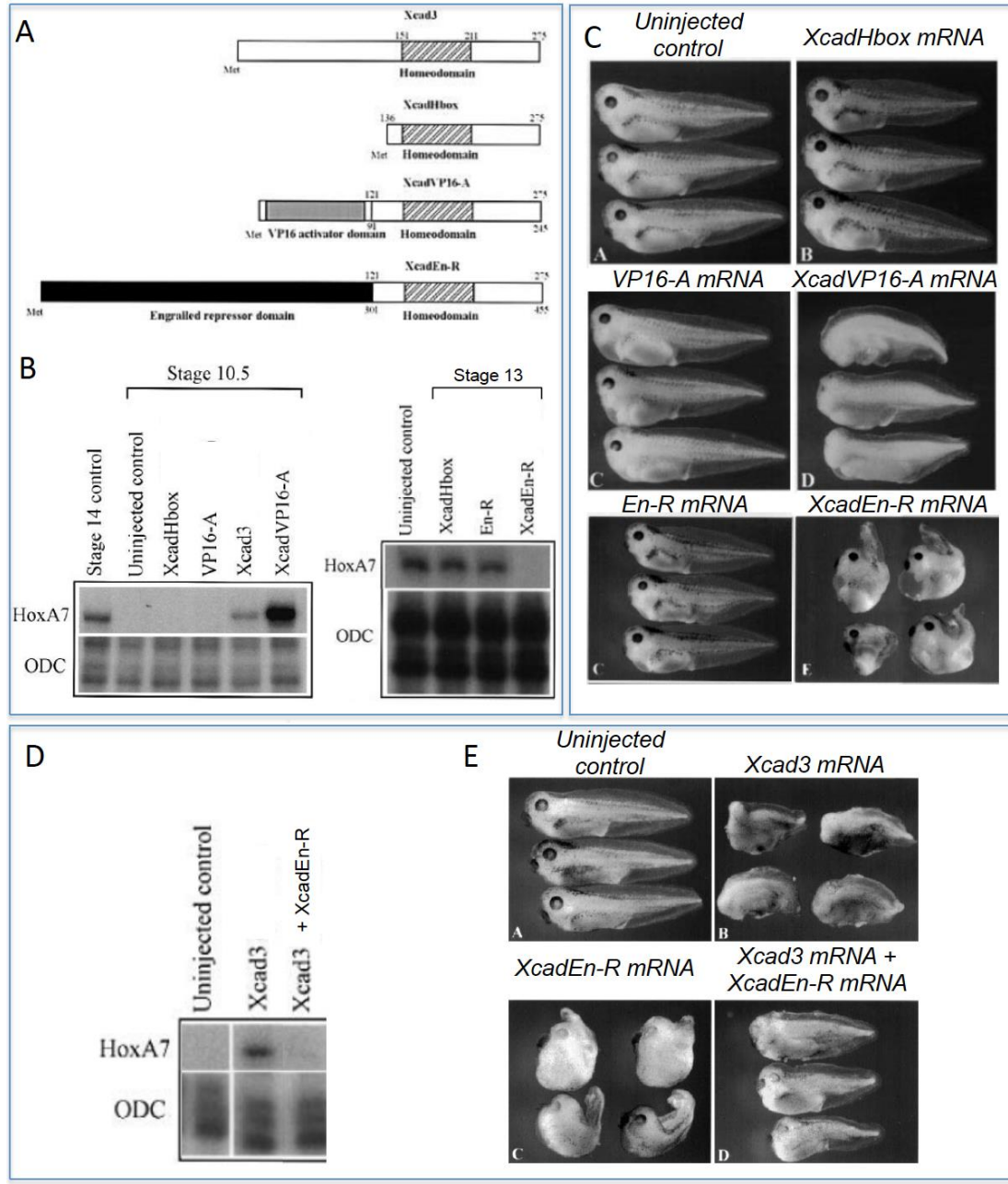


Figure 3A. Différentes constructions génétiques ont été réalisées :

- gène *Xcad3* sauvage
- gène *Xcad3* codant une protéine délétée de son extrémité N-terminale (*XcadHbox*)
- gène *Xcad3* codant une protéine délétée de son extrémité N-terminale et fusionnée au domaine activateur VP16 dont il résulte une protéine constitutivement active (*XcadVP16-A*)
- gène *Xcad3* codant une protéine délétée de son extrémité N-terminale et fusionnée au domaine répresseur *engrailed* dont il résulte une protéine *Xcad3* répressive (dominante négative, *XcadEn-R*).

Figure 3B. Les ARNm des différentes constructions décrites ci-dessus sont injectés dans les 4 blastomères d'embryons de *Xenopus* au stade 4 cellules. Par ailleurs, les ARNm codant les domaines VP16 et *Engrailed* sont injectés seuls. L'expression précoce du gène *HoxA7* est analysée par Northern Blot.

Q5 : A quoi servent les injections des domaines VP16 et Engrailed seuls ?

Q6 : Quel est l'impact de la surexpression de *Xcad3* sur l'expression de *HoxA7* ? Celui de la protéine *Xcad3* constitutivement active ? Celui de la protéine *Xcad3* dominante négative ?

Q7 : Quel est le domaine de *Xcad3* impliqué dans la transactivation du gène *Hoxa7* ?

Q8 : Figure 3C. Que pouvez-vous dire de la morphologie des embryons injectés avec les constructions décrites ?

Figure 3D, E. L'ARNm codant la protéine *Xcad3* dominante négative est co-injecté avec l'ARNm de *Xcad3*. L'expression de *HoxA7* (D) ainsi que la morphologie des embryons (E) en résultant sont représentées.

Q9 : Comment nomme-t-on ce type d'expérience et quel en est l'objectif ?

Q10 : Analyser et conclure

Partie III- les mécanismes de la postériorisation sont conservés chez les vertébrés : exemple de la régionalisation neurale chez l'embryon amniote d'oiseau.

Le rôle de la signalisation FGF et du gène orthologue de *Xcad3* de *Xenopus*, *cdxB*, est étudié chez l'embryon de poulet.

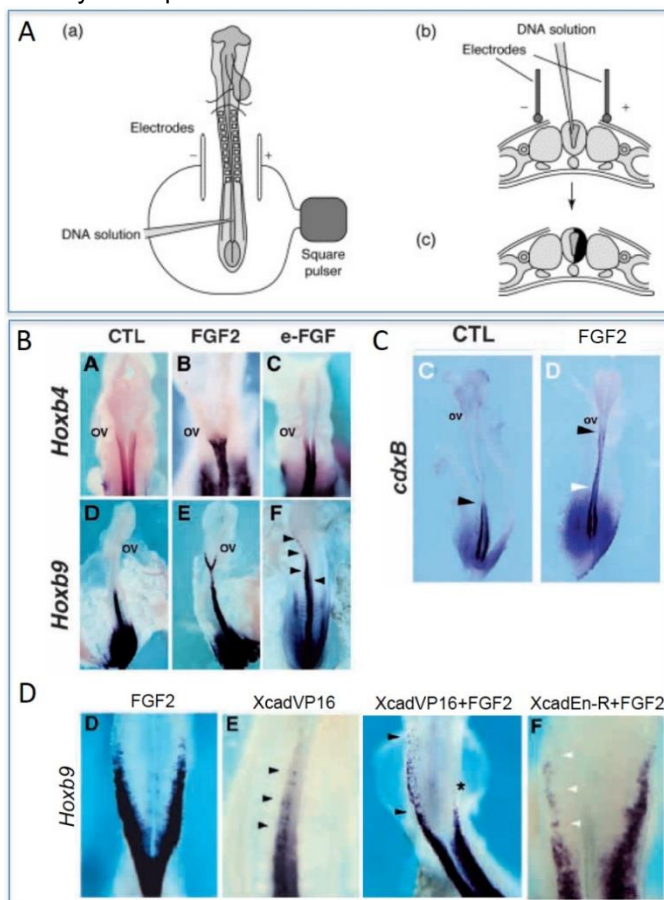


Figure 4 :

Figure 4A, B. Afin d'activer la voie de signalisation FGF, des embryons de poulet sont cultivés en présence de FGF2 ou bien électroporés unilatéralement avec une construction plasmidique portant le transgène codant pour la protéine eFGF. La technique de l'électroporation (A) est une méthode d'introduction d'ADN dans des cellules. Ici, on applique un champ électrique de part et d'autre du tube neural de l'embryon de poulet. Les membranes cellulaires sont ainsi déstabilisées, et l'ADN préalablement injecté dans la lumière du tube neural peut rentrer dans les cellules en migrant vers le pôle positif de la charge, étant lui-même chargé négativement.

Suite à l'activation de la voie de signalisation FGF, l'expression d'un gène *Hox* post-otique, *Hoxb4*, et d'un gène *Hox* spinal *Hoxb9* est révélée par hybridation *in situ* (B). ov indique la position de la vésicule otique.

Q1 : Analysez et décrivez les patrons d'expression des gènes *Hoxb4* et *Hoxb9* suite aux 2 méthodes employées.

Figure 4C. Chez les embryons cultivés en présence de FGF2, l'expression de *cdxB* est analysée par hybridation *in situ*.

Q2 : Quel impact l'activation de la voie FGF a-t-elle sur l'expression de *cdxB* ?

Figure 4D. Afin d'étudier le lien entre la signalisation FGF, les gènes caudal et les gènes Hox dans la régionalisation du tube neural chez le poulet, les constructions utilisées précédemment chez *Xenopus* sont employées. Ainsi, les constructions *XcadVP16-A* ou *XcadEn-R* sont électroporées unilatéralement dans le tube neural d'embryons de poulet puis les embryons sont cultivés en présence ou en absence de FGF2. Le côté électroporé est indiqué par les flèches du côté gauche du tube neural.

Q3 : Analyser les patrons d'expression de *Hoxb9* résultant des différentes conditions.

Q4 : Comparer ces résultats avec ceux obtenus chez *Xenopus*.

Partie IV- Conclusion

Grâce à l'ensemble des résultats analysés, modélisez les interactions entre la signalisation FGF, *Xcad3* et les gènes Hox lors de la régionalisation antéro-postérieure de l'embryon de *Xenopus* et de poulet.

Partie facultative - Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la postériorisation.

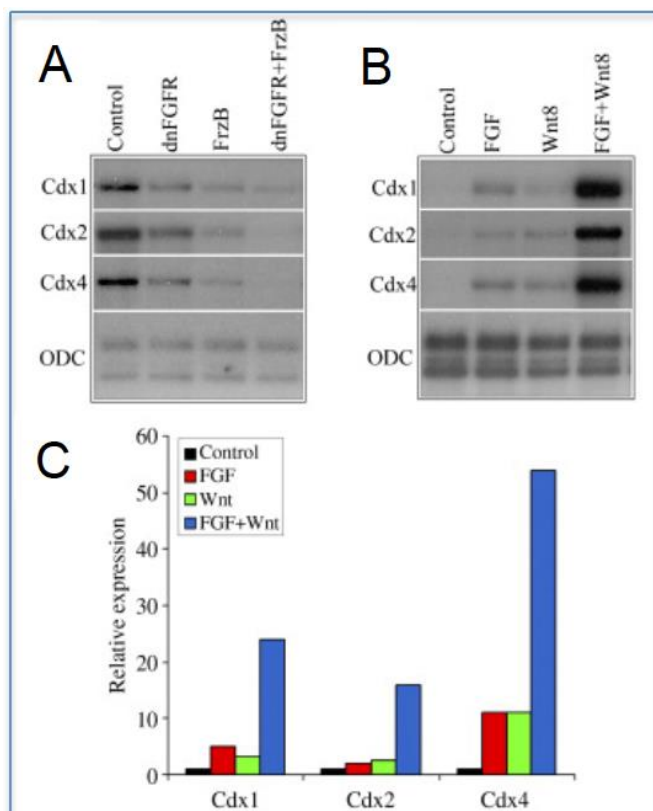


Figure 5 :

On sait que les voies de signalisation Wnt et de l'acide rétinoïque sont importantes pour la postériorisation de l'embryon. On compare ici les actions de FGF et Wnt *in vivo*. On module les voies de signalisation par injection d'ARNm codant ces protéines ou des protéines régulatrices dans les 2 blastomères d'un embryon au stade 2-cellules.

Figure 5A-C. On bloque la signalisation FGF à l'aide d'une forme dominante négative des récepteurs aux FGF (dnFGFR) ou un inhibiteur sécrété de la voie Wnt (Frzb) (A). On active les signaux FGF ou Wnt8 (B). On analyse l'expression des gènes Cdx 1, 2, 4 par Northern Blot. Les bandes obtenues sont quantifiées par densitométrie (C).

Remarque : afin d'observer des niveaux différents d'expression des gènes, les expositions des films (A) et (B) sont très différentes : à exposition équivalente, les contrôles seraient identiques.

Q1 : Analyser, conclure.

TD10 - Régionalisation antéro-postérieure du bourgeon de membre

Partie I :

Q1 : Sur le schéma suivant d'un bourgeon de membre (bdm), représentez l'AER, la ZPA et les molécules impliquées dans leur fonctionnement et leurs interactions.



Des BMP, dont BMP4, qui sont produits dans le mésenchyme du bdm sont des inhibiteurs de l'expression des FGF dans l'AER. Gremlin est une protéine sécrétée qui se lie aux BMP et les empêche d'atteindre leur récepteur.

Son patron d'expression dans un bdm de souris est observé après une hybridation *in situ*.

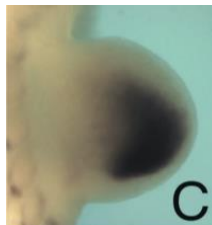


Figure 1 : Hybridation *in situ* révélant l'expression de *Gremlin* dans un bdm de souris au stade E10.5 (jour embryonnaire 10.5).

Q2 : Décrivez le patron d'expression de *Gremlin*. Posez des hypothèses sur les signaux qui pourraient contrôler son expression.

On cherche à savoir si Shh contrôle l'expression de *Gremlin*. On greffe des billes sécrétant Shh dans la partie antérieure d'un bdm d'embryon de poulet.

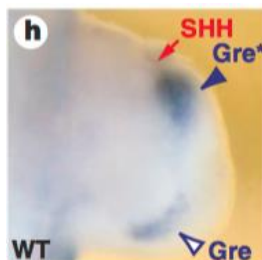


Figure 2 : Hybridation *in situ* révélant l'expression de *Gremlin* dans un bdm de poulet au stade E10.5, après greffe de billes sécrétant du Shh dans la partie antérieure.

Q3 : Analysez et interprétez le résultat obtenu.

Une région régulatrice de l'expression de *Gremlin* appelée GRE1 a été découverte. Le gène *LacZ* est placé sous le contrôle de GRE1, puis des souris transgéniques sont produites avec cette construction.

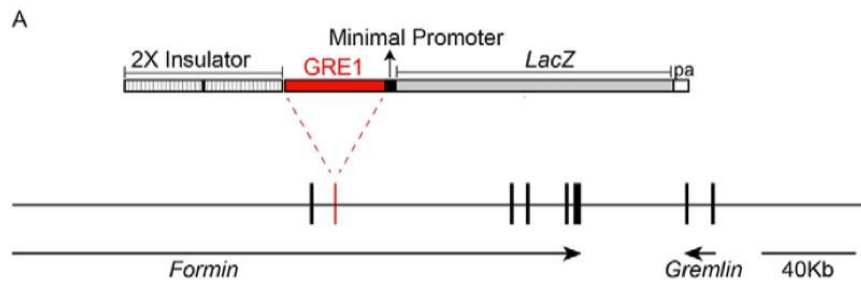


Figure 3 : Schéma illustrant la construction transgénique GRE1:*LacZ*.

Q4 : Quel est l'intérêt de cette lignée de souris ?

Un bdm antérieur est cultivé dans une solution saline et le bdm contralatéral est cultivé dans une solution de cyclopamine qui est un inhibiteur de SMO.

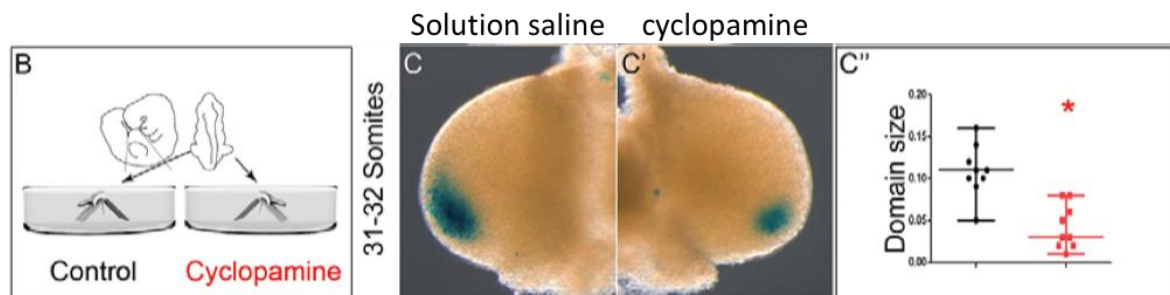


Figure 4 : A gauche, schéma de la procédure expérimentale. Au milieu, détection de la β -galactosidase après culture d'un bdm en solution saline ou en cyclopamine. A droite, mesure de la taille de la zone marquée.

Q5 : Quelle voie de signalisation est ciblée par la cyclopamine ?

Q6 : Analysez et interprétez le résultat obtenu.

On étudie les bdm de souris d'une lignée mutant perte-de-fonction *Gremlin*^{-/-}.

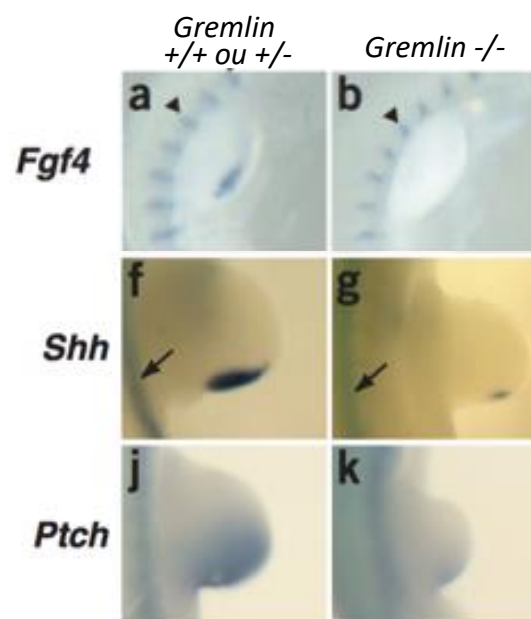


Figure 5 : Hybridation *in situ* révélant l'expression des gènes *Fgf4*, *Shh* et *Ptch* dans un bdm de souris sauvage *Gremlin*^{+/+} ou hétérozygote *Gremlin*^{+/-}, et dans un bdm de souris homozygote *Gremlin*^{-/-}.

Q7 : Décrivez l'impact de la mutation sur l'expression de *Fgf4*, de *Shh* et de *Ptch*, le récepteur et une cible directe de la voie *Shh*.

Q8 : Grâce aux résultats obtenus, placez sur le schéma de la question 1, *Gremlin* et les BMP.

Partie II :

Shh subit des modifications post-traductionnelles : un ajout de cholestérol en N-terminal et une palmitoylation en C-terminal. Après son exocytose, il a tendance à rester associé à la membrane plasmique et la protéine transmembranaire Dispatched facilite son relargage de la membrane plasmique.

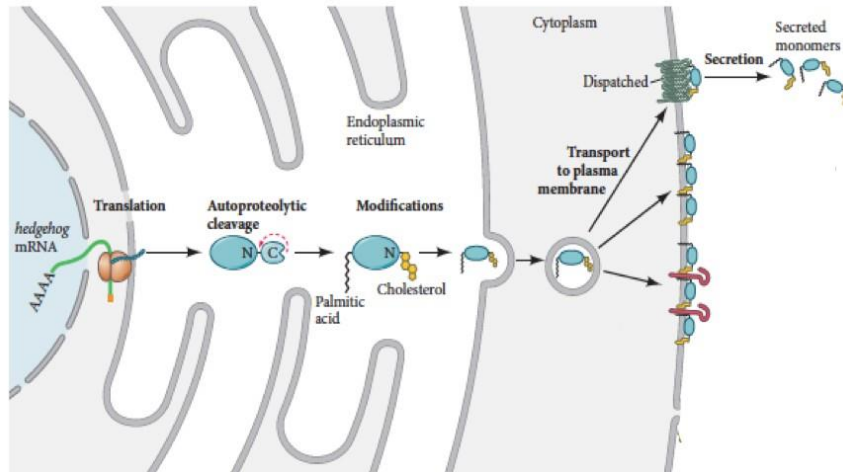


Figure 6 : Synthèse et sécrétion de Shh.

On souhaite connaître l'importance fonctionnelle de l'ajout de cholestérol à Shh. On crée des souris transgéniques exprimant une version mutée de Shh à laquelle le cholestérol ne peut pas se lier.

On observe le squelette des membres d'embryons au jour embryonnaire 18,5 colorés au bleu alcian (cartilage) et au rouge alizarine (os).

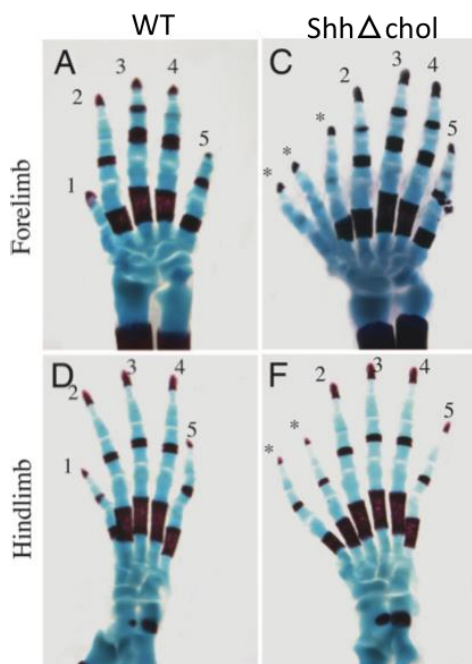


Figure 7 : Squelette des membres d'embryons de souris sauvages (WT) ou transgéniques (*Shh*Δchol) à E18,5, colorés au bleu alcian (cartilage) et au rouge alizarine (os).

Q9 : Que constatez-vous sur ces squelettes ? Posez des hypothèses pour comprendre les anomalies observées.

On cherche à connaître l'origine des défauts au cours des stades plus précoces du développement des membres. On réalise une série d'hybridations *in situ* sur des bdm postérieurs d'embryons au jour embryonnaire 10,5. Gli1 est un facteur de transcription dont l'activité et l'expression sont activées par la voie Shh. Hoxd13 est un facteur de transcription impliqué dans la morphogenèse des doigts.

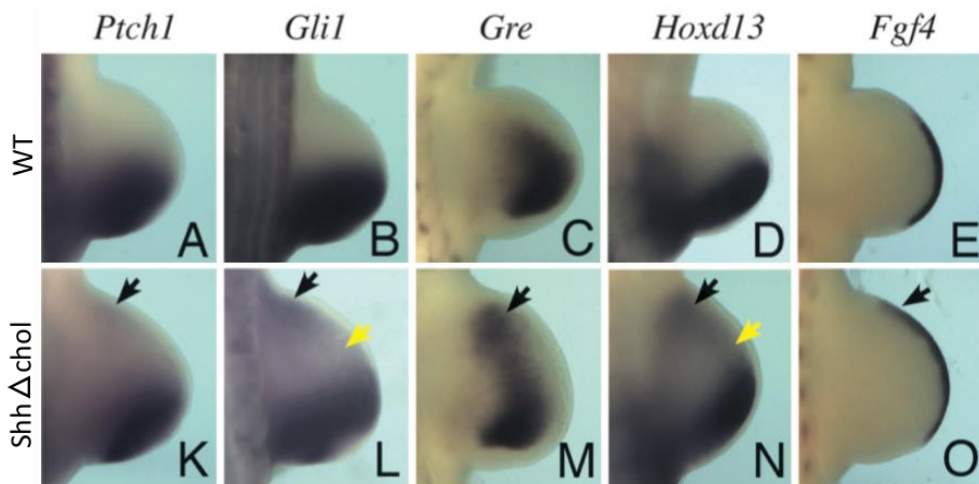


Figure 8 : Hybridation *in situ* révélant l'expression des gènes *Ptch1*, *Gli1*, *Gremlin* (*Gre*), *Hoxd13* et *Fgf4* dans un bdm d'embryons de souris sauvages (WT) ou transgéniques (*ShhΔchol*).

Q10 : Analysez et interprétez les résultats obtenus.

On réalise des hybridations *in situ* de *Shh* dans des bdm sauvages et transgéniques, et une immunofluorescence avec un anticorps reconnaissant Shh sur des coupes de bdm sauvage et transgénique.

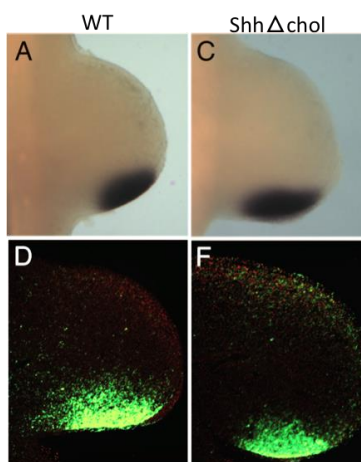


Figure 9 : Expression de *Shh* révélée par hybridation *in situ* (haut) ou immunofluorescence (bas) dans un bdm d'embryons de souris sauvages (WT) ou transgéniques (*ShhΔchol*).

Q11 : Quel est l'intérêt de comparer hybridation *in situ* et immunofluorescence ? Que concluez-vous sur la répartition de *Shh* chez la souris transgénique ?

Gli3 est un répresseur de la transcription lorsqu'il est clivé (GliR, 83 kDa). La signalisation Shh inhibe ce clivage et la protéine reste entière à 190 kDa. On réalise des extraits protéiques de la moitié antérieure et postérieure des bdm de souris sauvage et transgéniques et ils sont analysés par western-blot avec un anticorps reconnaissant Gli3. On analyse également des extraits protéiques de bdm de souris mutantes *Gli3^{-/-}*.

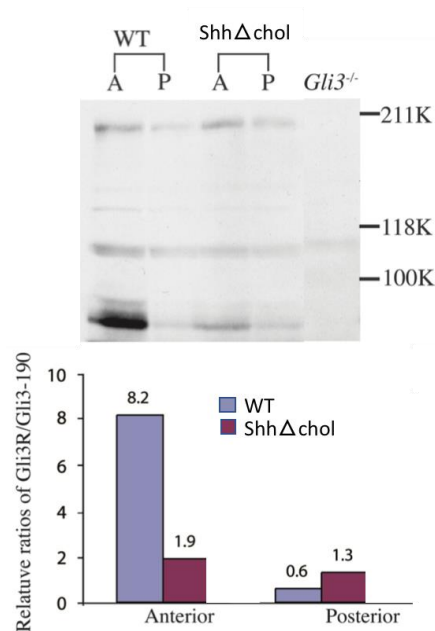


Figure 10 : Analyse par western blot des différentes isoformes de Gli3 présentes dans les parties antérieures (A) ou postérieures (B) de bdm d'embryons de souris sauvages (WT) ou transgéniques (ShhΔchol), ou dans des embryons souris *Gli3*^{-/-}. Le graphique représente la quantification du signal obtenu en western blot.

Q12 : Quel est l'intérêt d'étudier les extraits protéiques des souris *Gli3*^{-/-} ? Déterminer les bandes correspondantes à Gli3 entier et Gli3R.

Q13 : Analysez et interprétez les résultats obtenus.

On souhaite étudier les phénotypes des souris transgéniques dans un contexte de perte-de-fonction de *Dispatched*.

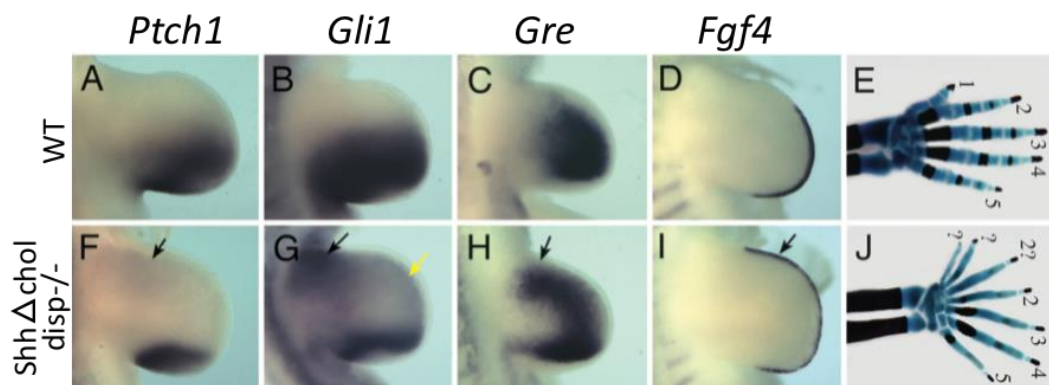


Figure 10 : (A-D, F-I) Hybridation *in situ* révélant l'expression des gènes *Ptch1*, *Gli1*, *Gremlin* (*Gre*) et *Fgf4* dans des bdm d'embryons de souris sauvages (WT) ou transgéniques (ShhΔchol) dans un contexte de perte de fonction de *Dispatched* (*disp*^{-/-}). (E, J) Squelette des membres d'embryons de souris sauvages (WT) ou transgéniques (ShhΔchol) dans un contexte de perte de fonction de *Dispatched* (*disp*^{-/-}) à E18,5, colorés au bleu alcian (cartilage) et au rouge alizarine (os).

Q14 : Quel est l'intérêt de cette expérience ?

Q15 : Analysez et interprétez les résultats obtenus à l'aide d'un schéma montrant les gradients des formes de Shh avec et sans cholestérol le long de l'axe antéro-postérieur du bdm.

TP-BV Signaux hormonaux : Effets sur le développement d'*A. thaliana*

Le but de ces travaux pratiques est de montrer les effets de différents signaux hormonaux sur la germination et le développement des plantes, ainsi que d'illustrer la notion de gène rapporteur chez les Végétaux. La plante modèle choisie pour cette étude est *Arabidopsis thaliana*, pour laquelle de nombreux mutants de développement sont connus.

I. MATERIEL ET METHODES

1. Matériel végétal :

- *Arabidopsis thaliana*, lignée sauvage, ecotype Colombia (Col-0)
- *Arabidopsis thaliana*, lignée mutant EMS *sax1*, ecotype Col-0
- *Arabidopsis thaliana*, lignée transgénique ProCVD::GUS, ecotype Col-0

2. Méthodes :

2.1 Culture *in vitro* :

- **Préparation des boîtes de culture (sous hotte)**
 - o liquéfier le milieu de culture [1/2 MS, 1% saccharose, pH 5.7, 0.7% agar] au four à micro-ondes si besoin
 - o ajouter dans les bonnes proportions l'effecteur au milieu de culture encore chaud
 - o verser le milieu encore chaud dans les boîtes de culture (50 ml par boîte)
 - o laisser refroidir et solidifier sous la hotte, couvercle légèrement entrouvert
- **Stérilisation des graines :**
 - o ajouter 1 ml de solution de stérilisation [solution de Bayrochlor + SDS] aux graines
 - o mélanger et incuber 5 min sous agitation
 - o laisser sédimenter les graines et prélever stérilement le surnageant (sous hotte)
 - o rincer 4 fois à l'eau stérile (sous hotte)
- **Semis des graines et mise en culture :**
 - o semer stérilement en déposant à la pipette P1000 (ou P200) les graines une à une à la surface de l'agarose (utiliser les guides de semis)
 - o fermer la boîte avec du sparadrap
 - o placer les boîtes 24 à 48h (40h en pratique) à l'obscurité à 4°C (synchronisation)
 - o puis placer les boîtes verticalement en chambre de culture (20°C, jours longs), sauf pour l'ACC, où après 6h de lumière, les boîtes seront replacées à l'obscurité (20°C)

2.2 Estimation du taux de germination :

- compter comme « germées » les graines d'où émerge la pointe de la radicule
- calculer le % de germination en divisant le nombre de graines germées par le nombre total de graines semées x100

2.3 Mesures de croissance :

- mesurer la longueur des racines ou des hypocotyles pour chaque plante, selon les effecteurs et leur concentration, après 7 jours de culture
- calculer la moyenne et l'écart-type sur les mesures de chaque condition
- si nécessaire, exprimer les résultats en % de l'effet observé

- tracer les graphes : longueur racine (ou hypocotyle) = $f(\text{concentration en effecteur})$
- comparer et discuter les résultats obtenus

2.4 Révélation histochimique de l'activité GUS :

- prélever 10 plantules Col-0 / ProCVD::GUS (une semaine après germination sur des concentrations croissantes en auxine), et les placer délicatement (par génotype !) dans un tube Eppendorf 1.5ml
- ajouter du tampon de coloration de façon à recouvrir totalement les plantules (soit environ 500µl de tampon)
- les placer sous vide pendant 5 min (retirer le vide doucement)
- les incuber à 37°C au moins 1/2h
- retirer le tampon de coloration, rincer avec de l'eau distillée
- monter entre lame et lamelle dans une goutte d'eau, et observer au microscope la présence et la localisation de la coloration bleue (conséquence de l'activité GUS)

II. RESULTATS

A. Etude des réponses (germination et croissance) à différentes hormones

(une hormone par trinôme, sauf pour ANA : 2 trinômes)

1. Effets des auxines (ANA 10^{-2} M stock):

- semer 50 graines de Col-0 et de *saxl* sur les concentrations d'ANA suivantes : 0 / 10^{-7} M / 10^{-6} M / 10^{-5} M
- observer les effets après 7 jours de culture ; repérer les paramètres intéressants à quantifier ; les mesurer

2. Effets des cytokinines (BAP 10^{-2} M stock):

- semer 50 graines de Col-0 et de *saxl* sur les concentrations de BAP suivantes : 0 / 10^{-7} M / 10^{-6} M / 10^{-5} M
- observer les effets après 7 jours de culture ; repérer les paramètres intéressants à quantifier ; les mesurer

3. Effets de l'ABA (ABA 10^{-3} M stock):

- semer 50 graines de Col-0 et de *saxl* sur les concentrations d'ABA suivantes : 0 / 10^{-8} M / 10^{-7} M / 10^{-6} M
- observer les effets après 7 jours de culture ; repérer les paramètres intéressants à quantifier ; les mesurer

4. Effets des gibbérellines (GA₃ 10^{-3} M stock EtOH):

- semer 50 graines de Col-0 et de *saxl* sur les concentrations de GA₃ suivantes : 0 / 10^{-8} M / 10^{-7} M / 10^{-6} M
- observer les effets après 7 jours de culture ; repérer les paramètres intéressants à quantifier ; les mesurer

5. Effets de l'éthylène (à l'obscurité) (ACC 10^{-3} M stock):

- semer 50 graines de Col-0 et de *saxl* sur les concentrations d'ACC suivantes : 0 / 10^{-8} M / 10^{-7} M / 10^{-6} M
- observer les effets après 7 jours de culture ; repérer les paramètres intéressants à quantifier ; les mesurer

B. Etude de l'induction d'un promoteur par l'auxine

1. Notion de gène rapporteur (cf. TD1) :

Le gène *uidA* (appelé GUS par abus de langage) a été isolé à l'origine chez *E. coli* (Jefferson *et al.*, 1986 ; 1987) comme appartenant à l'opéron GUS. Il code pour une β -glucuronidase couramment appelée protéine GUS. Ce gène peut être utilisé comme marqueur de l'expression spécifique d'un gène particulier. En effet, placé derrière le promoteur du gène d'intérêt, il permet de suivre au cours du temps son expression au sein des différents tissus, et d'en analyser les conditions d'expression (environnementales, hormonales, ...).

Avantages/Inconvénients :

- Aucun homologue au gène *uidA* n'a, jusqu'à présent, été isolé chez les Végétaux. Les plantes ne possèdent donc pas d'activité GUS endogène.
- La protéine GUS est très stable et résiste notamment à la fixation des tissus.
- L'activité GUS se mesure de façon directe au sein des tissus (méthode histochimique ou fluorimétrique), mais nécessite généralement une destruction irréversible de ceux-ci, contrairement au gène rapporteur *GFP*.

2. Effets de l'auxine sur l'expression du gène COVID :

- semer 25 graines de Col-0 et de ProCVD::GUS sur les concentrations d'ANA suivantes :
 $0 / 10^{-7} \text{ M} / 10^{-6} \text{ M} / 10^{-5} \text{ M}$, à raison d'une seule boîte par concentration (les 2 lots de graines étant placés de part et d'autre de la même boîte, séparés par un trait au marqueur)
- observer les effets après 7 jours de culture ; repérer les paramètres intéressants à quantifier ; les mesurer
- observer et analyser la localisation de l'activité GUS (conséquence de l'expression du gène *uidA*, et donc de l'activation du promoteur du gène *CVD* par l'auxine) par révélation histochimique

ANNEXES

1. Composition de la solution de stérilisation :

- Dissoudre 3,3g de Bayrochlor® dans 400ml d'eau distillée
- Ajouter quelques gouttes de SDS 20% (agent « mouillant »)
- Conserver à température ambiante

2. Composition du milieu de culture :

- Peser 2,2g de milieu Murashige et Skoog complet (Duchefa M0222 ; Murashige et Skoog, 1962), soit $\frac{1}{2}$ de la quantité préconisée pour 1L

MURASHIGE & SKOOG MEDIUM

MICRO ELEMENTS

CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	mg/l	0.11	μM
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025		0.10	μM
FeNaEDTA	36.70		0.10	mM
H ₃ BO ₃	6.20		0.10	mM
KI	0.83		5.00	μM
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.90		0.10	mM
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25		1.03	μM
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60		29.91	μM

MACRO ELEMENTS

CaCl ₂	332.02	mg/l	2.99	mM
KH ₂ PO ₄	170.00		1.25	mM
KNO ₃	1900.00		18.79	mM
MgSO ₄	180.54		1.50	mM
NH ₄ NO ₃	1650.00		20.61	mM
	4302.09	mg/l		

VITAMINS

Glycine	2.00	mg/l	26.64	μM
myo-Inositol	100.00		0.56	mM
Nicotinic acid	0.50		4.06	μM
Pyridoxine HCL	0.50		2.43	μM
Thiamine HCl	0.10		0.30	μM
	4405.19	mg/l		

Ajouter 10g de saccharose (1% = 1g / 100ml)

- Dissoudre dans 1L d'eau distillée (ajuster si besoin le pH à 5.7)
- Ajouter 7g d'agar (Kalys HP696)
- Stériliser à l'autoclave

3. Composition de la solution de coloration :

- 100mM Tampon phosphate pH 7
- 10mM EDTA
- 0.1% Triton x100 (v/v)
- 1mM X-Gluc (5-bromo 4-chloro 3-indolyl β-D-glucuronide)

REFERENCES

Jefferson RA, Burgess SM et Hirsch D (1986) β-glucuronidase from *E. coli* as a gene fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 8447-8451.

Jefferson RA, Kavanagh TA et Bevan MW (1987) GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*, 6, 3901-3907.

Murashige T et Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.