



MUTAGENESE ET ACTIVITE DE L'ENHANCER a DU GENE OTX DE *Ciona intestinalis*

DA CUNHA Dylan

Stage effectué(e) du 9/05/2016 au 01/07/2016 au sein du **Centre de Recherche de la Biologie cellulaire de Montpellier** au CNRS de Montpellier 1919 Route de Mende sous la direction scientifique de M. LEMAIRE Patrick et M. PIETTE Jacques.



« Le présent rapport constitue un exercice pédagogique qui ne peut en aucun cas engager la responsabilité de l'Entreprise ou du Laboratoire d'accueil »



UFR SCIENCES & TECHNIQUES COTE BASQUE
Université de Pau et des Pays de l'Adour
Licence Biologie des Organismes

2015/2016

MUTAGENESE ET ACTIVITE DE L'ENHANCER a DU GENE OTX DE *Ciona intestinalis*

DA CUNHA Dylan

Stage effectué(e) du 9/05/2016 au 01/07/2016 au sein du **Centre de Recherche de la Biologie cellulaire de Montpellier** au CNRS de Montpellier 1919 Route de Mende sous la direction scientifique de M. LEMAIRE Patrick et de M. PIETTE Jacques.



« Le présent rapport constitue un exercice pédagogique qui ne peut en aucun cas engager la responsabilité de l'Entreprise ou du Laboratoire d'accueil »

Résumé

Les enhancers sont des régulateurs cruciaux de l'expression des gènes pendant le développement embryonnaire. L'ascidie *Ciona intestinalis* est un organisme-modèle qui se prête à l'étude de ces séquences cis-régulatrices car ses enhancers sont généralement petits et compacts, et le lignage invariant des cellules chez l'embryon permet de visualiser leur activité.

Durant mon stage, on a utilisé un enhancer neural précoce de *Ciona*, le très bien caractérisé élément-a du gène *Otx*, comme enhancer-modèle. Ce petit enhancer (55pb), est lié par les facteurs de transcription *Gata4/5/6* et *Ets1/2* et activé par la voie de signalisation FGF. Afin de mieux comprendre les déterminants de l'activité neurale précoce d'un enhancer, on a testé l'impact de mutations ponctuelles affectant l'affinité du site de fixation ETS1 de l'élément-a pour les facteurs de transcription afin de regarder si les spacers et sites de fixation étaient les seules causes qui induisaient des différences de fixation des facteurs de transcription. Pour cela, nous avons effectué des électroporations des séquences souhaitées dans les embryons de *Ciona intestinalis* afin de regarder l'activité des différents éléments a construits.

Abstract

Enhancers are crucial elements for the control of gene expression during embryonic development. The ascidian *Ciona intestinalis* offers unique experimental features to study these cis-regulatory sequences: enhancers are generally small and compact and their activity can be tracked at the single cell level thanks to the invariant cell lineage

During my internship, we have used a well-characterized early neural *Ciona* enhancer, the a-element of the *Otx* gene, as a model enhancer. This small (55pb) enhancer, is bound by *Gata4/5/6* and *Ets1/2* and is activated by the FGF pathway. To better understand the determinants of early neural enhancer activity, we have tested the impact of point mutations affecting the affinity of the a-element TFBS for their binding TF to look if spacers and binding sites were the only causes which induced the differences of fixation of transcription factors. For that, we have effected electroporation of those sequences in *Ciona intestinalis* embryos to look the different a elements activity built.

Mots clefs

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide Ribonucléique

A : adénine

C : cytosine

G : guanine

T : thymine

fmol : femtomole

H₂O : eau

Ng : nano gramme

Pb : paire de bases

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase chain reaction)

TFbs : facteurs de transcription

μM, μl, ml : micro molaire, micro litres, millilitres

Remerciement

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à tous ceux et celles qui m'ont donné les moyens d'entreprendre mon stage et apporté le soutien pour le mener à bien.

Mes premiers remerciements vont à la direction du CNRS et particulièrement à mon directeur de recherches Patrick Lemaire qui m'a permis d'accéder à une expérience professionnelle dans le monde de la biologie, à avoir un nouveau et surtout un premier regard du métier de chercheur.

Je remercie mon maître de stage Jacques Piette, chercheur émérite qui m'a suivi tout le long de mon stage et qui m'a appris la recherche dans ses méthodes, ses réflexions et ses manipulations et le travail d'équipe que cela engage.

Je remercie tout le personnel du laboratoire, Julien Laussu (Post-Doc), Alicia Madgwick (Doctorante) et Damien Gailly (Master1), qui m'ont épaulé durant ces deux mois et m'ont donné conseils lorsqu'un questionnement s'imposait.

Je remercie pour terminer toute l'équipe de bioinformatique, Christelle Dantec, Justine Dardaillon et Matjia Brosovic pour leur aide dans la mise de programme contribuant à rendre la recherche plus facile et plus rapide.

Merci à toute l'équipe pour cette aventure humaine, pleine de nouveaux savoirs et d'expériences.

Avant-propos

Le CRBM, (Centre de Recherche de Biologie Macromoléculaire), est un centre de recherche scientifique international et interdisciplinaire. Il est soutenu à la fois par le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) et par l'université de Montpellier II.

Il utilise des approches modernes pour répondre à des questions fondamentales en biochimie, en biologie cellulaire et en biologie moléculaire en utilisant un large éventail d'organismes modèles. Ils appliquent leurs travaux de recherche au domaine biomédical, pour comprendre la base moléculaire des maladies et développer des stratégies thérapeutiques innovantes. Cette recherche est facilitée par plusieurs services et plateformes technologiques.

Le CRBM possède dix-huit équipes de recherche avec chacune une thématique qui lui est propre. Le déroulement de ce stage s'effectue au sein de l'équipe « Contrôle transcriptionnel de la morphogénèse des Chordés », dirigée par Patrick Lemaire.

Cette équipe est constituée de deux directeurs de recherche qui sont Patrick Lemaire et Jacques Piette, de trois bio informaticiens de recherche (Matija Brosovic, Cristelle Dantec et Justine Dardaillon), d'un post doctorant Julien Laussu, d'une doctorante Alicia Madgwick et d'un stagiaire Damien Gailly.

Elle utilise comme modèle les embryons de tuniciers en raison de la simplicité anatomique et génomique de ces invertébrés marins, qui sont étroitement liés aux vertébrés. Leur travail se concentre essentiellement sur deux groupes de tuniciers, les ascidies et les thaliacés.

Les embryons d'ascidies offrent une occasion unique de déchiffrer le programme de développement d'un chordé avec un niveau de résolution cellulaire, et de comprendre comment une forte plasticité génomique est compatible avec la conservation morphologique.

Pour identifier à l'échelle du génome les mécanismes qui contrôlent la stabilité évolutive remarquable de la morphogénèse des ascidies, les chercheurs de l'équipe combinent des approches d'imagerie quantitative, de séquençage de génomes, d'épigénétique, et de mesure de l'expression des gènes. Les principaux objectifs sont les suivants :

- Elucider la phylogénie des tuniciers et l'évolution du répertoire des protéines régulatrices du développement chez les ascidies.
- Quantifier la morphogénèse des ascidies et son évolution par microscopie à feuille de lumière.
- Séquencer et assembler les génomes d'espèces d'ascidies évolutivement plus ou moins proches
- Décrire l'évolution entre espèces d'ascidies plus ou moins proches du programme transcriptionnel et des réseaux de régulation génétique qui conduisent l'embryogenèse.
- Identifier les forces qui expliquent l'extrême stabilité de l'évolution de la morphogénèse des ascidies et déterminer l'impact relatif des contraintes de développement, de la sélection et de la dérive sur l'évolution des programmes transcriptionnels et morphogénétiques.
- Développer un système avancé de base de données d'organisme modèle, ANISEED, permettant l'intégration multi-échelle de données hétérogènes décrivant les programmes de développement aux niveaux génétiques et cellulaires.

Table des matières

1. Introduction	2
2. Matériel et méthodes	5
2.1. Amplification des fragments par PCR	5
2.1.1. Présentation des fragments d'intérêt.	5
2.1.2. Protocole d'amplification des fragments.....	6
2.1.3. Préparation et programme PCR	7
2.1.4. Vérification de l'amplification PCR	7
2.1.5. Purification des fragments PCR – Fixation de l'ADN sur colonne	8
2.1.6. Densité optique via le Nanodrop.....	8
2.1.7. Union des enhancers avec promoteur bpFOG.....	9
2.1.8. Ajout de séquence de recombinaison par PCR	10
2.2. Clonage par système Gateway	11
2.2.1. BP réaction	12
2.2.2. Réaction LR.....	15
2.3. Electroporation	17
2.3.1. Protocole électroporation.....	18
2.3.2. Fixation des embryons :.....	19
2.3.3. Expression attendue du Wild Type selon la thèse :.....	19
3. Résultats – Discussion.....	20
3.1. Résultats PCR amplification des 5 fragments	20
3.2. Résultats PCR amplification enhancer-promoteur liés.....	20
3.3. Résultats PCR ajout des séquences d'intérêt attB_L.....	21
3.4. Résultat réaction BP	22
3.5. Résultats réaction LR	23
3.6. Résultats électroporation :	25
3.6.1. Résultats électroporation 1.....	25
3.6.2. Résultats électroporation 2.....	27
4. Conclusion	31
Bibliographie.....	32
Annexe	33

1.Introduction

La transcription en ARN est la première étape clé qui permet la transition l'ADN aux de protéines finales. Le code génétique permet de traduire l'ARN pour former des protéines. Les gènes des eucaryotes sont découpés en introns/exons. Les mécanismes de la transcription chez les eucaryotes sont découpés en trois étapes : l'initiation l'élongation et la terminaison.

La transcription est un processus hautement régulé, notamment grâce à l'épissage différentiel. Elle permet une expression différente pour chaque type de cellule alors que celles-ci possèdent toutes le même patrimoine génétique. Les mécanismes de la régulation de la transcription possèdent leur information dans des séquences génétiques dites régulatrices localisées à plus ou moins grande distance des gènes qu'ils contrôlent. Beaucoup de recherches s'effectuent sur ces séquences découvertes car elles sont encore mal connues et leur mécanisme mal compris.

La compréhension du fonctionnement de ces séquences régulatrices serait d'une importance capitale pour comprendre la génétique du développement et l'évolution malgré les nombreux différents niveaux de contrôle de l'expression des gènes.

Les avancées technologiques, depuis la découverte il y a trente-cinq ans des éléments régulateurs (M.L. Goldberg, PhD thesis, Stanford University, 1979), permettent de détecter de mieux en mieux ces séquences régulatrices notamment en bio-informatique avec la recherches des motifs régulateurs grâce à des matrices pondérées, à la découverte des ces motifs grâce à des fréquences d'oligonucléotides, à des algorithmes stochastiques et à d'autres méthodes ; même si aucun logiciel propre n'existe pour détecter ces séquences actuellement.

La majorité des génomes eucaryotes possèdent des régions non codantes pour des protéines. La régulation de l'ADN s'effectue avec des séquences dites *cis*-régulatrices ou éléments *cis*-régulateurs qui se trouvent en majorité dans ces régions et qui contrôlent l'expression des gènes des régions codantes.

Il existe plusieurs sortes de séquences *cis*-régulatrices, c'est-à-dire localisées sur la même molécule d'ADN que le gène dont elles contrôlent l'expression. Celles-ci agissent avec des protéines (facteurs de transcriptions) qui se fixent sur ces séquences spécifiques et interagissent avec les facteurs généraux de la transcription.

Le promoteur d'un gène généralement très court (100 Pb), est un élément *cis*-régulateur. Ces séquences (ex : boîte TATA), correspondent au site où va s'assembler le complexe d'initiation de la transcription. Les promoteurs dits « minimaux », sont des éléments les plus petits existants nécessaires à l'initiation de la transcription et doivent être activé par des facteurs de transcriptions (Trans-régulateurs : protéines) et qui se fixent sur des séquences *cis*-régulatrices que l'on appelle Enhancers.

Les séquences régulatrices communiquent avec le promoteur d'un gène via le repliement de l'ADN dans le noyau. Ils activent (enhancers) ou répriment son activité (silencers). On rappelle que ces séquences se trouvent dans les séquences inter géniques ou introniques non codantes. Les éléments identifiés ne font pas plus d'une centaine de paires de base en général chez les tuniciers. Ils peuvent être présents par milliers chez les mammifères, possèdent des séquences différentes et se couplent à des facteurs de transcription spécifiques.

Les facteurs de transcriptions ont une spécificité de fixations de l'ADN. Ils présentent généralement plusieurs milliers de sites de fixation sur les séquences du matériel génétique. Ils possèdent au moins deux domaines. Le premier permet de fixer le facteur à l'ADN (5 à 12 Pb) et le second permet l'interaction avec d'autres protéines. Leur nombre varie en fonction des génomes (5 chez les bactéries et jusqu'à 1500 chez les mammifères). C'est la structure secondaire hélice alpha ou feuillet bêta qui est responsable, dans de nombreux cas, de l'interaction avec l'ADN. Plusieurs méthodes existent pour déterminer la spécificité de fixation (retard sur gel, SELEX...). Cette diversification des sites de fixation permet la complexification de l'expression génétique des organismes.

Le stage se concentre sur un des enhancers (l'enhancer a), qui régule l'expression d'un gène (*Otx*), de l'espèce *Ciona intestinalis* de la classe des Ascidies. Il existe plusieurs intérêts majeurs à étudier cette classe d'organismes. Il existe près de 3000 espèces d'Ascidies dont *Ciona intestinalis* qui est un des organismes modèle le mieux établi. Elle est répartie dans toutes les mers tempérées du globe et possède une période de fertilité relativement large (d'avril à novembre), en plus d'être hermaphrodite.

L'avènement des études de phylogénie moléculaire a permis de classer l'embranchement des Tuniciers (qui contient la classe des Ascidies), entre les Céphalocordés et les Vertébrés ; en effet, dans leur développement embryonnaire, les Ascidies développent un tube neural dorsal et une notochorde que l'on retrouve chez les Céphalocordés et les Vertébrés. De plus, des cellules caractéristiques de la crête neurale des Vertébrés ont été observées ; celles-ci ne sont pas présentes chez les Céphalocordés. C'est ici que réside l'avantage d'étudier cette classe afin de comprendre les mécanismes fondamentaux à l'origine des vertébrés.

D'autre part, grâce à des études menées, (Minokawa, Yagi, Makabe & Nishida, 2001 ; Yasuo & Hudson, 2007 ; Roule et al., 2014), on connaît les types de cellules qui vont donner les tissus principaux des trois feuillets de l'embryon de *Ciona intestinalis*, (endoderme, mesoderme et neuroectoderme). On sait aussi que le génome est compact (de petite taille). Toutes ces caractéristiques font de *Ciona intestinalis* et des Ascidies des organismes de choix pour étudier la régulation transcriptionnelle dans la formation des tissus caractéristiques à l'origine des vertébrés lors du développement embryonnaire (blastulation, gastrulation et neurulation entre autres).

Il existe plusieurs caractéristiques des enhancers chez les Ascidies pour la régulation de la transcription. Chez ces organismes, ils sont relativement petits. Des enhancers dits « minimaux », ont été identifiés (Levine, 2010). Ils font entre 50 à 200 Pb, possédant 2 à 4 sites de fixations pour les facteurs de transcription ; ce qui ajoute de la simplicité pour les analyser et les comparer.

Une partie de l'enhancer de gène *Otx*, l'élément a est le modèle utilisé pour le déroulement de ce stage. Celui-ci consiste à poursuivre les travaux d'une thèse (Marion guérault-Bellone, 2016), sur la signature nucléotidique de l'activité des enhancers chez l'ascidie *Ciona intestinalis*. Chaque enhancer est exprimé spécifiquement dans différents tissus au cours du développement. Le gène *Otx* est contrôlé par l'élément a dans le tissu neural. L'induction du gène *Otx* dans le tissu neural est contrôlée par la voie de signalisation FGF qui va activer l'enhancer a.

L'élément a régulé l'expression du gène Otx et l'active avant la gastrulation (au stade 32 cellules). Sa séquence est de 55 Pb ; il possède 5 sites de fixation pour les facteurs de transcription : 3 sites GATA 4/5/6 et 2 sites ETS 1/2, qui sont spécifiques à la voie de signalisation FGF (activation ou inhibition).

G1 E1 E2 G2 G3
 CGTTATCTCTAACCGGAAGTTTTCGAAAAGGAATTGTTCAATATTTAAGATAGGA

FIGURE 1. ELEMENT A DU GENE OTX DE CIONA INTESTINALIS

Le sujet de la thèse s'est porté sur cet enhancer, en se demandant qu'est ce qui fait que l'enhancer a est actif dans les cellules neurales ? Est-ce que cela est dû seulement à ses sites de fixation des facteurs de transcription ou y a-t-il d'autres facteurs qui entrent en jeu ?

La doctorante a d'abord porté son regard sur le rôle des séquences des sites de fixation (6 paires de bases). En mutant les extrémités des sites, elle a regardé l'activité des enhancers randomisés en fonction des bases échangées. Dans un deuxième temps, ce sont les séquences intermédiaires, (entre les sites de fixation), qui ont été modifiées grâce aussi aux enhancers randomisés. Dans les deux cas, les résultats ont montré que les séquences des sites de fixation et des séquences intermédiaires, (étudiés indépendamment), influencent la fixation des facteurs de transcription sur les sites.

Cette étude a pu comparer les enhancers randomisés grâce à des logiciels, (ex : DNA Shape Prediction), qui comparent la structure tridimensionnelle de l'ADN en fonction des séquences, et les techniques de retards sur gel (gel shift) qui déterminent l'affinité des facteurs de transcription pour les sites de fixation.

Dans ce stage, qui poursuit ces travaux, une nouvelle approche a été mise en place pour essayer de répondre :

Est-ce que les deux paires de bases flanquant les sites de fixation établis précédemment peuvent avoir une influence déterminante sur la fixation des facteurs et sur la structure tridimensionnelle de l'ADN au niveau de cette séquence ?

Pour répondre à cette question, 2 types d'enhancers randomisés ont été choisis, en se concentrant sur les 2 sites de fixation ETS ; aR-5 qui a été déterminé inactif et sans affinité de fixation pour ETS 1/2 dans la thèse précédente et aR-19 qui possède une activité et une affinité de fixation élevée pour ETS1/2. Dans notre étude, on a choisi de construire 2 mutants ; aR-5_bg_19 où l'on a modifié le site ETS 1 en remplaçant les 2 paires de bases de aR-5 aux extrémités 5' et 3', par 2 bases de aR-19 et aR-19_bg_5 où l'on a modifié le site ETS 1 en remplaçant les 2 paires de bases de aR-19 aux extrémités 5' et 3', par 2 bases de aR-5. Les sites ETS 2 n'ont pas été modifiés.

aR5 CGTTATCTGCCGCGGAAGGTTGGGGGAAGG
 aR5_bg19 GCTTATCTAGGCGGAAGGTGCTCTGGAGG
 aR19_bg5 CGTTATCTGCCGCGGAAGGATGGGGGAAGG
 aR19 GCTTATCTAGGCGGAAGGAGCTCTGGAGG

FIGURE 2. ELEMENTS RANDOMISES

On effectuera ces constructions, en réalisant la technique PCR pour amplifier ces séquences à partir d'un oligonucléotide simple brin synthétique. On choisira un promoteur (bpFog) qui sera aussi amplifié et combiné aux enhancers avec des amorces spécifiques. Ensuite on adoptera les techniques de clonage Gateway BP et LR pour incorporer les séquences dans un plasmide qui possède le gène lac Z (rapporteur) et sera ainsi combiné au promoteur bpFOG et à l'enhancer.

Ensuite, on effectuera un séquençage des plasmides pour être assuré que les séquences d'intérêt soient présentes dans ceux-ci.

Pour terminer, on réalisera une électroporation pour insérer les plasmides qui possèdent les séquences d'intérêt dans les noyaux des embryons et on regardera l'activité des différents enhancers en suivant l'expression du gène lac Z dans la lignée neurale, au cours du développement embryonnaire.

2. Matériel et méthodes

Toutes les manipulations effectuées, matériel, méthodes et protocole ont été rédigés et sauvegardés dans un cahier de laboratoire individuel afin de pouvoir reproduire et poursuivre ces études dans l'intérêt de la recherche scientifique.

2.1. Amplification des fragments par PCR

2.1.1. Présentation des fragments d'intérêt.

Les oligonucléotides que l'on souhaite obtenir pour faire des études in vitro sont commandés chez Eurofins Genomic sous forme de simple brin. Voici la liste des oligonucléotides nécessaires :

Les 4 enhancers font 93 paires de bases :

- En vert, les séquences d'hybridation des amorces.
- En rouge, les séquences conservées des sites de fixation (ETS 1 : CGGAAG), pour les TBFs.
- En bleu, les séquences intermédiaires échangées.

aWT (séquence sauvage chez *Ciona intestinalis* non utilisée)

TTGTACAAAAAGCAGGCTCGTTATCTCTAA**CGGAAG**TTTTTCGAAAAGGAAATTG
TTCAATATTTAAGATAGGAAAGCTTCGTGTATTGTACC

aR_5_F (élément randomisé et déterminé sans activité)

TTGTACAAAAAGCAGGCTCGTTATCTG**CCGGAAGG****T**TGGGGGAAGGAAAGA
AACGGCGCGGCCAGATAGGT**AAGCTTCGTGTATTGTACC**

aR_19_F (élément randomisé et déterminé avec une forte activité)

TTGTACAAAAAGCAGGCTGCTTATCTAG**GCGGAAGG****A**AGCTCTGGAGGAAAAT
TGCAGTGGTGGGAGATAGTAA**AAGCTTCGTGTATTGTACC**

aR_5bg19_F (mutant)

TTGTACAAAAAGCAGGCTGCTTATCTAGGCGGAAGGTGCTCTGGAGGAAAAT
TGCAGTGGTGGGAGATAGTAAAGCTTCGTGTATTGTACC

➔ Séquence intermédiaires de aR_5_F insérées dans aR_19_F.

aR_19bg5_F (mutant)

TTGTACAAAAAGCAGGCTCGTTATCTGCGCGGAAGGATGGGGGAAGGAAAGA
AACGGCGCGGCCAGATAGGTAAAGCTTCGTGTATTGTACC

➔ Séquence intermédiaires de aR_19_F insérées dans aR_5_F.

Le promoteur bpFOG fait 220 paires de bases (en vert les séquences d'hybridation des amorces) :

AAGCTTCGTGTATTGTACCGGCCATTGTCAATCATGCAAACCTTGATATTATATTG
ACAAGAGAAGAAGGCAGTTTAAATTAAACTCTAAAGTAGAGAGACATTAATCT
CAGCTGACAAGGCAGGTGGTCACAGTAAGTTCATTTAAATAGTTGGCCAACAATA
GCCTTTCCAAGAAAGTATTTTTGTTCCAGGTCTATACAAAAATAACACACATAGC

Les 4 amorces font 19 paires de bases :

AttB1s-F

TTGTACAAAAAGCAGGCT ➔ amorce sens des 4 enhancers a

bpFOG-R

GGTACAATACACGAAGCTT ➔ amorce anti-sens des 4 enhancers a

bpFOG-F

AAGCTTCGTGTATTGTACC ➔ amorce sens du promoteur bpFOG

AttB2-R :

GTTTTATTGTGTGTATCG ➔ amorce anti-sens du promoteur bpFOG

2.1.2. Protocole d'amplification des fragments

Dans un premier temps, une fois que l'on a reçu les oligonucléotides, il est nécessaire de les resuspendre dans de l'eau, pour obtenir une concentration à 100 µM. On rajoute donc les quantités suivantes d'H2O :

- aR-5_F : nmol = 6,3 ➔ V(H2O) = 63 µl
- aR-19_F : nmol = 3,9 ➔ V(H2O) = 39 µl
- aR-5_bg_19 : nmol = 4,2 ➔ V(H2O) = 42 µl
- aR-19_bg_5 : nmol = 5,7 ➔ V(H2O) = 57 µl
- AttB1s-F: nmol = 37,5 ➔ V(H2O) = 375 µl
- bpFOG-F : nmol = 37 ➔ V(H2O) = 370 µl
- bpFOG-R : nmol = 33 ➔ V(H2O) = 330 µl

On possède déjà AttB2-R et le promoteur bpFOG à 100 µM.

La deuxième étape de l'amplification est la dilution des amorces et des matrices dans des tubes de 1,5 ml. On possède des solutions de départ à 100 μ M.

Pour les amorces, on souhaiterait obtenir une concentration à 5 μ M (dilution par 20). On prend donc 5 μ l de chaque amorce complémentaire que l'on introduit dans 90 μ L d'H₂O.

Pour les matrices, on effectue une dilution /10000 : On prend 1 μ l des matrices à 100 μ M que l'on dilue dans 100 μ l d'H₂O, puis 1 μ l de cette solution diluée que l'on introduit une fois de plus dans 100 μ l d'H₂O.

On termine par la dilution du promoteur bpFOG contenu dans un plasmide PSP72 (C=10ng/ μ l). On réalise une dilution /10 en prenant 11 μ l dans 100 μ l d'H₂O.

2.1.3. Préparation et programme PCR

On établit un ordre des tubes PCR (*tubes petit et fin, sensible aux changement de température durant le cycle*) :

- aR-5-F – aR-5_bg_19 – aR-19-F – aR-19_bg_5 – bpFOG

Mélange nécessaire à la réaction PCR pour un tube, (*le mélange s'effectue sur glace*) :

- 1 μ l enhancer à 100 μ M
- 5 μ l 10X RM (*réaction mix qui possède les dNTPs*)
- 3 μ l des amorces à 5 μ M
- 40,5 μ l d'H₂O
- 0,5 μ l Pfx DNA polymérase (*ajoutée à la fin du mélange*) à 2,5U/ μ l

➔ On réalise « un master mix » selon le nombre de tubes avec tous les éléments en commun de chaque ; seul les enhanceurs ou bpFOG ne sont pas en commun (*ici, il y a 5 tubes, on multiplie les valeurs par 5,5 pour avoir de la marge lorsque l'on transfère le master mix dans les tubes*). Le but étant d'avoir des tubes PCR de 50 μ l ; pour 1 μ l d'enhancer, on rajoute 49 μ l du mélange master mix dans chaque tube que l'on mélange préalablement à la pipette pour homogénéiser le glycérol des enzymes et H₂O.

Le programme PCR du thermocycleur lorsque l'on veut amplifier les 5 fragments est le suivant. L'amplification (étape 2 à 4), dure 35 cycles :

- Dénaturation 95°C - 2'
- Dénaturation 95°C – 15''
- Hybridation 55°C – 30''
- Elongation 68°C – 1'
- Elongation 68°C - 5'

2.1.4. Vérification de l'amplification PCR

La vérification de l'amplification des fragments s'effectue par électrophorèse (*migration des fragments sur gel analytique d'agarose*). On prépare un gel d'agarose 1,5% car nous avons des courtes séquences ; il faut donc un gel plus concentré (*varie entre 0,5 et 2%*). Il faut prendre 1,5 g d'agarose pour 100 ml de TAE 0,5X, (*tampon nécessaire à la migration*), que l'on chauffe au micro-ondes jusqu'à l'impidité du mélange. On rajoute ensuite 5 μ l de gel red (*intercalant pour visualiser l'ADN*).

Une fois que l'on a coulé le gel dans un moule, on prépare les produits PCR à la migration :

- 5µl de produits PCR
- 5µl H₂O
- 2µl Loading Dye (6X) (*marqueur pour la migration*)
- ➔ 12 µl total pour un puits

+ 3µl de Gene Ruler blue (100 pb) (*échelle de migration dans un premier puits qui va migrer en faisant plusieurs bandes de tailles différentes.*)

Une fois les 5 solutions préparées et insérées dans les puits lorsque le gel est plongé dans le tampon TAE 0,5X, la migration s'effectue du pôle négatif au pôle positif (*ADN possède une charge négative*).

2.1.5. Purification des fragments PCR – Fixation de l'ADN sur colonne

On transfère la totalité des 45µl restant des tubes PCR pour chaque fragment dans des tubes de 1,5ml. On réalise ensuite le protocole de nettoyage de l'ADN : « PCR – purification Kit QI Aquick » :

La première étape est de rajouter 250µl d'un tampon (PB) qui permet de fixer l'ADN à la colonne. On centrifuge pendant 1 minute pour éliminer le mélange de réaction qui se retrouve au fond du tube. On ajoute ensuite, le tampon de rinçage (PE) qui permet de laver les dernières impuretés de l'ADN dans la membrane. On centrifuge 1 min pour éliminer le tampon puis une deuxième fois pour sécher la membrane.

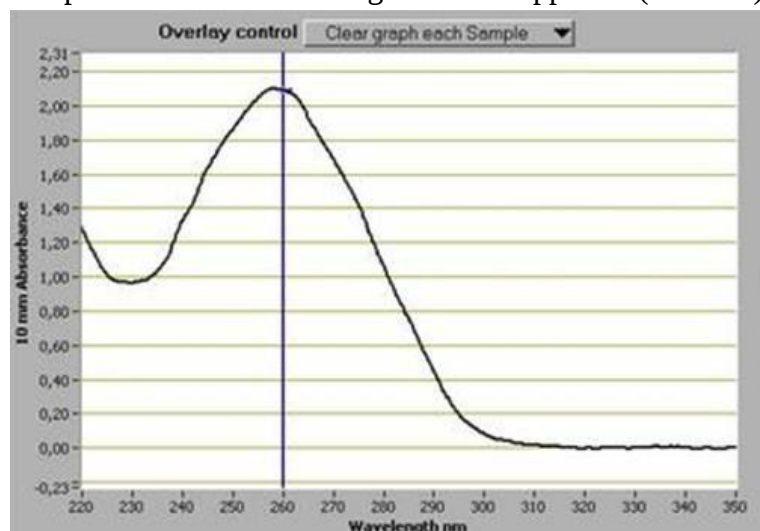
On transfère les colonnes dans des tubes de 1,5 ml, on ajoute 50µl d'H₂O au centre de la membrane puis on centrifuge 1 minute pour récupérer l'ADN dans le fond des tubes.

2.1.6. Densité optique via le Nanodrop

L'étape de purification est très importante car elle permet de réaliser une densité optique grâce au Nanodrop pour calculer la concentration de chaque fragment et poursuivre l'étude (*notamment pour les dilutions à suivre dans les prochaines PCR*).

Le Nanodrop fonctionne par spectrophotométrie UV. Il permet de travailler avec de très petites quantités pour éviter les pertes (1 à 2µl) et va mesurer la concentration grâce à l'ADN présent qui absorbe à 260nm. Il vérifie aussi la pureté des échantillons grâce à un rapport R (260/280) qui doit être proche de 2 ; sinon c'est qu'il y a présence de protéines et que la purification a mal été effectuée.

FIGURE 3. COURBE ABSORPTION TYPIQUE D'ADN OBTENUE AVEC NANODROP



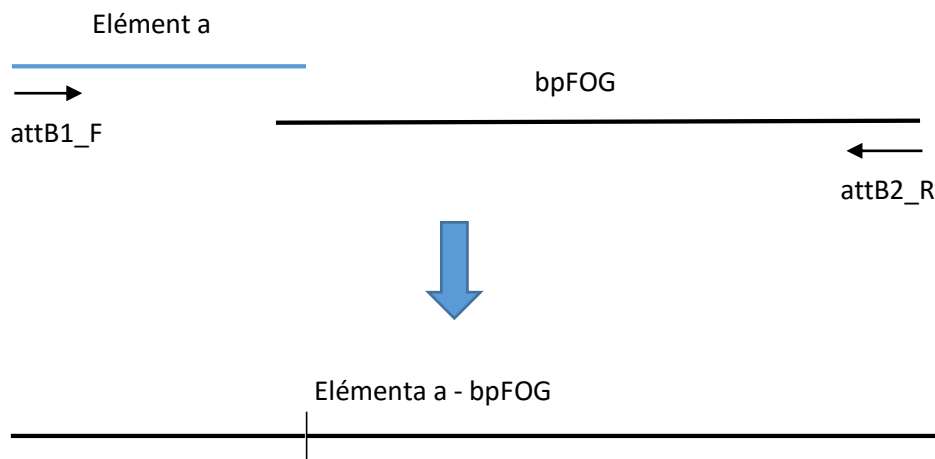
2.1.7. Union des enhanceurs avec promoteur bpFOG

Une deuxième PCR va nous permettre d'unir à chaque fragment enhancer le promoteur bpFOG ; celui-ci ne peut être activé que par un enhancer lors de la transcription.

On cherche une dilution à 0,2 ng/μl pour les enhanceurs désormais double brin et à 0,436ng/μl pour bpFOG aussi double brin car il possède un poids moléculaire 2,36X plus grand que les enhanceurs. Pour trouver le volume d'H2O qu'il faut ajouter pour obtenir nos dilutions, on regarde les valeurs des concentrations des fragments obtenus à la première amplification (pour 1μl de matrice) :

- aR-5 : $C=14,66/0,2 \rightarrow V(H_2O) = 73,3\mu l$
- aR-19 : $C=9,14/0,2 \rightarrow V(H_2O) = 45,7\mu l$
- aR-5_bg_19 : $C=9,74/0,2 \rightarrow V(H_2O) = 48,7\mu l$
- aR-19_bg_5 : $C=9,62/0,2 \rightarrow V(H_2O) = 48,1\mu l$
- bpFOG : $C=38,65/0,436 \rightarrow V(H_2O) = 88\mu l$

La dilution des amorces ne change pas et reste la même que dans la première PCR (0,1ng/μl) ; cependant, afin d'unir le promoteur avec l'enhancer, il est nécessaire de supprimer 2 amorces : bpFOG_F et bpFOG_R afin de laisser la synthèse se faire en continu de l'enhancer au promoteur avec attB1_F et attB2_R :



Mélange PCR-2 pour un tube (50μl) : (faire un master mix X4,5)

- 1μl enhancer à 0,2 ng/μl
- 1μl bpFOG à 0,436 ng/μl
- 5μl 10X RM (réaction mix qui possède les dNTPs)
- 3 μl des 2 amorces (attB1s et attB2-R) à 5μM
- 39,5 μl d'H2O
- 0,5 μl Pfx DNA polymérase (ajoutée à la fin du mélange) à 2,5U/μl

Programme PCR-2 (35 cycles pour les étapes 2-4) :

- Dénaturation 95°C - 2'

- Dénaturation 95°C – 15’’
- Hybridation 55°C – 30’’
- Elongation 68°C – 1’
- Elongation 68°C - 5’

Préparation migration des fragments (enhancer-promoteur bpFOG) sur gel d’agarose 1,5%.

- 5µl de matrice du tube PCR (enhancer-promoteur)
- 5µl H₂O
- 2µl Loading Dye (6X) (*marqueur pour la migration*)
- ➔ 12 µl total pour un puits

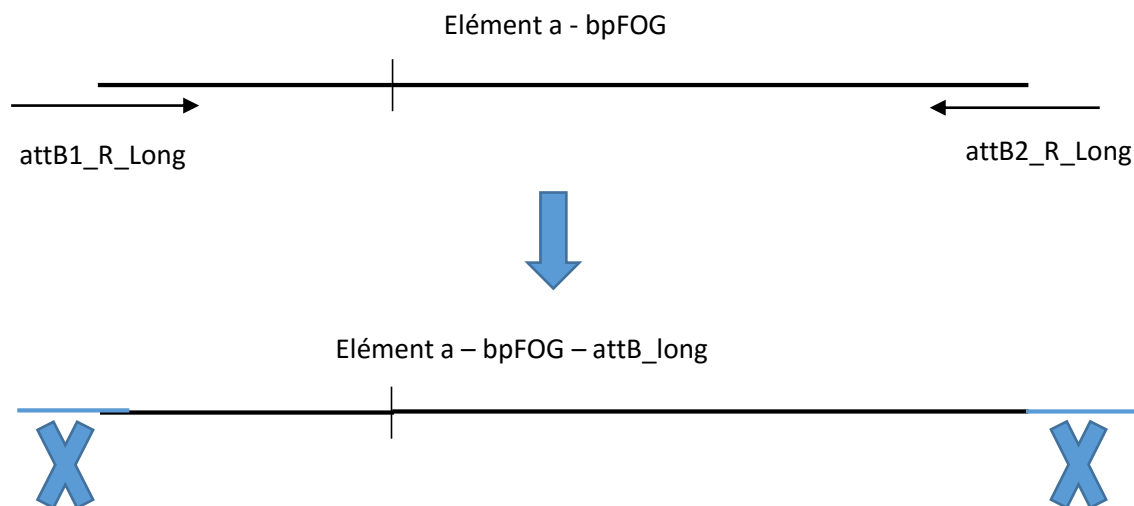
+ 3µl de Gene Ruler blue (100 pb) (*échelle de migration dans un premier puits qui va migrer en faisant plusieurs bandes de tailles différentes*).

Purification des fragments PCR (cf. 2.1.5)

Détermination des concentrations via densité optique. (cf.2.1.6)

2.1.8. Ajout de séquence de recombinaison par PCR

Il est nécessaire d’ajouter deux séquences plus longues que les séquences de fixation des amorces aux extrémités 3’ et 5’, pour obtenir un fragment enhancer-promoteur-attB_Long (*séquence d’intérêt*), qui pourra s’insérer par recombinaison dans un plasmide lors de l’étape de clonage. On utilise une troisième fois la technique PCR pour ajouter ces séquences.



Les dilutions des matrices sont encore différentes pour cette troisième PCR. L’ADN est toujours double brin mais cette fois est d’une longueur de 313pb (enhancer-bpFOG). On souhaite donc obtenir une concentration à 0,636ng/µl au lieu de 0,2ng/µl. On regarde les concentrations déterminées par le Nanodrop pour rajouter le volume d’eau pour 1µl de matrice :

- aR-5-bpFOG : $C=67,96/0,636 \rightarrow V(H_2O) = 106,9\mu l$
- aR-19-bpFOG : $C=47,68/0,636 \rightarrow V(H_2O) = 75\mu l$
- aR-5_bg_19-bpFOG : $C=45,13/0,636 \rightarrow V(H_2O) = 71\mu l$
- aR-19_bg_5-bpFOG : $C=47,61/0,636 \rightarrow V(H_2O) = 74,85\mu l$

La dilution des amorces reste la même que lors des deux expériences précédentes c'est à dire 0,1ng/μl. Cependant, on doit changer d'amorces en prenant cette fois-ci attB1s_long et attB2-R_long qui ont une séquence de nucléotides plus longue, en plus des séquences complémentaires aux matrices à leur extrémité :

AttB1_Long

GGGGACAAGTTGTACAAAAAGCAGGCT → amorce sens 29pb.

AttB2_Long

GGGGACCACTTGTACAAGAAAGCTGGGT → amorce anti-sens 29pb.

(En rouge les séquences d'intérêt rajouter pour la recombinaison).

Mélange PCR-3 pour un tube (50μl) : (faire un master mix X3,5)

- 1μl enhancer-bpFOG à 0,636 ng/μl
- 5μl 10X RM (réaction mix qui possède les dNTPs)
- 3 μl des 2 amorces (attB1s_Long et attB2-R_Long) à 5μM
- 40,5 μl d'H₂O
- 0,5 μl Pfx DNA polymérase (ajoutée à la fin du mélange) à 2,5U/μl

Programme PCR-3 (35 cycles pour les étapes 2 à 4) :

- Dénaturation 95°C - 2'
- Dénaturation 95°C – 15''
- Hybridation 55°C – 30''
- Elongation 68°C – 1'
- Elongation 68°C - 5'

Préparation migration des fragments (enhancer-promoteur bpFOG-attB_L) sur gel d'agarose 1,5%.

- 5μl de matrice du tube PCR (enhancer-promoteur-attB_L)
- 5μl H₂O
- 2μl Loading Dye (6X) (marqueur pour la migration)
- ➔ 12 μl total pour un puits
- + 3μl de Gene Ruler blue (100 pb) (échelle de migration dans un premier puits qui va migrer en faisant plusieurs bandes de tailles différentes.)

Purification des fragments PCR (cf. 2.1.5)

Détermination des concentrations via densité optique. (Cf. résultats)

2.2. Clonage par système Gateway

Le but du clonage par système Gateway est d'insérer une séquence souhaitée grâce à une enzyme clonase, dans un plasmide dit « vecteur d'entrée » pour la première étape. Ce plasmide possède un gène cassette qui peut se recombiner avec cette séquence souhaitée qui formera l'entry clone. Dans un deuxième temps, on effectue une deuxième recombinaison entre le vecteur d'entrée et un plasmide qui est dit « vecteur d'expression » qui contient le gène que l'on souhaite exprimer avec notre séquence d'intérêt.

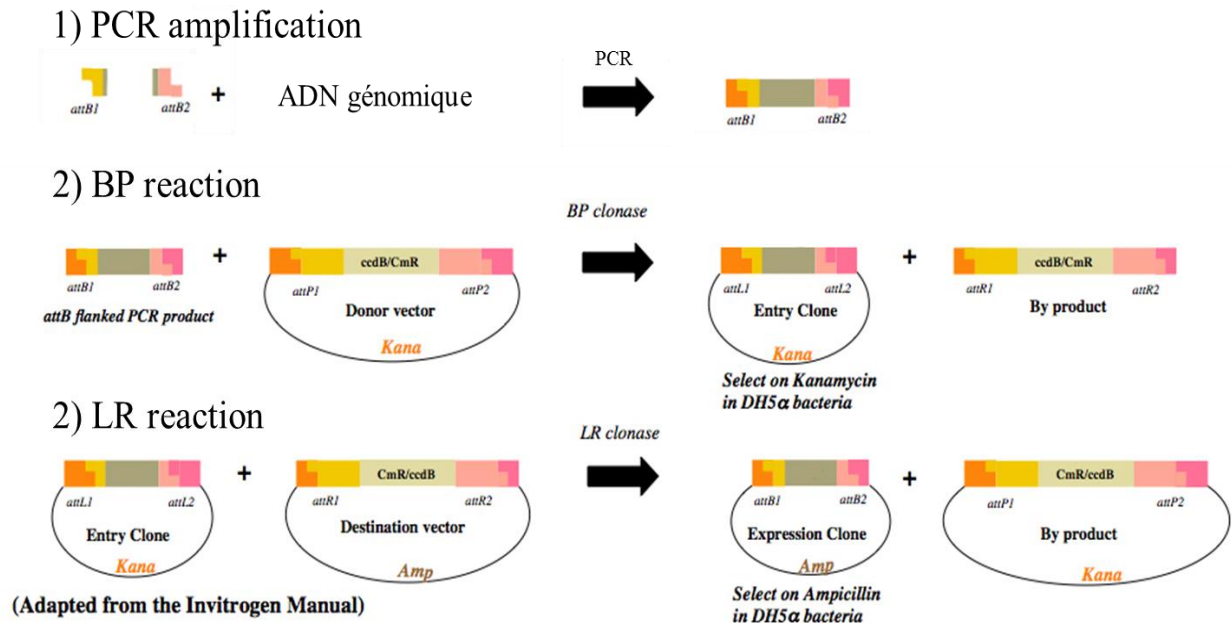


FIGURE 4. DEROULEMENT CLONAGE BY GATEWAY SYSTEM

2.2.1. BP réaction

La BP réaction est la première étape du clonage par système Gateway. Elle consiste à insérer les séquences enhanceurs-bpFOG-attB_L dans un vecteur d'entrée qui est le plasmide pDONOR et permet à la bactérie qui le possède de résister à un antibiotique la Kanamycine après recombinaison. Pour cela, il faut procéder à la dilution des séquences.

On souhaite obtenir 50fmol pour chaque ADN. Une formule nous permet de trouver les ng d'ADN nécessaires pour obtenir ces 50fmol :

$$ng \text{ of DNA} = \frac{(x \text{ fmol}) * (N) * ((660 \text{ fmol} * 1 \text{ ng}))}{(1 \text{ fmol} * 10^6)}$$

x= nombre de fmol désirés.

N= taille de l'ADN en pb.

ng d'ADN pour les 4 séquences de 342pb = 11,286

ng d'ADN pour le plasmide pDONOR à 4762pb = 157,146

Ensuite, il faut procéder à la dilution des séquences en fonction des valeurs de ng d'ADN trouvés pour obtenir 50fmol :

- aR-5-bpFOG-attB_L : C=78,73/11,286 → V(H₂O) = 7μl
- aR-19-bpFOG-attB_L : C=71,82/11,286 → V(H₂O) = 6,4μl
- aR-5_bg_19-bpFOG-attB_L : C=69,63/11,286 → V(H₂O) = 6,2μl
- aR-19_bg_5-bpFOG-attB_L : C=52,03/11,286 → V(H₂O) = 4,6μl

Le plasmide pDONOR n'a pas besoin d'être dilué car il est déjà à 150ng/μl et que l'on a calculé son poids à 157,146.

Mélange de la BP réaction :

- 1μl de la séquence diluée

- 1µl du plasmide pDONOR qui accueille les séquences
- 2µl 5XRM BP Reaction buffer
- 5µl TE (Tris et EDTA) tampon qui stabilise l'ADN
- 1µl de BP clonase qui est l'enzyme qui va effectuer la recombinaison

On laisse ensuite la réaction s'effectuer à 25°C pendant 4 heures.

La transformation de la réaction BP s'en suit ; elle consiste à introduire le plasmide qui possède désormais notre séquence dans une bactérie modifiée d'*E-Coli* non virulente DH5α. On ajoute d'abord 1µl de PK à 2µg/µl pendant 10 min à 37°C afin d'inactiver la BP clonase et stopper la réaction.

On prend ensuite 2µl de la BP réaction que l'on met dans 20µl de DH5α. On incube le tout 30 min dans la glace.

Il est nécessaire d'effectuer un choc thermique afin d'insérer le plasmide dans la bactérie à 42°C pendant 30 secondes et de remettre ensuite dans la glace 2 min.

La dernière étape est d'utiliser le SOC medium qui est utilisé lors de la dernière étape de la transformation des cellules bactériennes afin de produire la résistance à la Kana avant de les étaler sur milieu sélectif.

On étale ensuite les 4 mélanges avec les quatre séquences souhaitées sur 4 boîtes de Pétri Kanamycine à l'aide de billes que l'on laisse incuber dans une salle à 37°C toute la nuit afin d'être sûr que les bactéries qui se développent possèdent les plasmides avec les séquences.

Une fois les colonies obtenues sur boîtes de Pétri, on effectue une PCR sur colonie afin de vérifier la présence de la séquence, dans le plasmide bactérien, souhaitée. En parallèle, on construit des tubes de culture afin de multiplier les bactéries, récupérer l'ADN et estimer la concentration via Nanodrop dans le but d'effectuer la réaction LR.

PCR sur colonies : On décide de prendre 2 colonies par culture pour valider la présence des séquences lors de l'amplification.

Mélange PCR sur colonie :

- 10µl Quick Load Taq 2X M.Mq
- 2µl primer mix attB_Long (1, 2)
- 8µl d'H₂O

Préparation tube PCR :

Ordre des tubes : aR-5_F_attBL(c1) - aR-5_F_attBL(c2) aR-5bg19_F_attBL(c1) - aR-5bg19_F_attBL(c2) - aR-19_F_attBL(c1) - aR-19_F_attBL(c2) - aR-19bg5_F_attBL(c1)

Dans le mélange PCR, on introduit à l'aide d'un cône une partie de la colonie récoltée avec celui-ci puis l'on insère le cône directement dans le tube PCR.

Programme PCR : (30 cycles étape 2 à 4)

- Dénaturation 5' → 95°C → non répétée dans les cycles
- Dénaturation 30' à 95°C
- Hybridation 30'' à 50°C
- Elongation 1' à 68°C
- Elongation 10' à 68°C → non répétée dans les cycles.

Vient ensuite la migration des fragments sur gel d'agarose pour vérifier la présence des séquences.

Préparation migration des fragments sur gel d'agarose 1,5%.

- 5µl de matrice du tube PCR (enhancer-promoteur-attB_L dans le vecteur pDONOR)
- 5µl H₂O
- 2µl Loading Dye (6X) (*marqueur pour la migration*)
- ➔ 12 µl total pour un puits
+ 3µl de Gene Ruler blue (100 pb) (*échelle de migration dans un premier puits qui va migrer en faisant plusieurs bandes de tailles différentes.*)

En parallèle, on construit des tubes de culture ; c'est-à-dire que l'on prend un tube de 15ml où l'on va ajouter 2ml de milieu LB/Kanamycine. Le milieu LB/Kana se construit avec une dilution par 1000 ; on ajoute 100µl d'antibiotique kanamycine pour sélectionner les clones dans 100ml de milieu LB enrichi pour le développement des bactéries.

On reprend un cône qu'on pique dans les colonies des boîtes de Pétri et que l'on place dans les 2ml du tube.

On construit 7 tubes identiques au tube PCR précédent pour être sûr qu'on garde les mêmes constructions afin de poursuivre le clonage.

On place ensuite ces tubes à 37°C sur un plateau tournant toute la nuit pour accélérer le développement des clones.

Purification des plasmides :

On réalise la purification des plasmides à partir du protocole : « Pure link quick plasmid DNA miniprep kit », afin de récupérer les plasmides bactériens qui contiennent les séquences, effectuer un séquençage pour vérifier la présence des séquences souhaitées et ensuite déterminer la concentration en ADN des plasmides.

On transfère dans un premier temps les 2ml des tubes de culture dans des tubes de 2ml et on centrifuge 1min à 20°C 17000x.

Les bactéries se retrouvent au fond du tube ; on élimine le reste du tube. On rajoute 250µl de tampon R3 et L7 pour lyser les bactéries avant de resuspendre le mélange à la pipette et attendre 5min. On ajoute ensuite un tampon N4 qui va précipiter l'ADN bactérien et la membrane des bactéries avant de centrifuger une nouvelle fois 10min dans les mêmes conditions afin de séparer les déchets bactériens et les plasmides.

On transfère ensuite les plasmides sur colonne en ajoutant un tampon W9, (700µl), qui va permettre de nettoyer les dernières impuretés présentes dans les plasmides en centrifugeant 1min. Les plasmides sont fixés sur la colonne ; on rajoute 75µl de TE Buffer au centre de la membrane pour resuspendre les plasmides et les récupérer en centrifugeant 2min afin de déterminer la concentration pour poursuivre avec la réaction LR et pour le premier séquençage.

Séquençage :

Pour séquencer, on cherche une concentration à 1µg DNA pour 15µl H₂O pour un séquençage optimal. A partir des concentrations obtenues par D.O., grâce à cette formule : $\frac{1000}{C(D.O.)}$, on obtient le volume d'ADN pour 1ng et on ajoute le volume d'H₂O pour arriver à 15µl. On pourra aligner les résultats des séquences ensuite grâce au logiciel Seaview.

2.2.2. Réaction LR

La réaction LR a pour but de recombinaison l'entry_clone contenant les séquences souhaitées avec un vecteur de destination pRFB résistant cette fois à l'ampicilline après recombinaison pour sélectionner les bactéries. Pour cela, il faut procéder à la dilution des séquences.

On souhaite obtenir 10fmol pour chaque ADN. Une formule nous permet de trouver les ng d'ADN nécessaire pour obtenir ces 50fmol :

$$ng\ of\ DNA = \frac{(x\ fmol) * (N) * ((660fmol * 1ng))}{(1fmol * 10^6)}$$

x= nombre de fmol désirés.

N= taille de l'ADN en pb.

ng d'ADN pour le plasmide pDONOR à 2689pb (4762-2415+342) = 17,75

ng d'ADN pour le plasmide pRFB à 7762pb = 51,25

Ensuite, il faut procéder à la dilution des séquences en fonction des valeurs de ng d'ADN trouvés pour obtenir 10fmol :

- pRFB : C=150/51.25 → V(H₂O) = 3μl
- aR-5-pDONORc1 : C=67,7/17,75 → V(H₂O) = 3,82μl
- aR-5-pDONORc2 : C=97,5/17,75 → V(H₂O) = 5,43μl
- aR-19-pDONORc1 : C=73,9/17,75 → V(H₂O) = μl
- aR-19-pDONORc2 : C=92,5/17,75 → V(H₂O) = 6,4μl
- aR-5_bg_19-pDONORc1 : C=100,7/17,75 → V(H₂O) = 5,68μl
- aR-5_bg_19-pDONORc2 : C=67,5/17,75 → V(H₂O) = 3,80μl
- aR-19_bg_5-pDONOR : C=107,6/17,75 → V(H₂O) = 6,06μl

Mélange de la BP réaction :

- 1μl de la séquence-pDONOR
- 1μl du plasmide pRFB qui accueille les séquences
- 2μl LR Reaction buffer
- 5μl TE buffer (Tris et EDTA) tampon qui stabilise la réaction
- 1μl de LR clonase qui est l'enzyme qui va effectuer la recombinaison

On laisse ensuite la réaction s'effectuer à 25°C pendant 4 heures.

Transformation LR : La transformation LR suit le même protocole que la réaction BP pour effectuer la recombinaison entre l'entryclone et le vecteur de destination.

Une fois les colonies obtenues sur boîtes de Pétri, on effectue une PCR sur colonie afin de vérifier la présence de la séquence, dans le plasmide bactérien, souhaitée comme pour la réaction BP.

PCR sur colonies : On décide de prendre 2 colonies par culture pour valider la présence des séquences lors de l'amplification.

Mélange PCR sur colonie :

- 10μl Quick Load Taq 2X M.Mq
- 2μl primer mix attB_Long (1, 2)
- 8μl d'H₂O

Préparation tube PCR :

Ordre des tubes : aR-5_LR(c1) - aR-5_LR (c2) aR-5bg19_LR(c1) - aR-5bg19_LR (c2) - aR-19_LR (c1) - aR-19_LR (c2) - aR-19bg5_LR (c1) - aR-19bg5_LR (c2).

Dans le mélange PCR, on introduit à l'aide d'un cône une partie de la colonie récoltée avec celui-ci puis l'on insère le cône directement dans le tube PCR.

Programme PCR : (30 cycles)

- Dénaturation 5' → 95°C → non répétée dans les cycles
- Dénaturation 30' à 95°C
- Hybridation 30'' à 50°C
- Elongation 1' à 68°C
- Elongation 10' à 68°C → non répétée dans les cycles.

Vient ensuite la migration des fragments sur gel d'agarose pour vérifier la présence des séquences.

Préparation migration des fragments sur gel d'agarose 1,5%.

- 5µl de matrice du tube PCR (enhancer-promoteur-attB_L dans le vecteur pDONOR)
- 5µl H₂O
- 2µl Loading Dye (6X) (*marqueur pour la migration*)
- ➔ 12 µl total pour un puits
+ 3µl de Gene Ruler blue (100 pb) (*échelle de migration dans un premier puits qui va migrer en faisant plusieurs bandes de tailles différentes.*)

En parallèle, on construit des tubes de culture ; c'est-à-dire que l'on prend un tube de 15ml où l'on va ajouter 2ml de milieu LB/Ampicilline cette fois ci. Le milieu LB/Amp se construit avec une dilution par 1000 ; on ajoute 100µl d'antibiotique ampicilline pour sélectionner les clones dans 100ml de milieu LB enrichi pour le développement des bactéries.

On reprend un cône qu'on pique dans les colonies des boîtes de Pétri et que l'on place dans les 2ml du tube.

On construit 8 tubes identiques au tube PCR précédent pour être sûr qu'on garde les mêmes constructions afin de poursuivre le clonage.

On place ensuite ces tubes à 37°C sur un plateau tournant toute la nuit pour accélérer le développement des clones.

Purification des plasmides :

On réalise la purification des plasmides à partir du protocole : « Pure link quick plasmid DNA miniprep kit », comme dans la BP réaction afin de pouvoir calculer la concentration, effectuer un séquençage afin d'être sûr que nos séquences ont été conservées lors de la recombinaison LR et ensuite préparer des maxiprep pour obtenir une très forte concentration d'ADN lors de l'électroporation.

Le séquençage de la réaction LR s'effectue comme dans la BP réaction.

Préparation Maxiprep :

On commence par prendre un erlenmeyer de 1000ml. On ajoute 200ml de milieu (LB/Amp) préparer en amont avec 200µl de bactéries sauvegardées en amont de la purification.

On laisse incuber toute la nuit à 37°C sur plateau tournant. La solution doit devenir trouble qui montre le développement des bactéries sélectionnées possédant les séquences.

Purification des plasmides obtenus à partir des Maxipreps :

Ordre de préparation :

- aR-5_LR(c1) - aR-5_LR (c2) - aR-5bg19_LR(c1) - aR-5bg19_ LR (c2) - aR-19_ LR (c1) - aR-19_ LR (c2) - aR-19bg5_ LR (c1) - aR-19bg5_ LR (c2).

On commence par transvaser les 200ml de l'erlenmeyer dans des bouteilles plastiques qui peuvent être centrifugées 10min à 4°C – 5000 RPM.

On enlève ensuite l'agent, en conservant le culot de bactéries présent dans la bouteille.

On le suspend dans 12ml du tampon S1+Rnase puis dans 12ml du tampon S2 afin de lyser les bactéries et dans 12ml de tampon S3 pour détruire l'ADN bactérien et la membrane.

On laisse ensuite dans la glace 5min afin de préparer l'équilibre des colonnes grâce à 6ml de tampon buffer N2.

On centrifuge ensuite nos bouteilles 10min à 4°C – 5000 RPM.

On ajoute un filtre à la colonne pour éliminer les plus grosses impuretés lorsque l'on transvase le contenu de la bouteille pour récupérer les plasmides sur une grosse membrane.

On lave cette membrane pour éliminer les petites impuretés grâce à 32ml de tampon buffer N3. Il faut ensuite éluer, c'est-à-dire transférer les plasmides dans le tube en rajoutant 15ml de buffer N5.

On ajoute 11ml d'isopropanol qui va permettre de précipiter l'ADN. On effectue une nouvelle centrifugation de 30 minutes à 4000 RPM 4°C afin de former un culot d'ADN concentré.

On termine par laver l'ADN à l'éthanol 70%, en centrifugeant 10min. On enlève ensuite l'éthanol en gardant le précipité d'ADN.

On peut estimer ensuite la concentration en ADN par densité optique pour chaque préparation afin de pouvoir effectuer les électroporation dans les embryons d'Ascidies.

2.3. Electroporation

L'électroporation est une méthode d'introduction d'ADN dans des cellules. Techniquement, on applique un champ électrique sur les membranes qui sont ainsi perméabilisées. Avant de commencer l'électroporation, il faut s'assurer que les quatre constructions possèdent la même concentration qui est choisi à 1mg/ml. La dilution se fait par le tampon TE buffer pour stabiliser l'ADN afin de le conserver :

- aR-5_LR(c1) : C=1648ng/ml → V(TE buffer)=64,8µl dans 100µl d'ADN

- aR-5bg19_LR(c1) : C=2177ng/ml → V(TE buffer)=117µl dans 100µl d'ADN

- aR-19_ LR (c1) : C=1931ng/ml → V(TE buffer)=93µl dans 100µl d'ADN

- aR-19bg5_ LR (c1) : C=1443ng/ml → V(TE buffer)=44µl dans 100µl d'ADN

On ajoute la construction de la séquence sauvage (WT : wild type) à 1mg/ml que l'on possède déjà afin d'obtenir un contrôle positif lors de l'électroporation.

2.3.1. Protocole électroporation

On commence par choisir 4 animaux contenant des œufs et du sperme. Les ascidies sont hermaphrodites mais il est préférable de faire une fécondation croisée pour être sûr du développement des embryons. Il est très important aussi avec la pipette de récolter les œufs et le sperme séparé car la frontière entre les deux tissus est fine et fragile.

On prépare 4 tubes à essai de 15ml d'eau de mer synthétique pour les œufs de chacun des animaux et un tube de 1,5ml dans la glace pour conserver le sperme le temps de la manipulation.

Après avoir extrait les œufs et mis dans les tubes, on centrifuge pour qu'il se retrouve au fond du tube. On rince ensuite une première fois en enlevant l'eau de mer sans toucher au culot d'œufs (*ce qui permet aussi d'enlever les œufs en mauvais état qui flottent*), puis on rajoute de l'eau de mer dans le tube.

On rince une nouvelle fois puis on rajoute de l'eau contenant un antibiotique la gentamicine afin d'éviter la contamination des œufs.

On étale les œufs de chaque préparation sur quatre boîtes d'agarose à l'eau de mer pour la fécondation.

Activation du sperme : Dans un tube de 1,5ml, ajouter 1ml d'eau de mer avec gentamicine puis 50µl Tris pH 9,5. On prend ensuite 20µl de sperme prélevé au départ que l'on rajoute dans la solution. On resuspend bien le mélange à la pipette pour enlever l'épaisseur du sperme.

On vérifie que le sperme est actif à la loupe binoculaire. On ajoute ensuite 150µl de préparation dans chacune des 4 boîtes.

La fécondation s'effectue durant 10min. Pendant ce temps, on prépare une solution de déchoriation, car les embryons de *Ciona intestinalis* possèdent un chorion qui protège l'œuf. Pour l'électroporation l'œuf doit être déchorioné afin d'insérer les plasmides contenant les séquences, dans les noyaux des cellules.

Cette solution est déjà préparée au laboratoire et est ajoutée à 80µl de NaOH (Soude) à 2,5M afin de pouvoir colorer en jaune la déchoriation et savoir quand s'arrêter pour ne pas éclater les œufs lorsque l'on mélange à la pipette après avoir ajouté 4ml de la solution par tube.

Une fois vérifié à la loupe binoculaire que les œufs sont déchorionés, on rajoute 10ml d'eau de mer gentamicine puis on centrifuge pour regrouper les œufs et enlever l'agent de déchoriation. On rince ensuite à l'eau de mer-G.

Vient ensuite la préparation des ADN pour l'électroporation. On prélève 50µl d'une préparation à 1mg/ml où l'on ajoute 200µl de mannitol.

En parallèle on regroupe tous les œufs des 4 préparations afin de les séparer en 5 préparations par rapport au nombre des séquences que l'on veut tester y compris le wild type ; on injecte 100µl d'embryon par tube de 1,5ml puis on ajoute les 250µl de préparation ADN+mannitol.

On place ensuite la préparation (ADN+mannitol+embryon) dans une cuve spéciale pour subir un choc électrique de 50V pendant 16msec. Le temps entre la fécondation et l'électroporation est d'une heure.

Ordre des préparations :

- aR-5_LR(c1)+mannitol+embryon
- aR-5bg19_LR(c1)+mannitol+embryon
- aR-19_LR(c1)+mannitol+embryon
- aR-19bg5_LR(c1)+mannitol+embryon
- (WT)+mannitol+embryon

On place ensuite chaque préparation electroporée dans un boite d'agarose à l'eau de mer afin de laisser le développement des embryons jusqu'au stade 110 cellules, (gastrula), (cf. Annexe1), à 22°C pendant 4h.

2.3.2. Fixation des embryons :

Il est nécessaire de fixer les embryons au stade 110 cellules afin de colorer les cellules concernées par le système nerveux central et observer l'expression de la β galactosidase en fonction des séquences de l'enhancer a qui régule le gène *Otx*.

Pour cela on utilise du glutaraldéhyde dans de l'eau de mer à (8 μ l/ml $\rightarrow$ 25%) par préparation que l'on laisse incuber 15 à 30 min sans dépasser ce temps qui pourrait dégrader la protéine β gal.

On rince ensuite dans du PBT (2X pour être certain d'enlever le glutaraldéhyde toxique), puis au Staining buffer (solution qui va accueillir le Xgal à 10 μ l/ml pour chaque solution pour colorer les cellules en bleu qui contiennent de la β galactosidase. On laisse incuber toute la nuit à 37°C.

Le lendemain, on rince au PBT puis on effectue une post-fixation au formaldéhyde. Pour terminer, on rince au PBT 2X afin de stabiliser les embryons pour les conserver à 4°C.

2.3.3. Expression attendue du Wild Type selon la thèse :

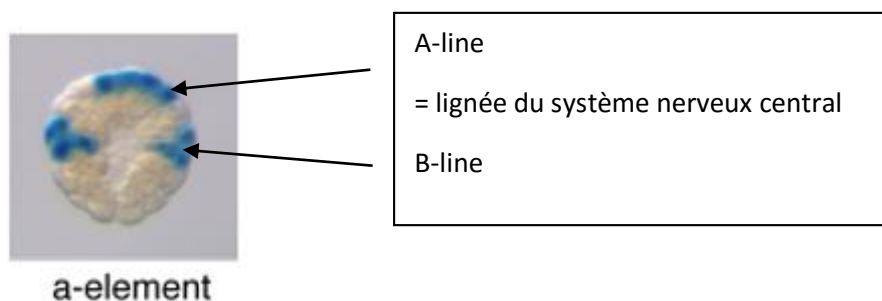


FIGURE 5. EXPRESSION ATTENDUE WILD TYPE AU STADE 110 CELLULES

Après des résultats insatisfaisants, (cf. résultats), lors de la première électroporation, l'équipe a discuté du protocole et a choisi de changer le temps du développement des embryons à 18°C au lieu de 22°C, de réduire le temps entre la fécondation et l'électroporation à 40min et de surveiller le temps de coloration finalement réduit à deux heures au lieu de toute une nuit.

3. Résultats – Discussion

3.1. Résultats PCR amplification des 5 fragments

Migration des fragments sur gel d'agarose analytique 1,5% - résultat après rayonnement UV :

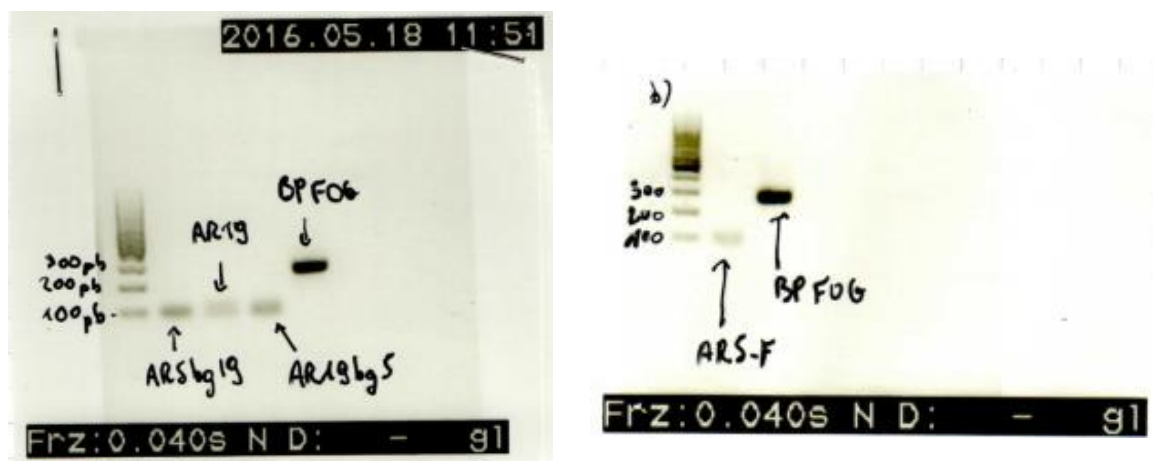


FIGURE 6. RESULTAT DE L'AMPLIFICATION PCR, PAR RAYONNEMENT UV DU GEL DE MIGRATION

Les résultats observés sont corrects ; on voit que les tailles des enhancers se trouvent aux alentours de 100 pb (93pb) et que le promoteur se trouve entre 200 et 300 pb (220pb).

Concentration déterminées des fragments d'ADN par densité optique :

Enhancers et bpFOG	C (ng/μl)	R (260/280)
aR-5-F	14,66	1,73
aR-5_bg_19	9,74	2,05
aR-19-F	9,14	1,60
aR-19_bg_5	9,62	1,40
bpFOG	38,65	1,83

TABEAU 1. CONCENTRATIONS ET RAPPORTS (ADN/PROTEINE) DETERMINES PAR DENSITE OPTIQUE

Les résultats sont acceptables malgré une concentration assez faible des fragments et une valeur de rapport de 1,40 pour aR-19_bg_5 qui montre une purification moins bonne que les autres fragments. Cela peut tout de même nous permettre de continuer et d'effectuer la 2^{ème} PCR afin d'unir le promoteur et l'enhancer.

3.2. Résultats PCR amplification enhancer-promoteur liés

Migration des fragments sur gel d'agarose analytique 1,5% - résultat après rayonnement UV :



FIGURE 7. RESULTATS AMPLIFICATION PCR UNION ENHANCER-PROMOTEUR

L'amplification PCR a fonctionné. Les résultats attendus sont présents sur cette migration. On s'attendait à des bandes aux alentours de 300pb, (la taille réelle est de 313pb).

Concentration déterminées des fragments d'ADN par densité optique :

Enhancers-bpFOG	C (ng/μl)	R (260/280)
aR-5-bpFOG	67,96	1,81
aR-5_bg_19-bpFOG	45,15	1,74
aR-19-F-bpFOG	47,68	1,84
aR-19_bg_5-bpFOG	47,61	1,85

TABLEAU 2. CONCENTRATIONS ET RAPPORTS (ADN/PROTEINE) DETERMINES PAR DENSITE OPTIQUE

Les résultats sont tout à fait acceptables. On voit que les rapports sont proches de 2 ; ce qui signifie que l'ADN a bien été purifié. Cela peut nous permettre de continuer et d'effectuer la 3^{ème} PCR afin d'ajouter des séquences d'intérêt pour le clonage.

3.3. Résultats PCR ajout des séquences d'intérêt attB_L

Migration des fragments sur gel d'agarose analytique 1,5% - résultat après rayonnement UV :

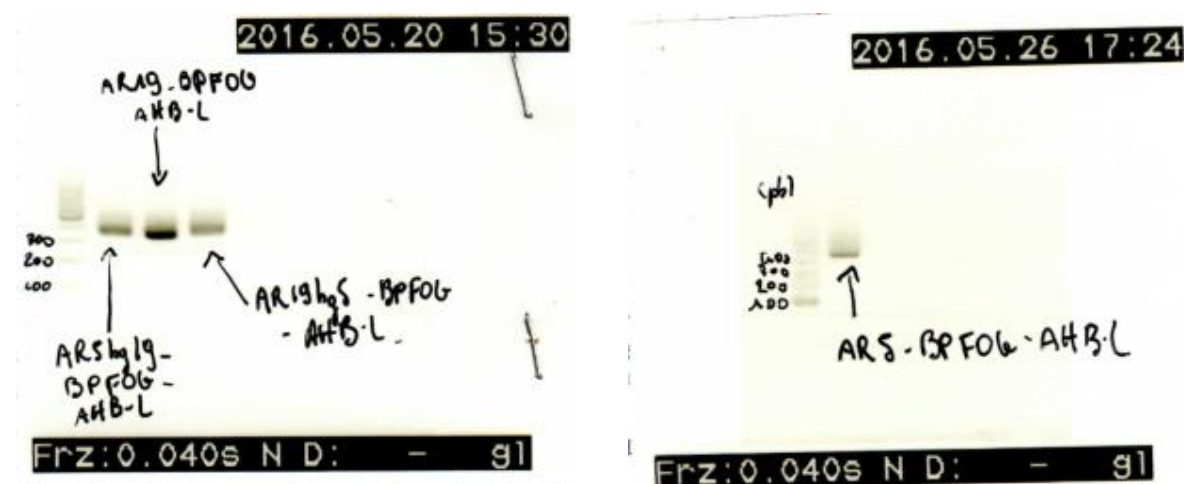


FIGURE 8. RESULTATS AMPLIFICATION PCR - AJOUT DES SEQUENCES D'INTERET POUR RECOMBINAISON

L'amplification PCR a fonctionné, les résultats des tailles des fragments correspondent à ce qui était attendu (>300pb). On sait que les séquences d'intérêt de recombinaison peuvent être présentes et le clonage nous permettra de voir si les fragments ont pu être insérés dans le plasmide grâce à la présence de ses séquences.

Concentration déterminées des fragments d'ADN par densité optique :

Enhancers-bpFOG-attB_L	C (ng/μl)	R (260/280)
aR-5-bpFOG-attB_L	78,73	1,92
aR-5_bg_19-bpFOG-attB_L	69,63	1,81
aR-19-F-bpFOG-attB_L	71,82	1,83
aR-19_bg_5-bpFOG-attB_L	52,03	1,76

TABEAU 3. CONCENTRATIONS ET RAPPORTS (ADN/PROTEINE) DETERMINES PAR DENSITE OPTIQUE

Les résultats sont tout à fait acceptables, (*concentration moyenne et rapports autour de 2 qui montrent une purification réussie*). Cela peut nous permettre de continuer et d'effectuer le clonage par système Gateway afin d'insérer nos fragments dans les plasmides.

3.4. Résultat réaction BP

Migration des plasmides contenant les séquences sur gel d'agarose 1,5% - rayonnement UV :

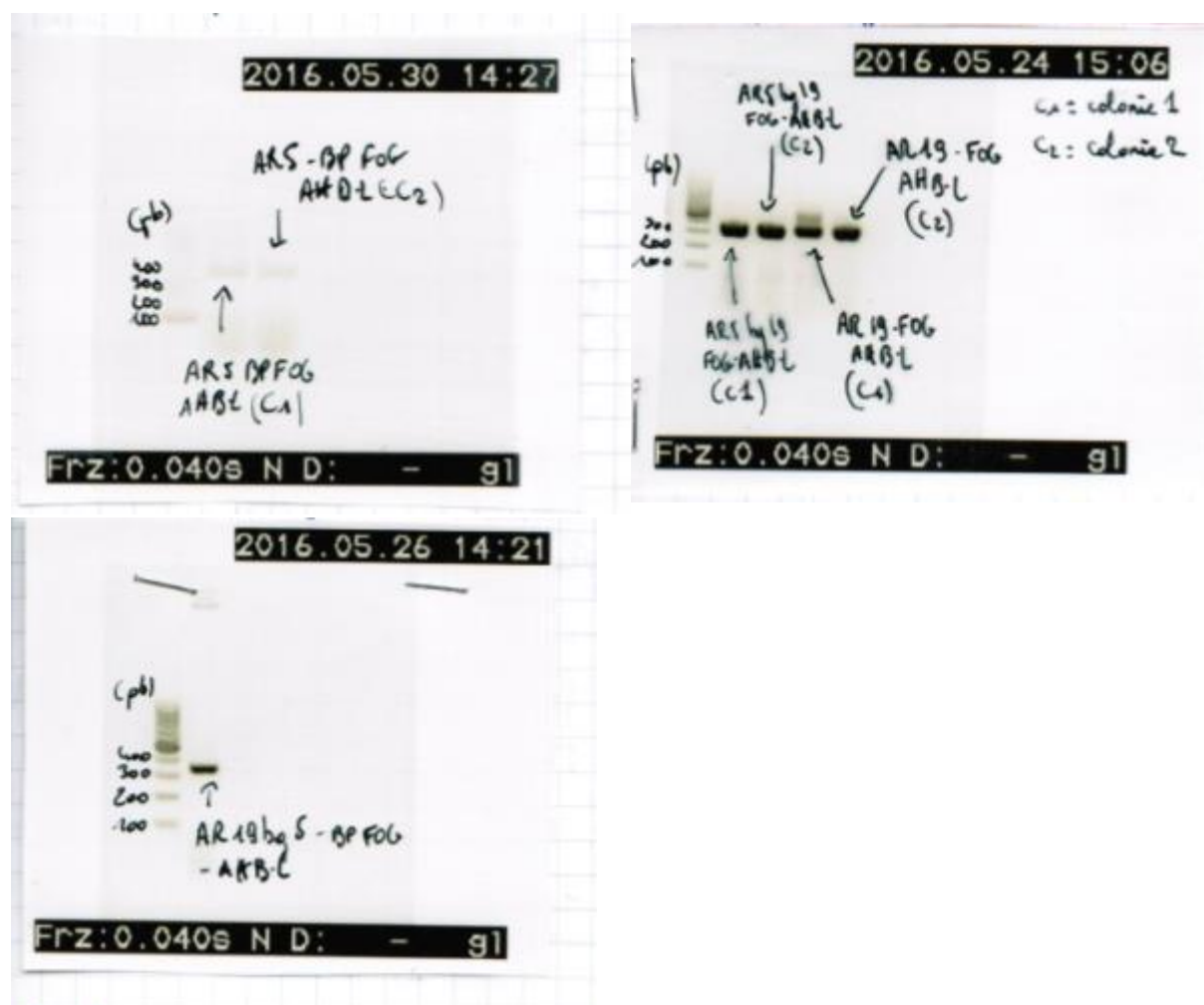


FIGURE 9. RESULTATS AMPLIFICATION PCR - SEQUENCES PRESENTES DANS LE VECTEUR PDONOR

L'amplification PCR a fonctionné, les résultats des tailles des fragments correspondent à ce qui était attendu (>300pb). On sait donc que les séquences sont présentes dans les plasmides mais faut-il encore voir le séquençage.

TABEAU 4. CONCENTRATIONS ET RAPPORTS (ADN/PROTEINE) DETERMINES PAR DENSITE OPTIQUE

Enhancers-pDONOR	C (ng/μl)	R (260/280)
aR-5-pDONOR-c1	67,7	2,04
aR-5-pDONOR-c2	97,5	1,95
aR-5_bg_19-pDONOR-c1	100,7	1,94
aR-5_bg_19-pDONOR-c2	67,5	2,08
aR-19-F-pDONOR-c1	73,9	1,97
aR-19-F-pDONOR-c2	92,5	1,91
aR-19_bg_5-pDONOR	107,6	1,94

Les résultats sont tout à fait acceptables, (*concentration moyenne et rapports autour de 2 qui montrent une purification réussie*). Cela peut nous permettre de continuer et d'effectuer la réaction LR. On peut noter toutefois que les concentrations les plus faibles ont un rapport un peu plus élevé que 2 ce qui pourrait indiquer une moins bonne purification.

Résultats séquençage :

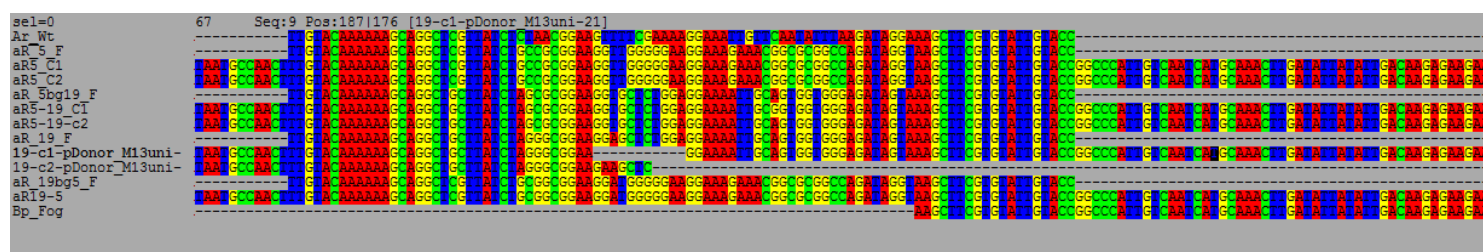
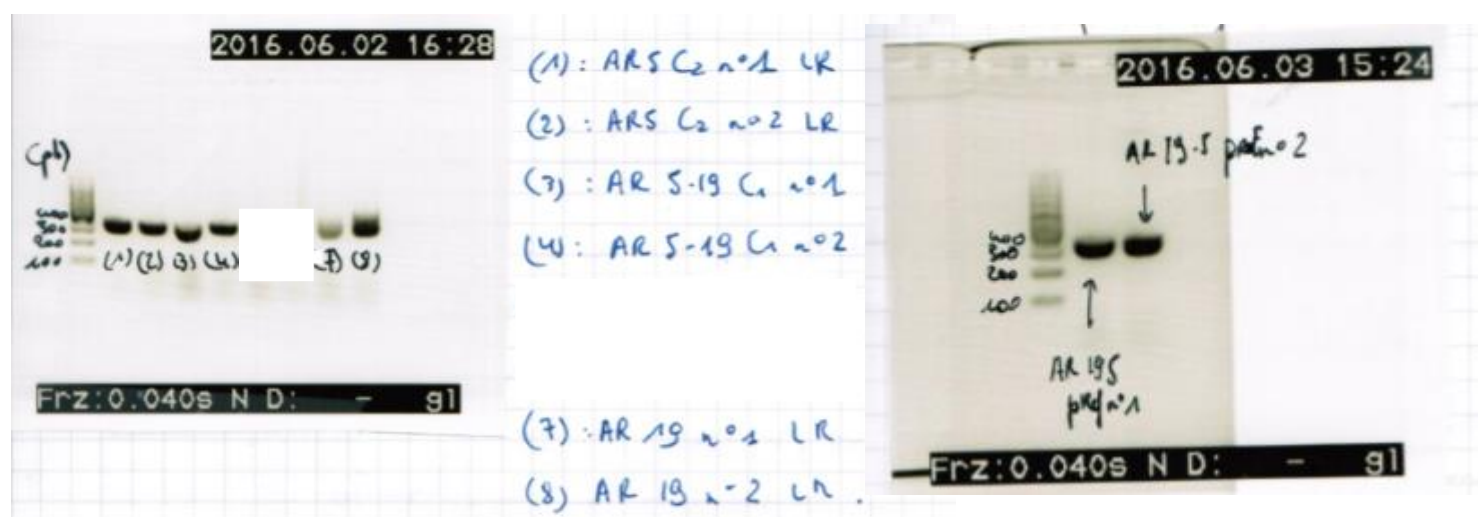


FIGURE 10. ALIGNEMENT DES SEQUENCES AVEC LE LOGICIEL SEAVIEW.

Les séquences dans les plasmides correspondent aux séquences commandées de départ (F) que ce soit pour les séquences régulatrices ou promotrices sauf pour aR_19 qui n'a pas été séquençé correctement. On attend donc la réaction LR pour effectuer un autre séquençage afin de voir s'il n'y pas eu d'erreur.

3.5. Résultats réaction LR

Migration des plasmides contenant les séquences sur gel d'agarose 1,5% - rayonnement UV :



L'amplification PCR a fonctionné, les résultats des tailles des fragments correspondent à ce qui était attendu (>300pb). On sait donc que les séquences sont présentes dans les plasmides pRFB mais faut-il encore voir le séquençage et la concentration afin d'être certain de pouvoir électroporer ces plasmides dans le noyau des cellules des embryons.

TABLEAU 5.. CONCENTRATIONS ET RAPPORTS (ADN/PROTEINE) DETERMINES PAR DENSITE OPTIQUE –RESULTATS MINIPREPS

Enhancers-pRFB	C (ng/μl)	R (260/280)
aR-5-pRFB-c1	105,4	1,91
aR-5- pRFB-c2	132,1	1,92
aR-5_bg_19- pRFB-c1	162,7	1,92
aR-5_bg_19- pRFB-c2	132,2	1,92
aR-19-F- pRFB-c1	386,7	1,89
aR-19-F- pRFB-c2	408,9	1,89
aR-19_bg_5- pRFB-c1	98,4	1,87
aR-19_bg_5- pRFB-c2	102	1,91

TABLEAU 6. CONCENTRATIONS ET RAPPORTS (ADN/PROTEINE) DETERMINES PAR DENSITE OPTIQUE –RESULTATS MAXIPREPS COLONIE LA PLUS CONCENTREE CHOISIE POUR ELECTROPORER

Enhancers-pRFB	C (ng/μl)	R (260/280)
aR-5-pRFB-c1	1648	1,91
aR-5_bg_19- pRFB-c1	2177	1,92
aR-19-F- pRFB-c1	1931	1,89
aR-19_bg_5- pRFB-c1	1443	1,87

Les résultats sont tout à fait acceptables, (*rapports autour de 2 qui montrent une purification réussie*). Cela peut nous permettre de continuer et d'effectuer l'électroporation. On peut noter que les purifications des plasmides des Maxipreps ont permis d'obtenir un concentration 10X supérieur à celles des Minipreps pour que la probabilité d'électroporer un plasmide dans le noyau des Ascidie soit beaucoup plus élevée. On voit aussi que les colonies 1 de chaque préparation ont une concentration plus forte que les colonies 2 et sont choisies pour l'électroporation.

Résultat séquençage LR réaction :

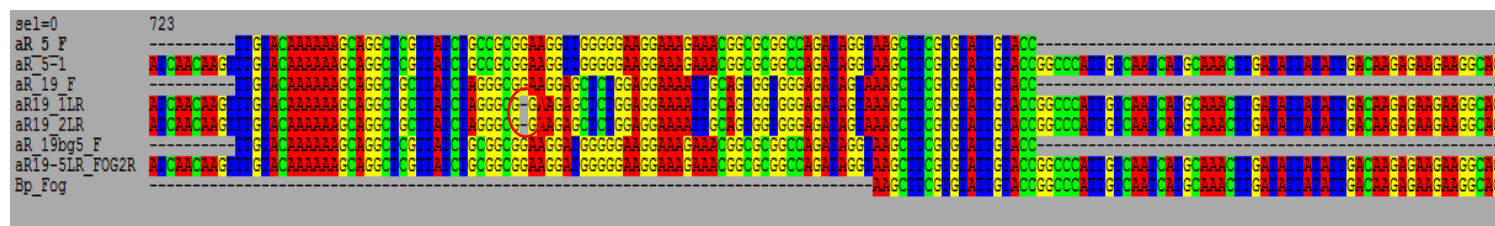


FIGURE 12. RESULTATS SEQUENÇAGE LR REACTION SUR SEAVIEW

Les séquences dans les plasmides correspondent au séquences commandées de départ (F) que ce soit pour les séquences régulatrices ou promotrices sauf pour aR_19 qui cette fois a été séquençé mais présente une délétion dans sa séquence régulatrice dans le site ETS1. On peut

émettre l'hypothèse d'un résultat faussé à l'électroporation dû à cette mutation ou bien une erreur de séquençage.

3.6. Résultats électroporation :

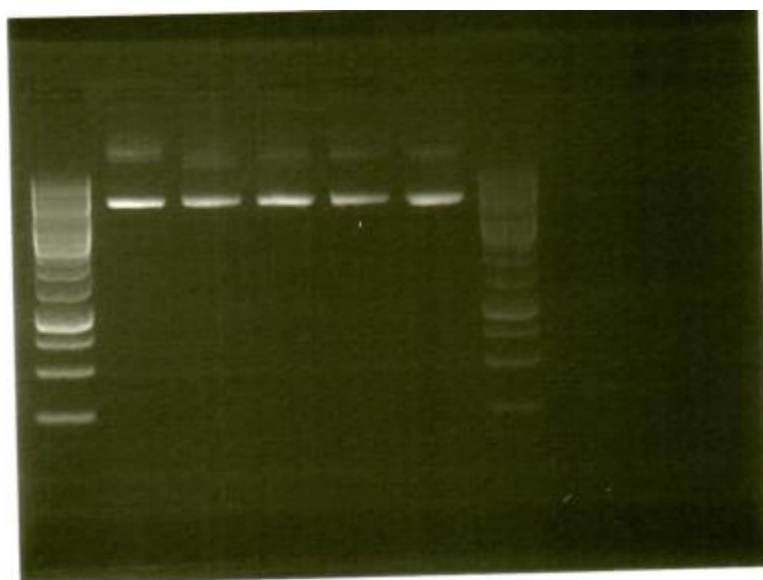
Tests de vérification des concentrations à 1mg/ml par densité optique au Nanodrop :

Enhancers-pRFB	C (ng/μl)	R (260/280)
Wild type	682,5	1,90
aR-5-pRFB-c1	1089,6	1,91
aR-5_bg_19- pRFB-c1	1046,2	1,91
aR-19-F- pRFB-c1	1088,8	1,92
aR-19_bg_5- pRFB-c1	1041,6	1,92

TABLEAU 7. TABLEAU TESTS DES CONCENTRATIONS A 1MG/ML AVANT L'ELECTROPORATION.

On voit que toutes les constructions ont une concentration à 1mg/ml sauf le wild type conservé à -20°C au laboratoire ; il peut exister une marge d'erreur importante parfois avec le nanodrop. Il était donc nécessaire d'effectuer un gel analytique afin d'observer les concentrations en ADN suivant les bandes présentes sur le gel.

Résultats des migrations des séquences par rayonnement UV sur gel électrophorèse 0,5% (séquences plasmidiques plus importantes que les séquences seules) :



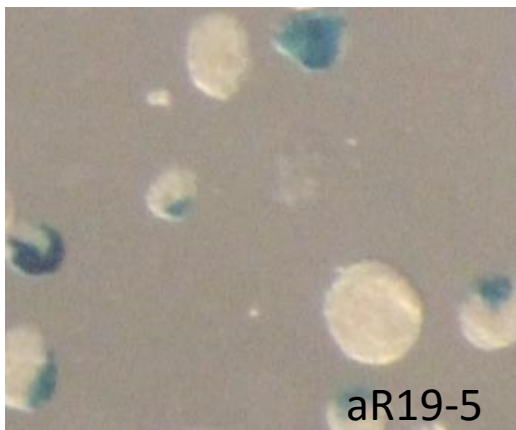
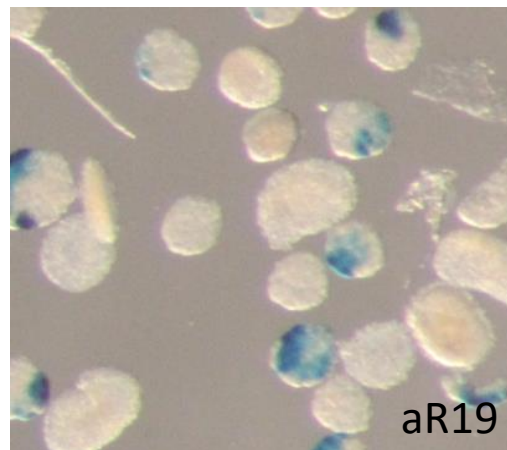
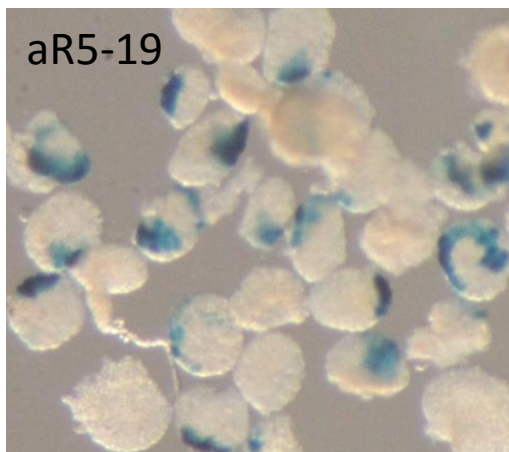
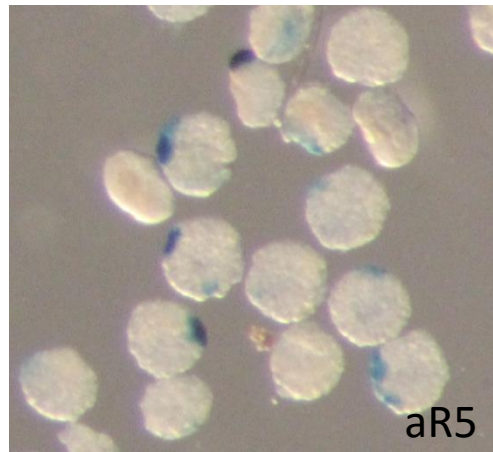
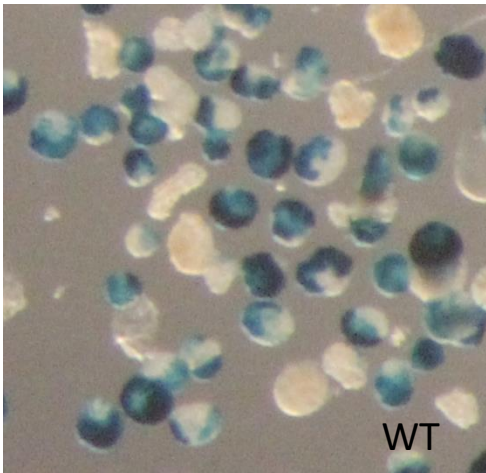
Ordre des bandes :

- WT
- aR-5-pRFB-c1
- aR-5_bg_19- pRFB-c1
- aR-19-F- pRFB-c1
- aR-19_bg_5- pRFB-c1

On voit ici que les bandes ont tous la même épaisseur donc une concentration commune et sont toutes de la même taille. On suppose donc que l'on peut poursuivre l'électroporation et que l'on a bien une concentration d'environ 1mg/ml pour chaque construction.

3.6.1. Résultats électroporation 1

Condition de développement des embryons à 22°C pendant 4h – temps de coloration de la β -galactosidase toute la nuit. L'expérience a été répétée 3 fois dans ces conditions :



Après 3 reproductions de l'expérience dans les conditions énoncées ci-dessus, l'équipe en a déduit que les résultats n'étaient pas exploitables. On voit que les embryons ont des tailles complètement différentes, que l'expression de la β galactosidase est ectopique dans toutes les constructions malgré une très forte expression observée dans le Wild type qui reste aussi ectopique.

Les causes de ces expressions anormales sont sûrement dû à la température trop élevée pour le développement des embryons de *Ciona intestinalis* ; il faut donc descendre à 18°C (*température de l'eau de mer dans les milieux naturels*). La forte expression dans le Wild type est peut-être dû au temps de coloration trop long sur toute une nuit et sera réduit à 2h en suivant la coloration à la loupe binoculaire.

La différence de taille des embryons est sûrement du au temps entre la fécondation des embryons et l'électroporation. En effet, la première mitose a lieu entre 50min et une heure or l'électroporation doit être effectuée au stade 1 cellule ; si celle-ci est effectuée au stade 2 cellules, les deux blastomères peuvent être séparés par le choc électrique et donner des embryons non viables et dégénérés. Il est donc préférable de réduire le temps entre la fécondation et l'électroporation à 40min.

Nous avons pu faire seulement un graphique pour porter un regard sur les résultats qui ne sont pas exploitables :

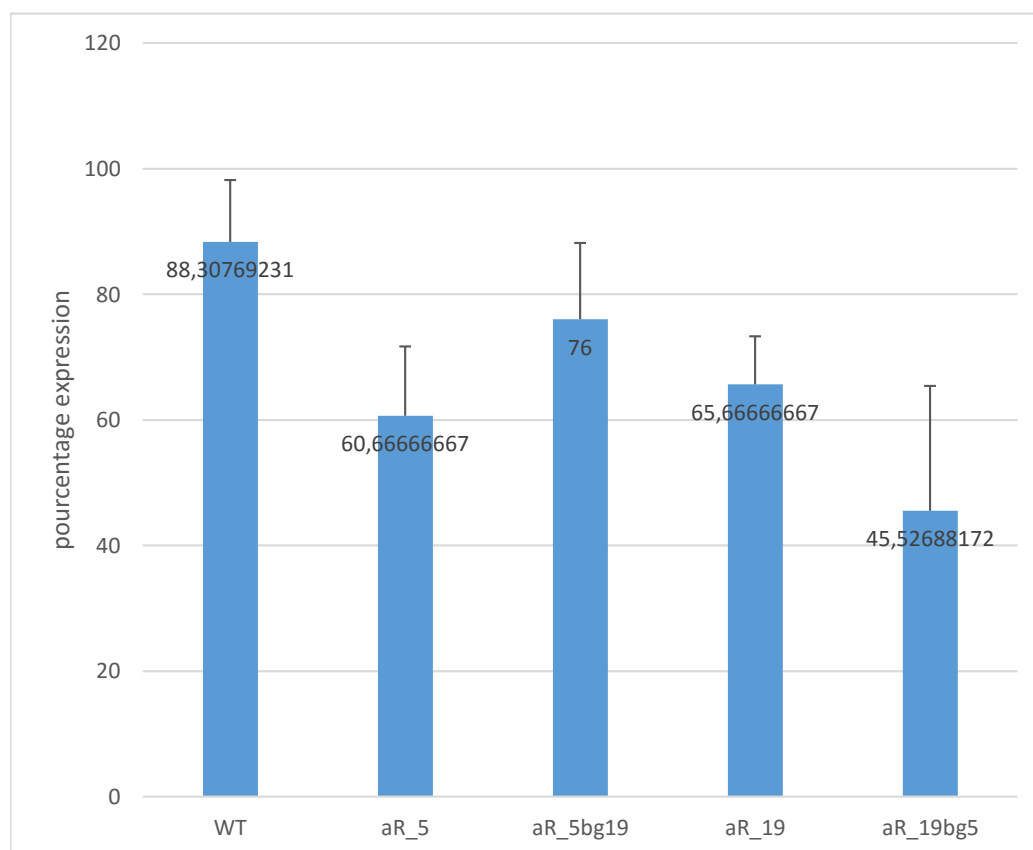


FIGURE 13. GRAPHIQUE DE TEST D'ACTIVITE DES ELEMENTS A MUTES ET DU WILD TYPE

3.6.2. Résultats électroporation 2

Condition de développement des embryons à 18°C pendant 4h30– temps de coloration de la β galactosidase pendant 2h. L'expérience a été répétée 1 fois dans ces conditions :

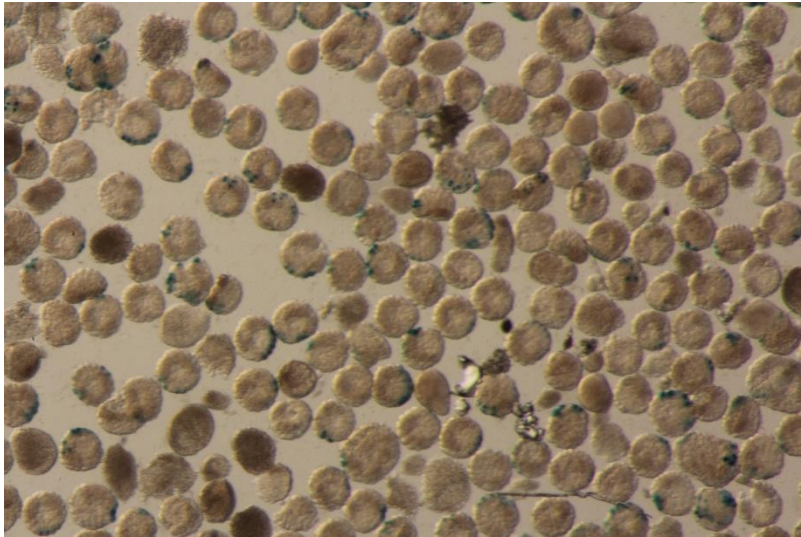
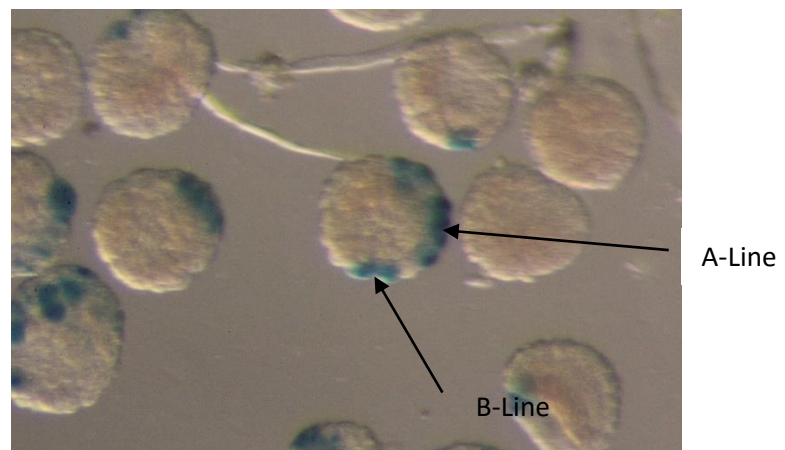
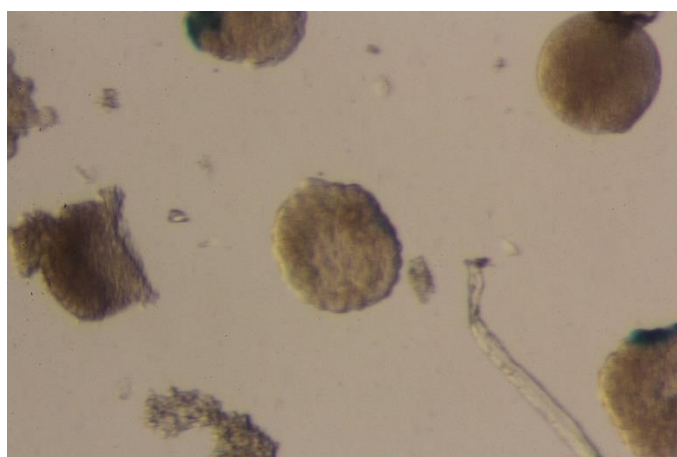


FIGURE 14. EXEMPLE DE LA CONSTRUCTION - SEQUENCE AR5

On voit cette fois que la vue d'ensemble des constructions possède des embryons de même taille qui sont bien développés au stade 110 cellules. Cependant l'électroporation tue toujours un certain nombre d'embryons du au choc électrique.



On voit que cette fois ci, on obtient aussi l'expression de l'élément a spécifique au système nerveux central avec la présence des lignées A et B. Cependant l'électroporation, peut provoquer ce que l'on appelle le mosaïcisme ; c'est-à-dire des embryons qui n'ont qu'une moitié des cellules qui expriment de *Otx* ou bien seulement la lignée A ou seulement la lignée B.



Voici l'exemple d'un embryon d'une construction qui ne possède pas d'expression du gène Otx.

FIGURE 15. EXEMPLE DE RESULTATS ATTENDUS DANS CHACUNE DES CONSTRUCTIONS.

L'objectif était donc de quantifier l'expression de chaque construction en fonction des séquences insérées afin de comparer l'activité des mutants par rapport au Wild type et aux résultats obtenus pendant la thèse. Le comptage comporte 5 classes distinctes d'expression :

- Lignée A
- Lignée B
- Lignée A et B
- Pas d'activité
- Ectopiques

Elément a	Lignée A	Lignée B	Lignée A et B	Pas d'activité	Ectopiques	Total
WT	17	18	45	14	6	100
aR-5-pRFB-c1	0	22	3	71	4	100
aR-5_bg_19- pRFB-c1	4	9	25	42	20	100
aR-19-F- pRFB-c1	9	29	22	37	3	100
aR-19_bg_5- pRFB-c1	12	12	53	15	8	100

TABEAU 8. RESULTATS COMPTAGE POUR CHAQUE CONSTRUCTION DE L'ACTIVITE DE L'ELEMENT A

On voit que le Wild type possède la plus forte activité avec 80% d'embryons positifs tandis que la séquence aR-5-pRFB-c1 possède une activité faible avec seulement 25%. On voit aussi que le site ETS 1 de l'élément 19 actif inséré dans la séquence aR-5 inactive permet de voir désormais une activité de 77 % tandis que le site ETS 1 de l'élément 5 inactif inséré dans la séquence aR-19 active permet de voir désormais une activité de 38%. AR_19, qui est une

séquence randomisée de l'élément possédant une activité plus forte que le Wild type d'après la thèse, permet de voir une activité dans les embryons de 60%. Cela pourrait être expliqué par la mutation observée dans le séquençage.

Pour le graphique, on regroupe les 3 premières colonnes : lignée A, B et A-B :

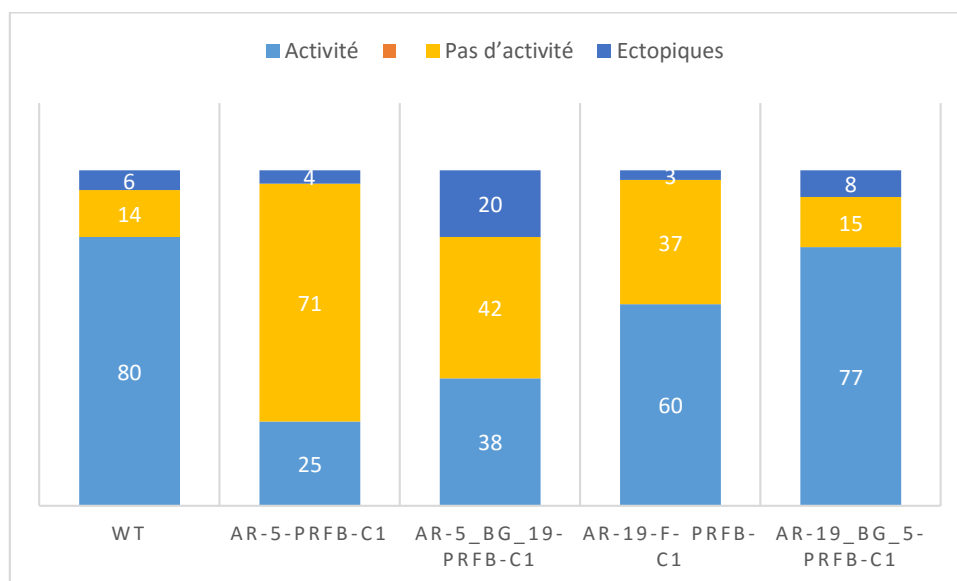


FIGURE 16. PORCENTAGE D'ACTIVITE DE L'ELEMENT A EN FONCTION DES CONSTRUCTIONS TESTEES

Le but ensuite de ses résultats est de regarder s'il y a une différence significative d'activité entre l'élément randomisé aR-5 non actif et l'élément randomisé aR-5 qui possède le site ETS 1 de aR-19 et vice versa. Malheureusement, on ne peut faire de statistiques avec une seule manipulation et les dates de stage n'ont pas permis de reproduire l'expérience plusieurs fois dans les nouvelles conditions.

Les premiers résultats seraient en accord avec la thèse excepté une plus faible activité d'aR-19 qui pourrait être dû à une modification de la séquence aR-19 dans le plasmide d'expression. Il faudra les confirmer en répétant plusieurs manipulations afin de construire un jeu de données et effectuer une étude statistique appropriée.

4. Conclusion

L'étude de ces premiers résultats ne peut être conclusive pour l'instant. Les nouvelles conditions exposées pour l'électroporation ont été reproduites seulement une fois et doivent être répétées plusieurs fois afin d'effectuer des statistiques valables et regarder des différences significatives présentes ou non.

Néanmoins, les premiers résultats seraient en accord avec la thèse excepté une plus faible activité d'aR-19 qui pourrait être due à une modification de la séquence aR-19 dans le plasmide d'expression ; il faudrait effectuer un nouveau séquençage à l'avenir afin de savoir si la mutation est vraiment présente au sein de la construction. De plus cette mutation se trouverait sur le site ETS 1, site que l'on étudie et qui est modifié pour l'étude et pour la fixation des facteurs de transcription.

Le principal résultat de notre étude est que l'introduction du site étendu (10 paires de bases) aR-19 dans aR-5 permet de réactiver celui-ci. On pourrait donc supposer, en attendant les prochaines manipulations, que les séquences essentielles à l'activité du site ETS 1 sont contenues dans 10 paires de bases. Le reste des séquences intermédiaires serait donc moins important.

Il manquerait peut-être à cette étude, une quantification de l'affinité de ETS1/2 pour les mutants que nous avons construits par gel shift,

Pour conclure, cette étude a permis de comprendre un peu plus le rôle des séquences régulatrices lors de la transcription notamment leur rôle d'activation obligatoire de celle-ci sur le promoteur. Ces séquences ne peuvent pas être séparées des promoteurs pour effectuer la transcription mais leur compréhension reste encore complexe de par leur localisation dans les régions non codantes et leur distance qui peut être élevée du promoteur qu'elle contrôle, notamment ici dans la mise en place du système nerveux central.

Les résultats restent encourageant du fait d'une certaine correspondance avec la thèse malgré les données de recherches manquantes à ce jour afin d'effectuer des statistiques par manque de temps de ce stage.

Il existe de nombreuses perspectives à connaître le fonctionnement des séquences cis-régulatrices ; une fois que l'on aura une compréhension totale de ces séquences, le but serait de séquencer le génome d'un individu de l'espèce *Ciona intestinalis*, et grâce à des logiciels mis au point, retrouver les séquences importantes cis-régulatrices automatiquement dans le génome.

L'information cis-régulatrice étant portée intrinsèquement par la séquence d'ADN, comprendre comment elle encode ses différents niveaux d'information me semble un enjeu fondamental pour l'identification d'enhancers à l'échelle génomique.

Ciona intestinalis est un organisme modèle qui a un « petit » génome, où il est facile de tester l'activité d'un grand nombre d'enhancers, et dont le niveau de polymorphisme permet des approches de micro-évolution même dans les séquences non-codantes.

Bibliographie

- Guérault-Bellone M. *Signatures nucléotidiques de l'activité des enhancers développementaux chez l'ascidie Ciona intestinalis*. CBS2. Thèse Université de Montpellier, France 2014.
- [https://fr.wikipedia.org/wiki/Amplificateur_\(biologie\)](https://fr.wikipedia.org/wiki/Amplificateur_(biologie))
- <http://rohslab.cmb.usc.edu/DNAshape/>
- <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/gel-shift-assays-emsa.html>
- http://scd-theses.u-strasbg.fr/842/01/html/these_body.html
- <https://eu.idtdna.com/site>
- <http://www.clinisciences.com/>
- <http://access.ens-lyon.fr/>
- <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/MicrobeWiki>
- http://biologie.univ-mrs.fr/upload/p64/TD_gateway.pdf
- <http://www.systran.fr/>
- [https://fr.wikipedia.org/wiki/Transcription_\(biologie\)](https://fr.wikipedia.org/wiki/Transcription_(biologie))
- <https://www.qiagen.com/fr/shop/lab-basics/buffers-and-reagents/buffer-pe/#orderinginformation>

Annexe

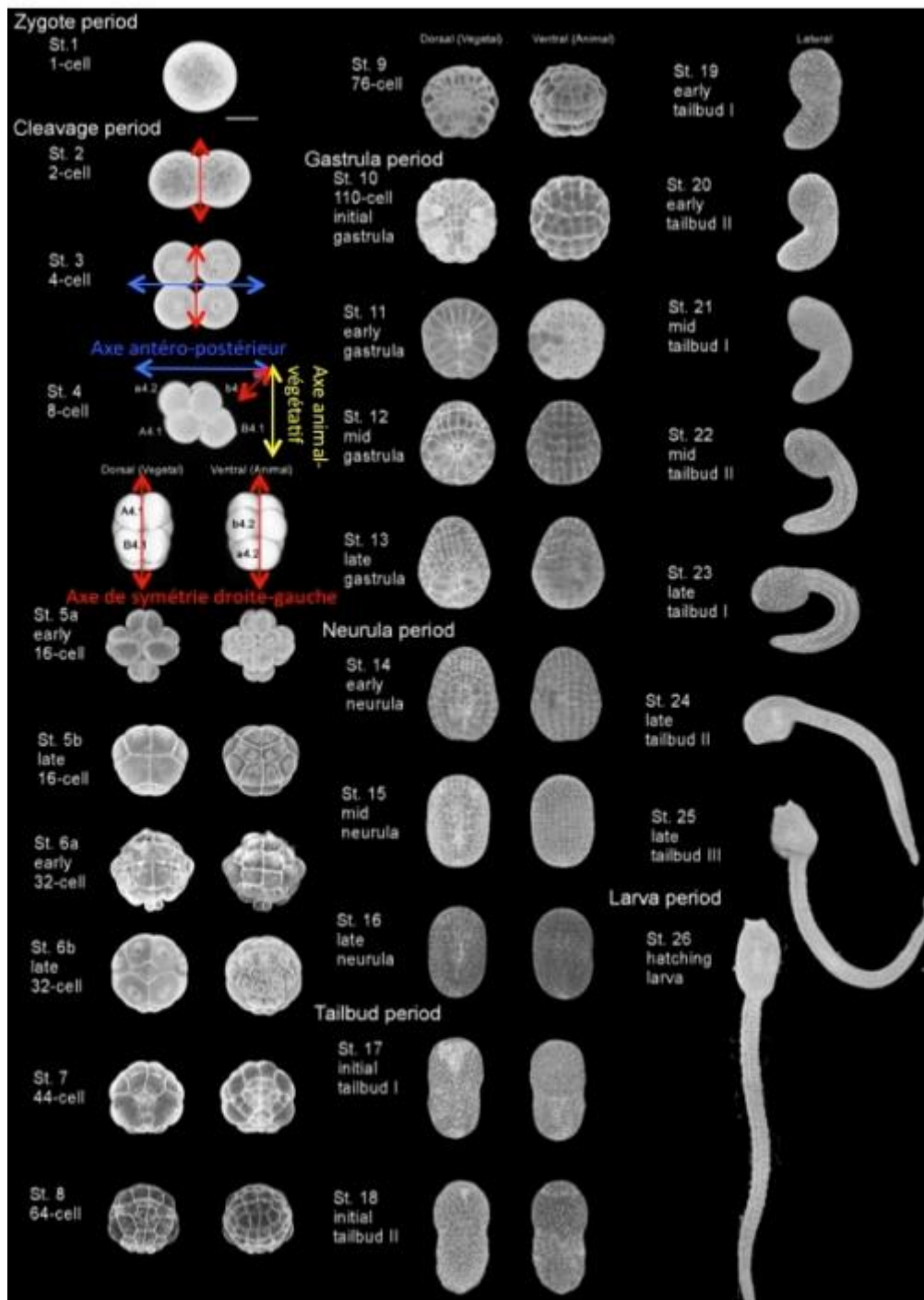


FIGURE 17. DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE COMPLET DE *CIONA INTESTINALIS*.