

**UFR Sciences et Techniques de la Côte Basque**  
Université de Pau et des Pays de l'Adour

**Licence biologie des Organismes**

# **Étude de ligands TGF, de la protéine Smad2/3 et d'un récepteur de type II au sein de la voie de signalisation TGF- $\beta$**

**LEFEBVRE Charlotte**

Stage effectué du 09/03/2015 au 30/04/2015  
A l'Observatoire Océanologique de Villefranche Sur Mer  
Laboratoire de Biologie du Développement CNRS UMR 7009 - UPMC  
Quai de la Darse 06230 Villefranche-sur-Mer , France

Sous la direction scientifique de Mr Lapébie Pascal.



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

# Table des matières

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| Remerciement.....                                                          | 3  |
| I. Avant - propos.....                                                     | 4  |
| II. Introduction.....                                                      | 5  |
| 1 .La Transition épithélio- mésenchymateuse.....                           | 5  |
| 2 .La voie de signalisation TGF- $\beta$ (Transforming Growth Factor)..... | 5  |
| 3 .Objectifs.....                                                          | 7  |
| III. Méthodes.....                                                         | 8  |
| 1 .Modèle biologique.....                                                  | 8  |
| 2 .PCR d'amplification.....                                                | 8  |
| 3 .Extraction de bande.....                                                | 9  |
| 4 .Précipitation et purification de l'ADN.....                             | 9  |
| 5 .Ligation.....                                                           | 9  |
| 6 .Transformation.....                                                     | 9  |
| 7 .PCR de vérification sur colonies.....                                   | 10 |
| 8 .Culture liquide et Minipreparation d'ADN plasmidique.....               | 10 |
| 9 .Synthèse d'ARNm.....                                                    | 10 |
| 10 .Micro-injection.....                                                   | 11 |
| 1 .L'Hybridation In Situ (HIS).....                                        | 11 |
| 1 .Fixation des embryons.....                                              | 11 |
| 2 .Réhydratation.....                                                      | 11 |
| 3 .Hybridation in Situ.....                                                | 11 |
| 11 .Imagerie.....                                                          | 12 |
| IV. Résultats et discussions.....                                          | 13 |
| 1 .Synthèse de l'ARNm Smad2/3 et localisation de la protéine active.....   | 13 |
| 2 .Expression des ligands TGF5, TGF6 et TGF7.....                          | 15 |
| 3 .Isolement et fonctionnement d'un nouveau récepteur.....                 | 17 |
| V. Conclusion.....                                                         | 17 |
| VI. Bilan personnel.....                                                   | 18 |
| VII. Référence bibliographique.....                                        | 19 |
| Annexes.....                                                               | 20 |
| Résumé.....                                                                | 22 |

## Remerciement

Je voudrais remercier Madame Evelyn Houliston, directrice du laboratoire de Biologie du Développement de Villefranche sur Mer et responsable de l'équipe « Mécanisme développementaux chez *Clytia Hemispharica* », pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et de son équipe de recherche.

Je remercie également mon maître de stage Monsieur Pascal Lapébie, post doctorant, pour m'avoir proposé un stage très enrichissant au sein d'un projet très intéressant ; mais aussi pour la pédagogie, les conseils, et le temps qu'il m'a accordé. Je souhaite également remercier tout le personnel pour leur présence en cas de besoin et leur aide au bon déroulement de mon stage.

## I. Avant - propos

L'observatoire Océanologique est située à Villefranche sur Mer dans les Alpes Maritimes (06). Le premier laboratoire fut implanté en 1882 par J. Barrois après que soit découverte la richesse spécifique de la rade de Villefranche en organisme pélagique divers (méduses, mollusques, Tuniciers, Siphonophores, etc...). En 1884, la station zoologique est créée, les recherches seront assurées et financées par la Russie jusqu'en 1928. A partir de 1931, le laboratoire est affecté à la responsabilité française. En 1976, le site devient officiellement une station marine indépendante de la station de Banyuls, les laboratoires sont rattachés à l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI).

Aujourd'hui l'observatoire a plusieurs missions : l'enseignement grâce à l'encadrement de stagiaires et à une prise en charge d' U.E affiliés à des formations universitaires, l'observation via la collecte régulière de mesure sur le site de la rade et enfin la recherche. Il se compose de deux structures de recherche reconnues par le CNRS. Le Laboratoire d'Océanographie de Villefranche sur Mer ou LOV (UMR 7093) et le Laboratoire de Biologie du Développement ou LBDV (UMR 7009). Le LOV investit des recherches en océanographie pélagique sous ses aspects chimiques, biologiques et physiques. Il est composé de quatre équipes de recherche couvrant des thématiques telles que l'étude des réponses des écosystèmes marins aux changements environnementaux, la compréhension des processus qui contrôlent le transfert de la lumière dans l'océan, l'obtention de données sur des processus physiologiques ou interactions individuelles,... Au Laboratoire de Biologie du Développement, les sept équipes de recherche travaillent sur les processus développementaux comme la division cellulaire, l'organisation et la réorganisation des œufs, les signaux calciques, la régionalisation de l'embryon, la mise en place des axes embryonnaires ou encore la régulation de l'expression génétique.

J'ai été accueillie dans l'équipe approfondissant les mécanismes développementaux de la méduse *Clytia hemisphaerica* notamment via les déterminants maternels, la mise en place de la polarité embryonnaire ou la régulation de fonctions par certains gènes. *Clytia hemisphaerica* est un modèle expérimental développé au sein du laboratoire de Villefranche qui est maintenant fournisseur mondial de ce nouveau modèle biologique grâce au programme EMBRC (European Marine Biological Resource Centre). C'est dire ici toute l'importance portée par ce laboratoire.

## II. Introduction

Une voie de signalisation se constitue de l'ensemble des mécanismes menant à une réponse cellulaire, depuis la réception d'une information à un récepteur jusqu'à la réponse, qui peut être l'expression des gènes. Ces cascades de signalisations cellulaires sont impliquées dans le développement et la physiologie de tout organismes. Elle sont étudiées dans nombre de modèles de biologie du développement. Chez *Clytia hemisphaerica* la voie TGF-B semble impliquée dans la gastrulation. Par ailleurs, la voie s'avère réguler la Transition Epithélio-Mésenchymateuse, ce qui ne va pas sans rappeler son rôle dans d'autres modèles développementaux ou pathologiques.

### 1 . La Transition épithélio- mésenchymateuse

Lors d'une TEM, les cellules épithéliales vont développer un phénotype de cellule mésenchymateuse (Figure 1). Cet événement est essentiel pour divers processus développementaux (gastrulation, formation de la crête neurale et des valves cardiaques,..) (4). La TEM peut survenir sous l'effet de divers signaux et stimuli extracellulaires. Elle se traduit par la perte des caractéristiques épithéliales telles que la polarité ou les jonctions intercellulaires (10). Les cellules de l'épithélium sont étroitement associées les unes aux autres, grâce aux jonctions serrées, aux jonctions adhérentes et aux desmosomes. Le démantèlement des jonctions serrées est estimé comme un des événements précoces de la TEM, s'en suit le démantèlement des jonctions adhérentes et des desmosomes, puis le cytosquelette d'actine se réorganise (11). Les cellules épithéliales sont délaminées et dépolarisées. Elles développent ensuite les caractéristiques de cellules mésenchymateuses comme un phénotype dit « en broche », sans oublier la capacité de migrer. La destruction de la matrice extra cellulaire et la possibilité de migrer leur permet d'envahir les tissus environnant (7). Ce processus réversible résulte de changements dans la régulation transcriptionnelle, l'expression des gènes épithéliaux est réprimée et celle des gènes mésenchymateux est activée.

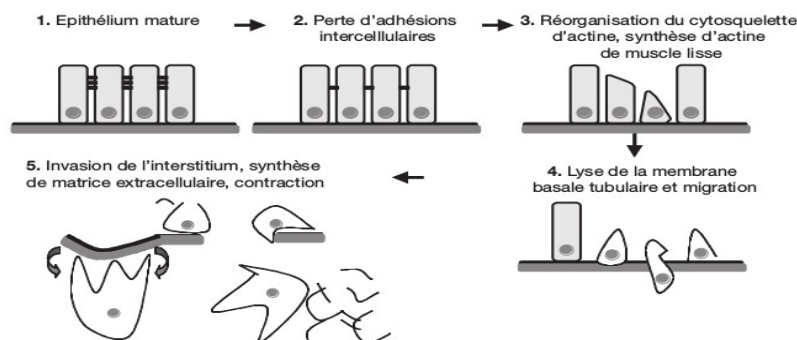


Figure 1: Représentation schématique de la Transition épithélio-mésenchymateuse

### 2 . La voie de signalisation TGF- $\beta$ (Transforming Growth Factor)

La superfamille TGF- $\beta$  émerge avec l'évolution des animaux multicellulaires. Elle est composée de différents groupes de ligands : les TGF- $\beta$ s (sous famille ayant le même nom), les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), les GDFs (Growth Differentiation Factors), les activines, les inhibines, l'AMH (Anti-Müllerian Hormone) et les GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor)(12). À l'échelle de l'organisme, ils participent entre autre à l'élaboration du plan d'architecture du corps lors du début de l'embryogenèse. Ils contrôlent aussi la formation de

cartilage, d'os, d'organes sexuels ou bien régulent d'importantes fonctions physiologiques immunitaires ou endocrines (3). Toutes les protéines qui composent la superfamille possèdent au moins une région avec une homologie de séquence, principalement la région C-terminale.

D'un point de vue cellulaire, la voie de signalisation TGF- $\beta$  régule plus spécifiquement certaines réponses cellulaires comme la prolifération, l'adhésion, la différenciation, la migration, la croissance des cellules épithéliales, la motilité, l'organisation, la tumorigenèse ou encore l'apoptose (12)(4). Nombres de ces mécanismes sont requis lors de la mise en place de la TEM. Bien que la Transition épithélio-mésenchymateuse puisse être induite par divers facteurs de croissance et de différenciation, les membres de la voie TGF- $\beta$  jouent un rôle majeur dans son induction. En outre, l'ajout de ligands TGF- $\beta$  aux cellules épithéliales en culture déclenche ce processus (10).

La transduction des diverses réponses cellulaires par les membres de la famille TGF- $\beta$  s'opère grâce des récepteurs transmembranaire à activité sérine-thréonine kinase: les récepteurs de type I et les récepteurs de type II. Chez l'homme il y a sept récepteurs de type I (ALK-1 à 7) et cinq récepteurs de type II. Les Smads font partie d'une famille de facteurs de transcription recrutées par la voie de signalisation TGF- $\beta$ . Certains sont activés par l'intermédiaire de récepteurs, les R-smad (Receptor-regulated Smad) : Smad1, Smad2, Smad3, Smad5, Smad8, Smad9 sont retrouvés chez les vertébrés tandis que les « invertébrés » comme *Clytia hemisphaerica* ne possèdent que Smad1/5 et Smad2/3. Smad4 est à lui seul une classe de Co-smad (Common-partner Smad), qui est nécessaire à la transduction du signal (12)(5). Ces protéines possèdent deux domaines, le domaine N-terminale Mad Homology 1 (MH1) qui permet la liaison à l'ADN et le domaine C-terminal MH2 qui est utile au recrutement de co-activateurs ou de co-répresseurs de la transcription. Il joue aussi un rôle important dans l'interaction avec le récepteur. Il existe aussi des I-Smads (Inhibitory Smad) : Smad 7 et Smad 9, qui sont des inhibiteurs de transcription. Ils ne possèdent pas de domaine MH1 et se lient en amont mais ils ne peuvent transduire le signal au niveau nucléaire (8).

Le signal débute avec la liaison d'un ligand à un récepteur de type II. Ces récepteurs ont une activité kinase continuellement active ; ils peuvent donc phosphoryler et activer le domaine kinase des récepteurs de type I. La liaison du ligand type II engendre l'assemblage d'un récepteur de type II avec un récepteur de type I activant ce dernier et donnant un complexe hétérotrétramérique. Les R-Smads interagissent avec ce complexe ; afin d'être activés, ils sont phosphorylés en leur extrémité C-terminale (9)(1). Après activation via les récepteurs, les Smads peuvent former des complexes et être associés à Smad4. Par la suite, ils sont transloqués et s'accumulent dans le noyau où les Smads s'associent avec des facteurs de liaisons et de transcriptions à l'ADN (Figure 1). De ce fait, ils régulent l'expression du gène ciblé en se liant à sa séquence promotrice (4). Les R-Smads sont continuellement transportés entre le noyaux et le cytoplasme. Ils sont déphosphorylés à un faible taux ce qui leur permet de se dissocier de Smad 4 et d'être exportés au cytoplasme. Si le récepteur est toujours actif, les R-smad sont à nouveau phosphorylés, ainsi ils forment de nouveau un complexe avec Smad4 qui sera transloqué vers le noyau. Si le récepteur n'est plus actif, alors les Smads s'accumulent dans le cytoplasme (5).

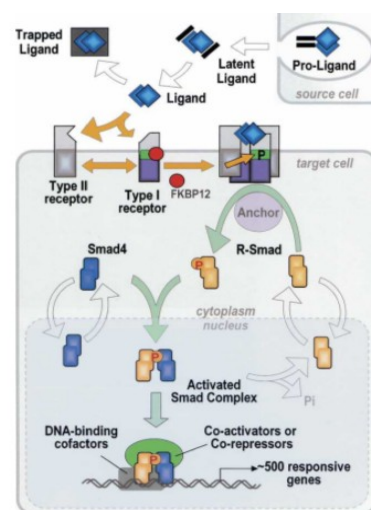


Figure 2: Composition et Structuration de la voie de signalisation TGF-  $\beta$  (8)

Lorsque la voie de signalisation TGF- $\beta$  est touchée par des dérégulations (mutation, excès de production de ligands,...) elle peut être impliquée dans des troubles développementaux ou des maladies humaines variées telles que le cancer, la fibrose, les troubles vasculaires et certaines maladies auto-immunes (10)(3). En outre, la TEM est considérée comme une étape importante lors de la formation et la progression de tumeur. Par exemple, la perte de Smad2 est fréquemment observée chez les patients humains atteints de cancer de la peau ; la déficience en Smad2 dans les kératinocytes promeut la TEM et accélère la formation de tumeurs de la peau (6).

Des applications thérapeutiques sont développées -grâce aux études sur la voie TGF- $\beta$  et les gènes qu'elle cible en aval- afin d'établir de nouveaux traitements pour de nombreuses maladies (progression cancéreuse, fibrose tissulaire...) (2). Les travaux de recherche fondamentale sont en conséquence nécessaires pour approfondir les connaissances actuelles sur la voie TGF- $\beta$ , notamment le rôle des Smads durant le développement. L'étude de l'implication des Smads est plus aisée chez la méduse *Clytia hemisphaerica* qui n'exprime que Smad2/3 et Smad1/5 contrairement aux mammifères. Ce modèle procure aussi les avantages de fournir quotidiennement une grande quantité d'œufs, d'avoir un cycle embryonnaire rapide et sa gastrulation est entièrement conditionnée par la TEM. En outre, les tissus et les œufs sont transparents ce qui permet de rendre visible l'injection de morpholinos, tout en facilitant la lecture des résultats avec la microscopie. Choisir ce modèle permet aussi de travailler sur un génome presque identique à chaque expérimentation et depuis le séquençage des génomes, la découverte de la grande conservation des outils moléculaires des métazoaires autorise l'emprunt de modèle en apparence éloigné comme *Clytia hemisphaerica*. Par ailleurs, toutes les grandes familles de facteur de transcription et de voies de signalisation connus chez les animaux sont présents chez *Clytia hemisphaerica*.

### 3 . Objectifs

Les recherches de l'équipe qui m'a accueilli contribuent à déchiffrer les processus développementaux de *Clytia hemisphaerica*. Au sein de l'équipe formée de mon maître de stage et d'une stagiaire (Marion Rosello) et moi-même, ce projet est plus particulièrement axé sur la compréhension du rôle de la voie de signalisation TGF- $\beta$  dans la gastrulation de *Clytia hemisphaerica*.

L'objectif est de **localiser l'activation de la voie de Smad2/3, caractériser trois nouveaux ligands (TGF5, TGF6 et TGF7), et un nouveau récepteur non déterminé à ce jour**. Pour l'étude de Smad2/3 et du récepteur, le gène les codant est cloné dans un plasmide adapté puis leur ARNm est injecté. Une hybridation in situ a été effectuée pour observer l'expression des ligands. Pour finir, les photos des différents résultats ont été réalisées.

### III. Méthodes

Les manipulations décrites ont été effectuées par mes soins lorsque rien n'est précisé. Le matériel déjà réalisé et utilisé est aussi indiqué.

#### 1 . Modèle biologique

*Clytia hemisphaerica* fait partie de la classe des Hydrozoaizes. Cette espèce a un cycle de vie triphasique : une phase larvaire de trois jours, un stade de polype et une phase libre de méduse. Chez cette espèce, les larves appelées planulas se fixent à un support et deviennent des polypes. La reproduction clonale des polypes leur permet de créer des colonies stables dans le temps. Ces polypes peuvent aussi relâché de petites méduses ayant une reproduction sexuée. *Clytia hemisphaerica* ne possède que deux feuilletts embryonnaires (endoderme et ectoderme) et un axe de symétrie lors du développement, composé du pôle oral, devenant la bouche, et du pôle aboral.

Ce modèle présente de nombreux avantages dont la possibilité de pouvoir élever cette espèce en laboratoire dans des aquariums de 5L (Figure 3). L'eau salée artificiellement (37 g/L) est gardée à une température de 19 °C ; elle est continuellement filtrée et un système de courant a été mis en place. Les mâles et les femelles ne sont pas élevés dans les mêmes aquariums, la fécondation est externe. La ponte est facilement contrôlable par un cycle jour/nuit artificiel. En effet, une heure après une stimulation lumineuse les mâles émettent leur gamètes et deux heures après la stimulation les femelles pondent. Les mâles sont sortis de l'aquarium une heure avant la ponte, et les femelles 30 minutes avant leur ponte, aucune dissection n'est nécessaire. Les ovocytes sont récoltés parmi les méduses et si besoin ils sont injectés. Le sperme est mis à leur contact en quantité suffisante pour que la fécondation ait lieu, celle-ci doit se faire dans l'heure suivant la ponte. Le développement se fait ensuite à 18° et chaque stade peut être maintenu artificiellement ou ralenti grâce à un contrôle de la température. Dans la journée trois cycles de ponte sont mis en place à 10h, à 14h et à 16h.

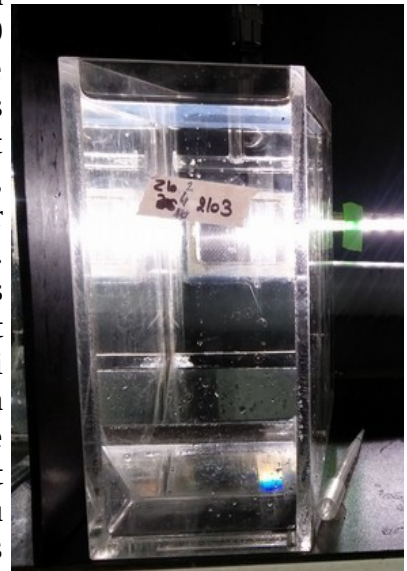


Figure 3: Aquarium utilisé pour l'élevage en laboratoire

#### 2 . PCR d'amplification

La PCR permet d'amplifier un fragment ADN ciblé grâce à des amorces encadrant un amplicon défini. Elle est effectuée une première fois avec la polymérase Phusion qui est plus efficace que la Taq polymérase, parce qu' elle copie la matrice d'ADN plus fidèlement et plus rapidement. En effet, en une minute la Taq est capable d'effectuer une élongation de 1000 pb tandis que la Phusion a besoin de 30 secondes. La solution se compose de 10µl de Tampon 5X (spécifique à la polymérase), 1µl de dNTP à 10mM, 0.5µl d'amorces sens et antisens, 0.5µl d'ADN matrice, 37µl d'eau MiliQ<sup>1</sup> puis 0.5µl de la polymérase phusion. Une PCR avec la Taq polymérase est effectuée en suivant afin d'ajouter la base azotée adénine à chaque extrémité du fragment amplifié. Cette étape est nécessaire car le site d'insertion du fragment sur le vecteur pGEM®-T easy possède à l'extrémité du bout cohésif une thymine. La complémentarité des bases permettra de réaliser une ligation.

Les différentes PCR utilisent le protocole suivant : une étape de dénaturation de 3 min à 95°C, une deuxième étape de 30 secondes à 95°C. Puis l'hybridation se fait à température d'hybridation des amorces (T<sub>m</sub>+3 pour la polymérase Phusion et T<sub>m</sub>-5 pour la Taq) durant 30 secondes, ensuite il y a une étape d'élongation à 72°C pendant une durée calculée en fonction de la vitesse de la polymérase utilisée et la longueur du fragment. Ces étapes sont répétées entre 30 et 35



fois depuis la deuxième étape jusqu'à la phase d'élongation. La dernière étape d'élongation de 10 minutes permet d'assurer une synthèse complète de l'amplicon.

### **3 . Extraction de bande**

L'extraction est un moyen de récupérer un fragment d'ADN sélectionné après avoir vérifié sa taille grâce à une électrophorèse. La bande est excisée sous lumière bleue afin de ne pas provoquer de mutation. L'ADN est purifié des autres éléments (agarose, tampon de charge, enzymes...) en utilisant le kit « Wizard SV Gel and PCR Clean-up System » (Promega). La concentration en ADN est déterminée grâce au spectromètre (Nanodrop).

### **4 . Précipitation et purification de l'ADN**

Ces techniques permettent de purifier une nouvelle fois l'ADN et d'en augmenter sa concentration. Un dixième du volume du tube après extraction est ajouté en NaCl 3M et le double et demi de ce dernier volume est complété en EtOH 100 %. Après mélange, le tube est placé à -20° pendant une heure afin d'optimiser la précipitation. Il faut placer le tube dans une centrifugeuse pendant 30 minutes à vitesse maximale, puis enlever le surnageant et ajouter 200µl de EtOH 70 %. Le tube est de nouveau centrifugé pendant quinze minutes à vitesse maximale, le surnageant est enlevé, le culot doit être séché avec une pompe à vide puis repris dans 15µl de l'eau ne contenant pas d'enzyme. La concentration en ADN est calculée au Nanodrop.

### **5 . Ligation**

Cette étape permet d'insérer un fragment d'ADN au sein d'un plasmide pour être amplifié par un clone bactérien. Après la ligation le plasmide doit contenir un promoteur, un gène de résistance (dans notre cas à l'ampiciline) et le gène d'intérêt intégré au niveau du site de clonage. Plusieurs technologies ont été utilisées : le kit Gibson Assembly® Master Mix (New England Biolabs Inc.), pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega), et le TA cloning. Ayant fourni une construction de plasmide correcte pour dTomato-Smad2/3, le kit Gibson Assembly® Master Mix est le seul décrit. Des extractions de bandes (réalisées par Morgane Oudy, précédente stagiaire dans l'équipe) contenant les gènes codant pour dTomato et pour Smad2/3 ont été utilisées. Elles sont insérées dans le plasmide PCX3 (Annexe 1). La concentration des fragments à assembler doit être deux à trois fois supérieure à celle du plasmide. Puis s'ajoute 10µl de Gibson Assembly Master mix 2X. Ce mix est composé de plusieurs enzymes. Tout d'abord des exonucléases excisent une partie de l'ADN en 5' et créent des bouts collants avec une vingtaine de bases complémentaires. Ensuite les polymérases qu'il contient synthétisent les bases azotées manquantes. Une ligase est aussi présente afin de rétablir les liaisons covalentes manquantes. (Annexe 2)

### **6 . Transformation**

Afin d'identifier les plasmides ayant l'insert d'intérêt, le produit de ligation est utilisé pour transformer des bactéries compétentes. Le plasmide est incorporé au sein de bactéries thermocompétentes *Escherichia Coli* de souche XL1blue. Le plasmide codant pour un gène de résistance à l'ampiciline, il confère ainsi la résistance à cet antibiotique aux bactéries transformées. Les bactéries sont étalées sur une boîte de substrat contenant du milieu de culture contenant de l'ampiciline. Les colonies qui poussent sur celle-ci possèdent le plasmide et donc potentiellement le gène d'intérêt. Pour cela, 10µl la solution de ligation sont mélangés à 100µl de bactéries compétentes que l'on place dans de la glace pendant 20 minutes. Le tube est mis dans un bain humide à 42°C pendant 40 secondes, puis il est placé dans la glace pour une durée de 5 minutes. Après l'ajout de 300µl d'un milieu nutritif (SOB) permet de réhabiliter les bactéries, le tube est alors placé en agitation à 37° C pendant une heure. Ensuite 300µl sont étalés sur la moitié d'une boîte de substrat contenant de l'ampiciline et 30µl sont étalés sur l'autre moitié. Les bactéries sont mises à l'étuve à 37° C pour être utilisées le lendemain.

## **7 . PCR de vérification sur colonies**

La PCR de vérification sur colonies permet de cribler les bactéries ayant été transformées avec un plasmide contenant l'ADN d'intérêt. Pour cela, les clones bactériens sont piqués au moyen d'un cure dent stérilisé ou d'un cône de pipette. Elles sont repiquées et numérotées sur une nouvelle boîte de pétri puis plongées dans un mix PCR. Le mix PCR contenant des amorces spécifiques pour l'insert, cette technique permet de ne sélectionner que les clones montrant un fragment de bonne taille après PCR et électrophorèse, indiquant ainsi la présence de l'insert. Généralement dix colonies sont testées, le mélange PCR contient des dNTP à 10 mM, des amorces sens et antisens (comme T7 et T3 qui borde l'insert), d'eau MilliQ et la Taq polymérase dans son tampon à la concentration standard.

## **8 . Culture liquide et Minipreparation d'ADN plasmidique**

La culture liquide permet d'obtenir un grand nombre de bactéries à partir d'un clone bactérien choisi. Les clones à mettre en culture sont sélectionnés d'après la taille du fragment amplifié. Si une ou deux colonies semblent avoir incorporé le fragment d'ADN elles sont récupérées sur la boîte de repiquage. Des bactéries de chaque colonie sélectionnée vont être transposées dans un milieu liquide contenant de l'ampiciline, ce qui maintient une pression de sélection sur les bactéries possédant le plasmide. Elles resteront en agitation à 37 °C environ une douzaines d'heures. Une partie de la culture liquide est prélevée puis stockée à -80°C. Le stockage est possible grâce à l'ajout d'un cryoprotecteur en quantité égale, le glycérol 50 %.

Le tube initial est utilisé pour réaliser une Minipréparation d'ADN plasmidique (Kit Wizzard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de la marque). Cette étape permet d'extraire l'ADN plasmidique. La minipreparation sera envoyée au séquençage (fait par l'entreprise externe Cogenics) pour vérification. Si c'est le cas elle pourra être utilisée pour synthétiser des ARNm sens pour une surexpression de la protéine ou des sondes antisens utilisé pour l'Hybridation In Situ. Pour obtenir une miniprep le tube a été centrifugé afin d'obtenir le culot de bactéries, il est resuspendu dans 250µl d'une solution qui fragilise les membranes et dégrade l'ARN. Après transfert dans un tube eppendorf, 250µl d'une solution de lyse permettant la dégradation des cellules sont ajoutés. Le tube est retourné quatre fois. Puis l'addition de 10µl de protéase alcaline solution permet l'hydrolyse des liaisons peptidiques. Pour neutraliser le pH et précipiter l'ADN chromosomique ainsi que les constituants cellulaires bactériens, 350µl d'une solution de neutralisation sont ajoutés. L'ensemble est centrifugé à vitesse maximale pendant 10 min. Le culot obtenu est composé entre autre de membrane ADN bactérien, ou encore de protéines. Le surnageant récupéré contient l'ADN plasmidique, il est transféré sur une colonne placée sur un tube collecteur puis centrifugé 1 minute à vitesse maximale, l'effluent est jeté. L'ADN se trouve maintenant dans le filtre de la colonne, 750µl d'une solution de lavage comprenant de l'éthanol est ajouté puis le tube est centrifugé une minute à vitesse maximale. L'opération est répétée avec 250µl de solution de lavage. L'effluent est jeté, le tube est centrifugé 2 minutes pour évaporer les résidus d'éthanol. La colonne contenant le filtre et l'ADN purifié est placé sur un nouveau tube et éluée avec 80µl d'eau exempte de nucléase. Le tube est centrifugé une dernière fois afin de récupérer l'ADN plasmidique et il est ensuite dosé au Nanodrop.

## **9 . Synthèse d'ARNm**

La synthèse d'ARNm est réalisée afin de pouvoir être injectée dans des ovocytes. Une fois la protéine correspondante traduite dans l'embryon, elle sera localisée grâce à l'ajout d'une protéine fluorescente. Les ARN peuvent aussi être injectés pour mener une expérience de « rescue » ou restauration phénotypique. Tout d'abord un morpholino est injecté (séquence d'environ 25 oligonucléotides qui est antisens à l'ARNm ciblé) permettant de bloquer la transcription d'un gène

ou d'en modifier l'épissage. La perte de fonction du gène est retranscrite généralement sur le phénotype. Les ARNm correspondant au gène ciblé par le morpholino sont co-injectés avec le morpholino. Si le phénotype est retrouvé, alors l'ARN produit une protéine fonctionnelle et le morpholino injecté seul produit bien un effet le développement. Le kit mMessage mMachine (Ambion) a été appliqué pour synthétiser des ARNm dotés d'une coiffe (7-méthyl guanosine) en leur extrémité 5'. Une queue poly A lui est ensuite ajoutée pour le stabiliser.

## **10 . Micro-injection**

Afin d'observer l'effet d'un gène sur le développement de l'organisme, un morpholino est injecté dans les ovocytes avant la fécondation. Pour cela, les morpholinos sont incubés à 60 °C pendant 10 minutes puis centrifugés à vitesse maximale pendant 10 minutes à température ambiante afin de précipiter les déchets solides pouvant boucher l'aiguille lors de l'injection. Les ovocytes sont alignés dans la chambre à injection (moule contenant de l'eau de mer). Ils sont injectés à l'aide d'un injecteur «FemtoJet» à flux continu (Eppendorf).

J'ai effectué les manipulations numérotées de 5 à 10 pour l'étude de l'activation de Smad2/3. Concernant le récepteur les manipulations 2 à 8 ont été appliquées.

## **1 . L'Hybridation In Situ (HIS)**

### **1 . Fixation des embryons**

La fixation consiste à arrêter la croissance des embryons et à les conserver en leur état. Les embryons sont fixés à l'aide d'une solution contenant pour 10ml, 1ml de Formaldéhyde et 0.08 ml de Glutaraldéhyde et 9ml de PBS 1X, et ils incubent sur glace pendant deux heures. Ils sont lavés 5 fois à intervalle de 10 minutes dans une solution de PBST (5ml de PBS, 0.5ml de Tween 20 et 44.5 ml d'eau MilliQ). Puis, ils sont déshydratés pendant 10 minutes dans une solution composée de méthanol et de PBST tout deux à 50%. Enfin, les embryons sont placés 10 minutes dans du méthanol 100% et sont stockés à -20 °C dans le méthanol pur.

### **2 . Réhydratation**

La réhydratation est effectuée peu avant la mise en marche du robot. Les embryons sont lavés à l'aide de 50 % de méthanol et 50 % de PBST pendant quinze minutes puis ils sont rincés avec du PBST trois fois pendant cinq minutes.

### **3 . Hybridation in Situ**

Cette technique est utilisée car elle permet de localiser l'expression des gènes. Des sondes marquées à la digoxigénine sont utilisées pour cibler l'expression d'un gène. Ces sondes vont s'hybrider à l'ARNm codant pour le gène étudié. Les anticorps anti-digoxigénine vont se fixer à la digoxigénine sur les sondes et une solution de révélation rendra l'expression génétique visible à la loupe binoculaire.

Tout d'abord 30 à 40 embryons réhydratés sont placés dans chaque pаниère de la plaque prévue à cet effet. La suite des étapes est effectuée par un robot (InsituPro VS® ; Intavis AG Bioanalytic Instruments). Les embryons sont incubés dans du PBST deux fois vingt minutes, puis à 60°C dans une solution de 50 % de tampon d'hybridation (12.5 ml de SSC 5X, 25 ml de Formamide déionisé à 50%, 50 µl d'ARNt, 50 µl d'Héparine 1X, 0,5 g de Dextran 1 %, 2,5ml de SDS 1%) et 50% de PBST pendant vingt minutes. Une pré-hybridation est réalisée pendant 2 heures à 60°C avec du tampon d'hybridation. L'hybridation se fait ensuite pendant 30 H à 60°C dans du tampon d'hybridation contenant les sondes marquées à la digoxigénine. Les embryons sont lavés 4 fois 30 minutes à 60 °C avec une solution contenant 12,5 ml de SSC 5X, 25 ml de Formamide déionisé 50%, 0,5 ml de Tween20 0,1% et 12 ml d'eau MilliQ. Ils sont de nouveau lavés 4 fois

pendant 30 minutes à 60 °C avec une solution de lavage dont seul le volume en eau, et en SSC change : 5ml de SSC et 19.5 ml d'eau MilliQ. Le dernier lavage est effectué 2 fois pendant 20 min à température ambiante avec une solution contenant 1ml de SSC 2X, 0,1 ml de Tween20 0,1% et 8,9ml d'eau MilliQ. Les embryons sont ensuite incubés 2 fois 20 minutes dans du MABT (100 ml de MAB, 5ml de Triton 0,1% et 895 ml d'eau MilliQ). Puis ils incubent pendant 1h avec avec l'agent bloquant BOEHRINGER dans du MABT. Ensuite des anticorps anti-DIG (anti-digoxigénine) sont ajoutés, dilués aux deux millièmes avec du MABT ; cette étape dure 3 heures. Ces anticorps vont se fixer à la digoxigénine présente sur les sondes. Les embryons sont lavés 7 fois pendant 20 minutes dans du MABT. Ils sont ensuite incubés 3 fois 20 minutes dans du TMNT (5 ml de Tris-Hcl à 100 mM, 0.833 ml de MgCl à 50mM, 1.7 ml de NaCl à 100 mM, 0.5 ml Tween20 0,1% et 42 ml d'eau MilliQ). Les étapes suivantes sont exécutées manuellement. Les embryons sont transférés dans une autre plaque où les puits contiennent du TMNT. Puis ils sont incubés dans le noir avec la solution de révélation composée de 16 µl de NBT (50mg/ml), 20 µl BCIP (50mg/ml) et 10 ml TMNT. La réaction est stoppée quand les échantillons présentent une révélation suffisante. Ils sont rapidement lavés deux fois avec de l'eau et trois fois avec du PBS. Ils sont ensuite fixés avec du Formaldéhyde 3.7% et du PBS durant une heure à température ambiante et sont lavés 3 fois 10 minutes au PBST et puis mis dans une solution contenant la même quantité de glycérol que de PBS. Enfin, les embryons sont montés entre lame et lamelle.

## 11 . Imagerie

Les photos des HIS ont été prises à partir d'une loupe binoculaire de marque Olympus. Le logiciel associé permet de sélectionner des réglages adaptés et de projeter la lame à l'écran. Les réglages concernant entre autre la luminosité et l'orientation de l'embryon sont effectués manuellement.

Un microscope à épi-fluorescence a été utilisé sur des embryons vivants afin de déterminer la localisation de la protéine dTomato-Smad2/3. Il permet d'observer un échantillon en par épi-fluorescence grâce à des protéines émettant une fluorescence naturelle ou par marquage spécifique. Les fluorochromes utilisés comme marquage sont hoechst et dTomato. Hoechst est capable de rendre visible l'ADN quand il est excité à une lumière à 350 nm, et dTomato permet d'observer la présence de la protéine Smad2/3 à l'aide d'une émission lumineuse de 580nm. La GFP, naturellement produite par Clytia, émet une fluorescence verte quand l'échantillon est soumis à une lumière de 395nm.

## IV. Résultats et discussions

### 1. Synthèse de l'ARNm Smad2/3 et localisation de la protéine active.

Le but de cette manipulation est de déterminer la localisation de l'activation de la voie Smad2/3. Aucun anticorps anti-Smad2/3 dans sa version phosphorylée ne fonctionne chez les cnidaires, une protéine fusion dTomato-Smad2/3 a donc été construite (Annexe 3). DTomato est une protéine de fluorescence rouge qui permettra d'observer la présence de la protéine à l'aide d'une émission ultraviolet à 580nm. Les autres modèles utilisent en général la GFP mais chez les cnidaires la GFP est endogène. Après transformation du produit de ligation, une PCR sur colonie a permis d'identifier le clone 7 comme ayant la taille de fragment attendue (3000pb). (Annexe 4)

Un séquençage de la minipréparation du clone 7 permet de confirmer que le clone bactérien possède l'insert désiré. L'ARNm est synthétisé et injecté une première fois à une concentration de 0,5µg/µl, alors que des œufs non injectés sont utilisés comme contrôle. Le développement embryonnaire n'était pas optimal mais la protéine était présente car la fluorescence rouge était visible. Une deuxième injection a été réalisée en abaissant la concentration à 0,25µg/µl. En effet injectés en trop grande quantité les ARNm peuvent perturber le développement. Le composé Hoechst permettant de localiser les noyaux est injecté et la fluorescence de la protéine GFP est aussi utilisée. Après injection, les embryons sont étudiés au stade gastrula et planula.

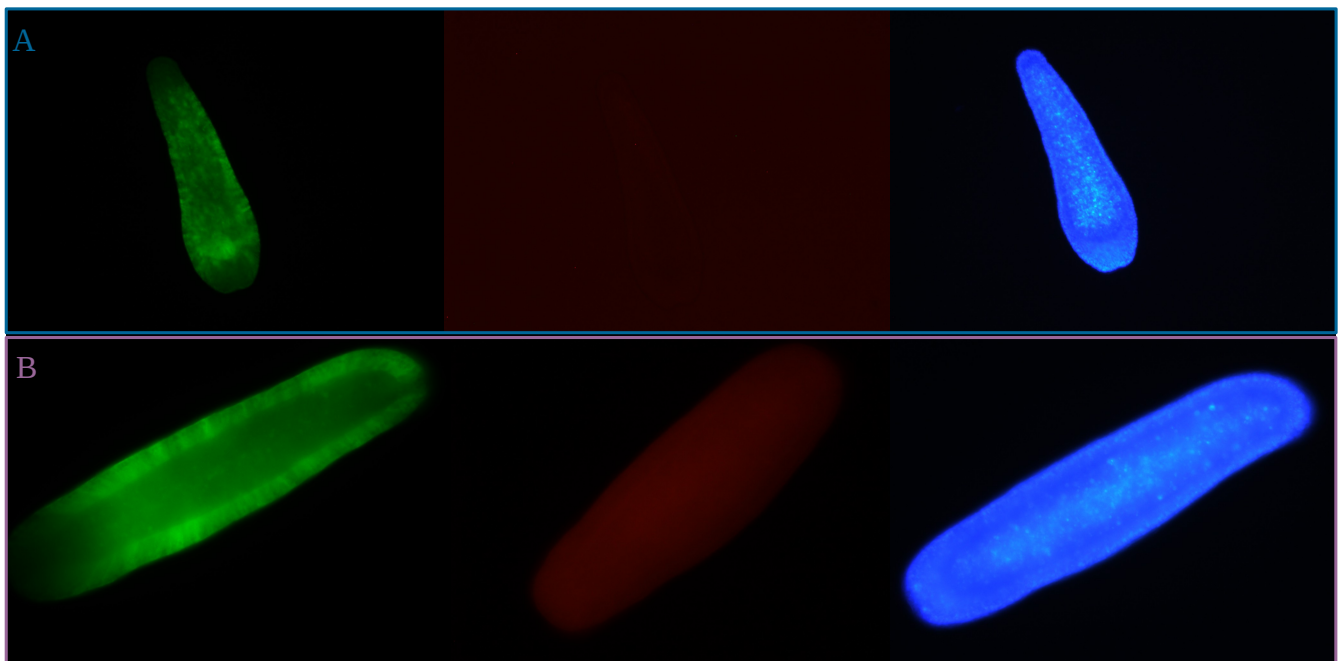


Figure 4: Planula observée sous microscope à épi-fluorescence. A) Embryons contrôles n'ayant pas subi d'injection. B) Embryons injectés avec l'ARNm codant pour dTomato-Smad2/3

La fluorescence de la GFP permet de distinguer la morphologie dans les embryons injectés et non-injectés. Seuls les embryons injectés présentent une couleur rouge à la longueur d'onde de 580nm, à la différence des non injectés. Ce résultat suggère que la fluorescence observée n'est pas de l'autofluorescence de l'embryon et que l'ARN injecté a bien été traduit en protéine dans l'embryon. Cependant, nous n'avons pas pu observer de marquage nucléaire. Une injection de l'ARN en trop grande quantité peut expliquer cela. Une fluorescence trop importante peut saturer le système et rendre difficile la différence entre ce qui doit être représenté en noir ou en rouge. D'autres possibilités peuvent être en cause comme le recrutement de la protéine Smad2/3 endogène plutôt que dTomato-Smad2/3 ou bien une impossibilité pour la protéine d'être transloquée au noyau à cause de l'ajout du domaine Tomato.



Pour répondre aux deux derniers points, une expérience de « rescue » a été réalisée pour vérifier que la protéine reste fonctionnelle. Lors d'expériences précédentes, un morpholino est dirigé contre le codon start de Smad2/3 pour empêcher la traduction des ARNm. Les embryons injectés avec le morpholino dirigé contre Smad2/3 montrent une absence d'endoderme, traduisant un défaut de TEM. Or le phénotype est restauré quand l'ARN Smad2/3 est injecté. Le but est d'obtenir une restitution du phénotype sauvage après l'injection du morpholino (à 1mM) et de l'ARNm synthétique dTomato-Smad2/3 (à 0,25mM), si celui-ci est traduit en une protéine fonctionnelle.

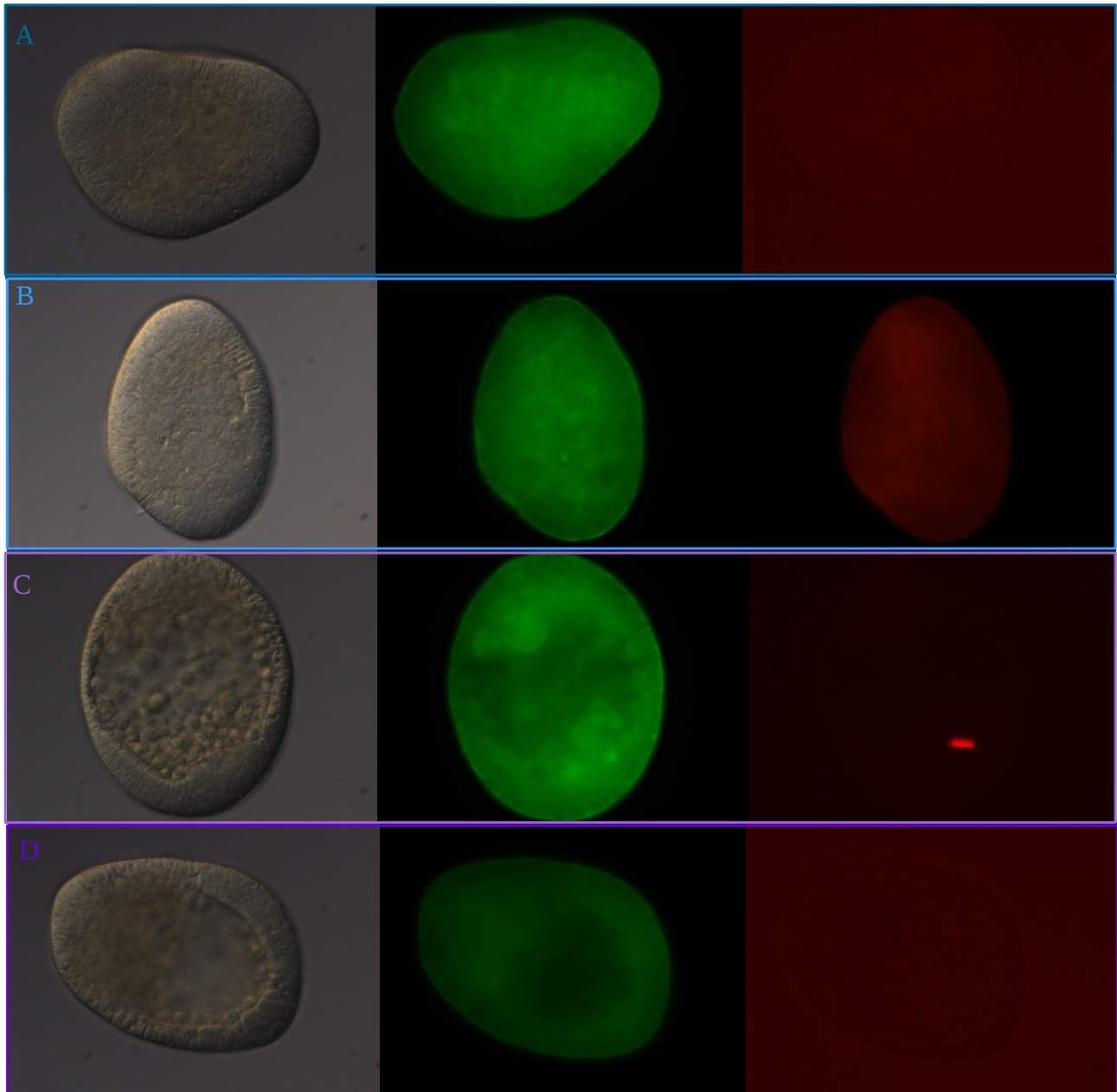


Figure 5: Embryons observés sous microscope à épi-fluorescence. A) Embryons contrôles n'ayant pas subi d'injection. B) Embryons injecté avec l'ARNm codant pour dTomato-Smad2/3. C) Embryon injecté avec le morpholino Smad2/3. D) Embryon injecté avec l'ARNm dTomato-Smad2/3 et le morpholino Smad2/3

Le phénotype n'a pas été restauré pour les embryons injectés avec le morpholino et l'ARNm. Les phénotypes pour les embryons contrôles et injectés avec l'ARN seul sont identiques. Toutefois, on ne peut conclure que la protéine n'est pas fonctionnelle. L'embryon ayant subi une double injection ne présente aucune fluorescence rouge, tout comme le contrôle à l'inverse de ceux injectés avec l'ARN seul. La traduction de la protéine dTomato-Smad2/3 a vraisemblablement été

bloquée par le morpholino. Pourtant huit misappariements sont dénombrés entre la séquence du morpholino et celle de l'ARNm synthétisé. Ils n'ont pas suffi à éviter l'appariement entre les deux séquences. Afin d'éviter que le morpholino ne bloque l'ARNm, des mutations silencieuses peuvent être générées avant sa synthèse.

Si la protéine s'avère bien être fonctionnelle, elle peut aussi être localisée grâce à une construction comprenant la protéine histone ou utropine et le composant fluorescent jaune venus. Histone suivie de venus permet de révéler l'ADN, et utropine suivie de venus permet de mettre en avant l'actine. Ainsi injectés séparément avec l'ARNm de dTomato-smad2/3, la localisation pourrait être plus facilement déterminée. L'ajout d'une séquence de la même taille que celle de Smad2/3 est un élément à prendre en compte, il pourrait rendre la protéine défectueuse. Si un changement de conformation est situé dans la région C-terminale il bloquerait la phosphorylation de Smad2/3, et de ce fait son activation. Une taille trop importante pourrait aussi empêcher sa translocation.

## 2 . Expression des ligands TGF5, TGF6 et TGF7

A ce jour, aucun ligand ne semble exprimé préférentiellement au pôle oral chez *Clytia hemisphaerica*. Il a été envisagé par mon maître de stage que l'induction de la TEM soit un rôle porté par TGF5, TGF6 et TGF7. Ces trois ligands sont nommés par le terme générique de la superfamille car ils n'ont pas de position phylogénétique définitive. Une Hybridation In Situ (HIS) a été effectuée pour révéler leur expression grâce à des sondes ARN antisens qui leurs sont spécifiques. Les embryons ont été fixés au stade de « early gastrula » ou EG (environ 19h ), de planula 1 ou P1 (stade de larve atteint 24h après la fécondation) et planula 2 ou P2 (48h après la fécondation).



Figure 6: Expression du ligand TGF7. Hybridation in situ au stade « early gastrula » (A), planula 24h (B) et planula 48h (C)

Bien que le ligand TGF7 soit exprimé de manière ubiquitaire dans l'embryon, une expression préférentielle est discernable dans certaines cellules tapissant le blastocœle. (Figure 6A) Elles pourraient être les premières cellules à migrer. Ce qui fait de TGF7 un candidat intéressant pour l'induction précoce de la formation de l'endoderme par la TEM. Ce ligand semble plus fortement exprimé dans des cellules endodermiques au front de migration des cellules (pôle aboral) en P1. Les larves P2 présentent une expression généralisée mais néanmoins plus importante dans l'endoderme au pôle aboral.

Le ligand TGF7 pourrait donc jouer un rôle dans l'induction du signal de migration des cellules endodermiques. Pour que cette hypothèse soit vérifiée un morpholino dirigé contre l'ARNm de TGF7 doit être injecté, et une perte de fonction provoquant un retard dans la TEM (donc dans la gastrulation) doit être observé.



**Figure 7:** Expression du ligand TGF6. Hybridation in situ au stade "early gastula" (A), planula 24h (B) et planula 48h (C)

Le ligand TGF 6 paraît n'être peu, voir pas exprimé au stade EG et P1. En outre, une faible expression située dans l'endoderme est visible au stade P2 (Figure 7). Le ligand pourrait avoir un rôle dans le développement tardif de l'endoderme, mais il n'a probablement pas de rôle dans l'induction de la TEM.



**Figure 8:** Expression du ligand TGF5. Hybridation in situ au stade "early gastula" (A), planula 24h (B) et planula 48h (C)

Quant au ligand TGF5, il semble être exprimé de manière ubiquitaire au stade EG. Pour les larves P1 et spécifiquement P2 l'expression de TGF5 est plus fortement exprimée dans tout l'endoderme (Figure 8). Ce ligand ne paraît pas, tout comme TGF6, être impliqué dans le début du signal menant à la TEM.

Les informations que l'on peut dégager d'une Hybridation In Situ ne sont pas quantitatives. Cette technique permet d'observer le contraste et la localisation de l'expression d'un gène, cela à différents stades de développement. Les résultats sont fonction du temps passé par les embryons dans la solution de révélation. Réaliser une autre HIS serait envisageable car les répliques peuvent confirmer et affiner l'expression obtenue pour ces ligands.

Les schémas de localisation des ligands TGF5 et TGF6 ont été obtenus, mais ils n'ont pas fourni d'informations exploitables. Cependant, la localisation de l'expression de TGF7 dans des cellules du blatocœle au stade « early gastrula » permet de le considérer comme un protagoniste possible dans l'induction de la TEM. Le rôle de celui-ci pourra être défini grâce à l'injection d'un morpholino approprié.



### 3 . Isolement et fonctionnement d'un nouveau récepteur

Peu après mon arrivée un nouveau récepteur de type II a été découvert dans de nouvelles bases de données transcriptomiques. Une recherche PCR dans l'ANDc des embryons au stade EG est réalisée avec des amorces spécifiques. Elle est suivie d'une PCR supplémentaire avec la Taq polymérase afin d'ajouter une base A aux extrémités de l'insert nécessaire à la ligation dans p-GEMT-easy. Plusieurs ligations ont été opérées, cependant les minipréparations obtenues après transformation des produits de ligation ne présentaient pas la bonne séquence.

Pour obtenir ce gène dans un plasmide, deux techniques de ligation ont été utilisés (pGEM®-T Easy Vector Systems et TA cloning). Avec la technologie pGEM®-T easy des ratios différents ont été testés : ratio molaire trois fois plus important pour l'insert que pour le vecteur, et ratio molaire quatre fois plus important pour l'insert. Les temps de ligation ont aussi été allongés. Les concentrations en ADN étant faibles après une extraction de bande, celui-ci a dû être reconcentré.

## V. Conclusion

L'ARNm dTomato-Smad2/3 a été traduit dans les embryons, mais sa localisation dans les noyaux n'a pas été observée. La protéine synthétisée étant bloquée par le morpholino, nous ne pouvons pas encore déterminer si cette dernière est fonctionnelle. D'autres ovocytes doivent donc être injectés avec l'ARNm ayant subi des mutations silencieuses sur la séquence ciblée par le morpholino de Smad2/3 afin de vérifier la fonctionnalité de la protéine traduite. De plus, pour situer Smad2/3, les protéines histone et utropine combinées au composé fluorescent venus devront être injectés.

La localisation de l'expression des ligands a permis de détecter si un des ligands était susceptible d'entraîner une TEM. C'est le cas du ligand TGF7 qui est exprimé au stade EG dans certaines cellules du blastocœle. En outre, une expression ubitaire tel que TGF5 n'est pas un résultat à écarter. En effet, le récepteur d'un ligand peut être localisé où la voie est active et non l'expression du ligand. Les expressions tardives visibles dans l'endoderme pour les trois ligands jouent sûrement un autre rôle dans la voie de signalisation TGF-B car au stade de planula la TEM est achevée.

Le schéma d'expression, et la localisation du nouveau récepteur de type II n'a pu être déterminé au cours de mon stage. Les bandes obtenues après PCR sur colonies étaient à la bonne taille (800 pb environ) mais les minipréparations n'ont pas fourni de plasmide utilisable. Un autre système de ligation doit être expérimenté.

Chez *Clytia hemispharica* la perte de fonction de Smad2/3 bloque entièrement la TEM. Les gènes en aval de son action sont alors plus simplement identifiables. Le travail est donc à poursuivre afin d'approfondir les connaissances sur les protagonistes de la voie de signalisation TGF- $\beta$  et leurs rôles. Il est envisageable que les applications thérapeutiques développées soient utilisée d'ici peu.

## **VI. Bilan personnel**

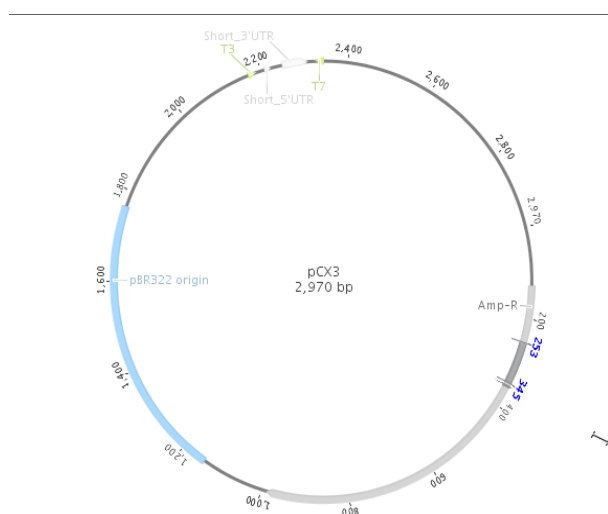
Ce stage fut une succession de découvertes, notamment celle du monde professionnel dans le domaine de la recherche fondamentale. Celui-ci m'a permis d'aborder le type de travaux effectués au quotidien dans un laboratoire de ce type. J'ai beaucoup appris en mettant en pratique des techniques étudiées pendant la licence. J'ai aussi pu découvrir comment une équipe de recherche fonctionne et s'organise. Par ailleurs, j'ai aussi pu appréhender les difficultés auxquelles les équipes de recherche doivent faire face. Les contraintes apportées, notamment par un modèle biologique vivant et par les outils de biologie moléculaire, nécessitent que les travaux de biologie du développement s'inscrivent dans une durée importante. En effet, de nombreuses étapes doivent être validées avant d'observer un quelconque résultat. Je n'ai pas échappé à de nombreuses frustrations face à l'échec répétée de manipulations, mais la persévérance est une qualité requise dans le cadre de tout contexte de recherche.

Pour autant, je suis enchantée d'avoir eu la possibilité de découvrir cet environnement de travail. Cette expérience m'aura incontestablement permis de progresser et de m'enrichir.

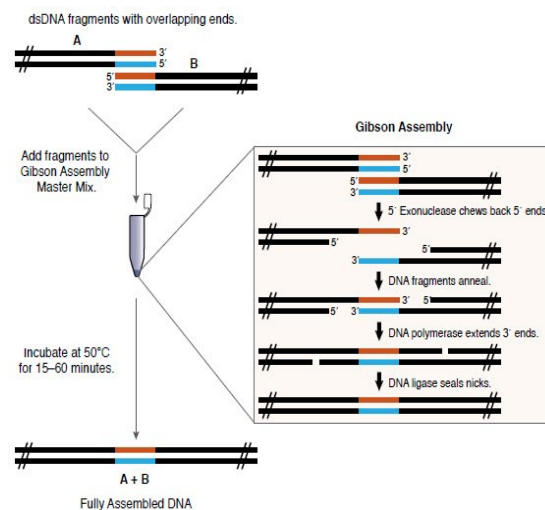
## VII. Référence bibliographique

- 1: Baker J.C. et Harland R.M., 1997. From receptor to nucleus: the Smad pathway. *Current Opinion in Genetics & Development*, **7**, 467-473.
- 2: Blobe G.C., Schiemann W.P. et Lodish H.F, 2000. Role of transforming growth factor- $\beta$  in human disease. *The New England Journal of Medicine*, **342**, 1350–1358.
- 3: Chin D., Boyle G.M., Parsons P.G., Coman W.B., 2004. What is transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ )?. *The British Association of Plastic Surgeons*, **57**, 215–221.
- 4: Dennler S., Goumans M.J., et Dijke P., 2002. Transforming growth factor- $\beta$  signal transduction. *Journal of Leukocyte Biology*, **71**, 731-740.
- 5: Dijke P. et Hill C.S., . New insights into TGF- $\beta$  Smad signalling. *Biochemical Sciences*, **29**, 268-273.
- 6: Hoot K.E., Lighthall J., Han G., Lu S.L, Li A., Ju W., Martin M.K., Bottinger E., et Wang X.J, 2008. Keratinocyte-specific Smad2 ablation results in increased epithelial-mesenchymal transition during skin cancer formation and progression. *The Journal of Clinical Investigation*, **118**, 2722-2732.
- 7: Lamouille S., Jian X. et Derynck R., 2014. Molecular mechanisms of epithelial - mesenchymal transition. *Nature Reviews*, **15**, 178 -189.
- 8: Massagué J., Seoane J. et Wotton D., 2015. Smad transcription factors. *Genes & Development*, **19**, 2783- 2810.
- 9: Ross S. et Hill C.S., 2008. How the Smads regulate transcription. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* , **40**, 383–408.
- 10: Xu J., Lamouille S., Derynck R., 2009. TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition . *Cell Research ed 1*, **19**, 156-172.
- 11: Zavadil J. et Bottinger E.P., 2005. TGF-b and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene*, **24**, 5764–5774.
- 12: Wu M.Y., et Hill C.S., 2009. TGF-b Superfamily Signaling in Embryonic Development and Homeostasis. *Developmental Cell*, **16**, 329-340.

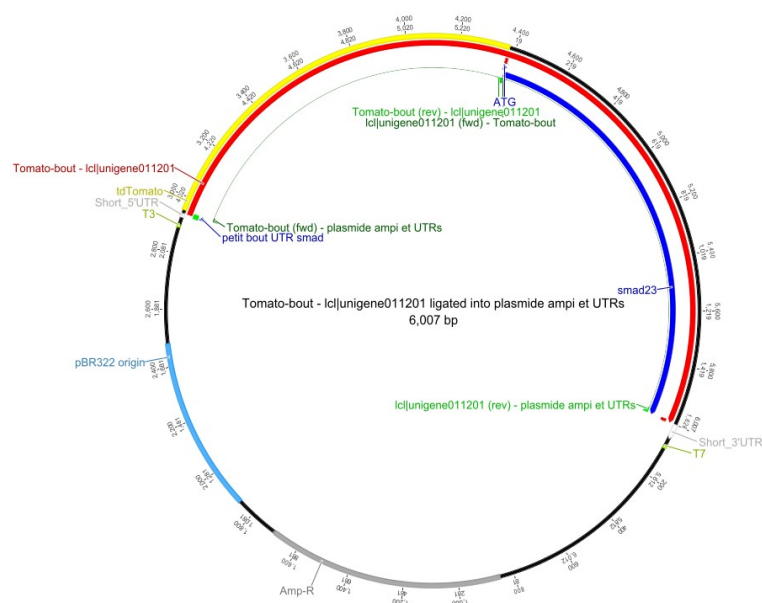
## Annexes



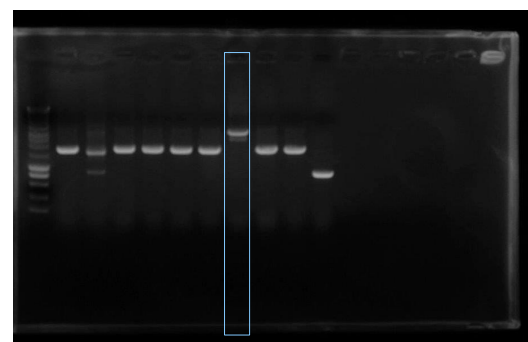
Annexe 1: Structure du plasmide PCX3



Annexe 2: Représentation schématique du mécanisme de ligation avec le kit Gibson Assembly Master Mix



Annexe 3: Structure du plasmide contenant l'insert dTomato-Smad2/3



Annexe 4: Gel électrophorèse des produits de la PCR de vérification sur colonies. Le clone 7 présente la taille de l'insert dTomato-Smad2/3 (3000pb)

| Intervenant | Idée originale | Bibliographie | Mise en place du protocole | Manipulation s | Rédaction |
|-------------|----------------|---------------|----------------------------|----------------|-----------|
| Principal   | PL             | CL            | PL                         | CL             | CL        |
| Secondaire  |                |               | CL                         |                |           |

Annexe 5 : Tableau de la répartition des tâches

CL: Charlotte Lefebvre, stagiaire  
PL: Pascal Lapébie, maître de stage

|                 | Semaine 1 | Semaine 2 | Semaine 3 | Semaine 4 | Semaine 5 | Semaine 6 | Semaine 7 |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Bibliographie   |           |           |           |           |           |           |           |
| Expérimentation |           |           |           |           |           |           |           |
| Rédaction       |           |           |           |           |           |           |           |

Tableau 2 Calendrier du stage

## Résumé

La voie de signalisation TGF- $\beta$  est impliquée dans de nombreuses réponses physiologiques normales tel que l'élaboration du plan d'architecture lors du développement. Par ailleurs cette voie peut aussi engendrer des phénomènes pathologiques comme la progression cancéreuse. Chez l'Hydrozoaire *Clytia Hemisphaerica*, la voie de signalisation TGF- $\beta$  est mobilisée dans la mise en place de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM). Ce modèle biologique récent permet une étude plus aisée des divers mécanismes qui composent cette voie. La ponte régulière et abondante d'œufs transparents et le très faible polymorphisme génétique des méduses élevées en laboratoire comptent parmi ces avantages.

L'objectif de ce stage était de localiser la protéine active Smad2/3 grâce à la protéine fluorescente dTomato, de définir les schémas d'expression de trois ligands TGF et de déterminer un nouveau récepteur de type II. Pour cela des technologies de biologie et génétique moléculaire ont été utilisées (clonage au sein de plasmide, minipréparation, hybridation in situ,...). Le présent rapport expose les expérimentations mises en place au sein de ce projet.

Mots clefs : Voie de signalisation TGF- $\beta$ , biologie du développement, transition épithélio-mésenchymateuse, biologie moléculaire, expression génétique, gastrulation.