

# Chapitre 15

## Le contrôle de l'expression génétique

### Cours

#### PLAN DU CHAPITRE

- 1 Diversité des influences conduisant aux phénotypes
- 2 Contrôle de la transcription par modification de la chromatine
- 3 Contrôle de l'initiation de la transcription
- 4 Contrôle post-transcriptionnel par interférence ARN
- 5 L'établissement du phénotype et son hérédité

#### ZOOM

- 1 L'établissement du protéome
- 2 L'hybridation *in situ*
- 3 La technique qRT-PCR
- 4 La mutagenèse
- 5 L'établissement du transcriptome
- 6 Le contrôle du gène FLC
- 7 Les facteurs de transcription spécifiques

#### INTRODUCTION

Au sein d'un organisme, une même information génétique conduit à des phénotypes cellulaires différents, par **l'activation ou la répression sélective d'un ensemble de gènes**. Ces **profils d'expression** varient spatialement, d'un tissu à un autre ou au sein des tissus, et temporellement, durant la vie cellulaire.

Ils sont à l'origine de la **diversification cellulaire** et de la **spécialisation des tissus**.

Aujourd'hui le **phénotype** apparaît comme le résultat de contrôles multi-niveaux où se combinent les caractéristiques génétiques et épigénétiques du génome. Les premières s'appuient sur les séquences géniques que porte l'ADN, les secondes sur les modifications de la chromatine.

➔ **Quels sont les facteurs qui influencent les caractéristiques phénotypiques et comment l'expression du génome est-elle contrôlée ?**

À partir d'exemples, deux grands niveaux de contrôle de la **dynamique de l'expression du génome** seront envisagés :

- le contrôle épigénétique porte sur les modifications de la chromatine ;
- les contrôles transcriptionnel et post-transcriptionnel dépendent des séquences géniques que porte l'ADN.

Il sera aussi mis en évidence l'action combinée des différents systèmes de contrôle qui collaborent à la mise en place du phénotype.

## Diversité des des influences conduisant aux phénotypes

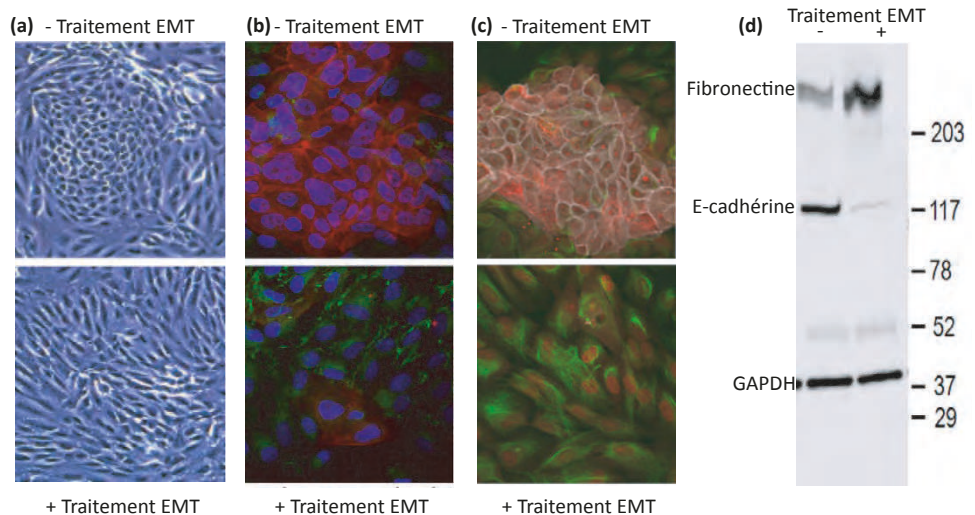
### 1.1 Le phénotype dépend de l'expression du génome

L'étude de la transition épithélium/mésenchyme (EMT) (*Epithelial-Mesenchymal Transition*) qui intervient à des différents moments (développement embryonnaire, cicatrisation des plaies, cancers) peut servir à montrer quels facteurs influencent un changement de phénotype. Les cellules épithéliales perdent alors leurs caractéristiques (polarité apico-basale, cohésion intercellulaire au sein d'un tissu) et deviennent mésenchymateuses (allure fusiforme et capacité à se déplacer dans les tissus).

#### a) Le phénotype dépend du protéome

Ces modifications phénotypiques sont induites par des messagers intercellulaires, comme le **facteur de croissance TGF- $\beta$**  (*transforming growth factor  $\beta$* ). Il est donc possible de suivre cette transition après un traitement à base de TGF $\beta$ .

La **figure 15.1** montre les modifications phénotypiques associées à la transition EMT, et les résultats de localisation par immunocytochimie, de protéines particulières. Le *western blot* complète ces observations et permet en plus d'apprécier la quantité de protéines présentes (**figure 15.1c**).



**Figure 15.1** Étude des cellules épithéliales mammaires (MFC10A) sans (-) et avec (+) traitement stimulant l'EMT.

(D'après *Induction and Analysis of Epithelial to Mesenchymal Transition*, Yixin Tang et al. doi:10.3791/50478).

(a) Aspect des cellules (MO x 400) ; (b) marquage immunocytochimique en rouge des E-cadhérines et en vert de la fibronectine, le bleu marque les noyaux ; (c) marquage immunocytochimique en gris des E-cadhérines et en vert de la vimentine ; (d) *western blot* de la totalité des lysats et repérage avec des anticorps marqués de la fibronectine, de la E-cadhérine et du GAPDH (témoin de charge).

Il apparaît alors que certaines protéines sont associées à un phénotype cellulaire donné (**tableau 15.1**) ; elles constituent le **protéome** des états de ces cellules.

Voir chapitre 5,  
figure 5.2a

**Tableau 15.1** Corrélation entre les caractéristiques cytologiques et le contenu protéique des cellules dans le processus EMT.

	État cellule épithéliale MFC10A (-EMT)	État cellule mésenchymateuse (+EMT)
<b>Phénotype</b>	Petite taille, immobiles et cohésives.	Fusiforme, de grande taille, migratrices et invasives.
<b>Protéines</b>	E-cadhérines membranaires	- Absence de E-cadhérines - Fibronectine - Vimentine

**ZOOM 1**

L'établissement du protéome

Voir chapitre 14, § 3

**ZOOM 2**

L'hybridation *in situ*

**ZOOM 2**

La technique qRT-PCR

**b) Le protéome dépend du transcriptome**

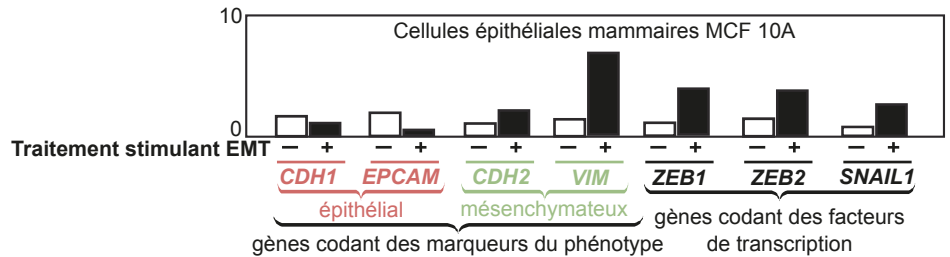
Les protéines sont traduites à partir d'ARNm issus de l'expression de gènes spécifiques. L'ensemble des ARN transcrits, à un moment de la vie cellulaire, lors de l'expression d'une partie du génome, constitue le **transcriptome**. Il est composé des ARNm codants et des ARN non-codants comme les ARNt, ARNr et autres types.

L'étude du transcriptome s'appuie sur différentes techniques, notamment :

- la recherche de l'ARN du gène d'intérêt sur les coupes histologiques au moyen de sondes polynucléotidiques complémentaires de la séquence, c'est l'**hybridation *in situ*** ;
- la purification des ARN totaux (dont les ARNm) permet de quantifier le niveau d'expression du gène d'intérêt par la technique **qRT-PCR** (*quantitative Transcriptase Reverse-Polymerase Chain Reaction*).

L'étude du transcriptome lors de l'EMT (figure 15.2) montre que la transition s'accompagne :

- de la diminution de l'expression de gènes codant des protéines caractéristiques du phénotype épithélial (*CDH1* qui code la E-cadhérine et *EPCAM* qui code une autre molécule d'adhérence intercellulaire) ;
- de l'augmentation de l'expression d'autres gènes codant des protéines caractéristiques du phénotype mésenchymateux (*CDH2* codant une autre cadhérine et *VIM* qui code la vimentine) ;
- de l'augmentation de l'expression de gènes (*ZEB1*, *ZEB2*, *SNAIL1*) qui codent des facteurs de transcription.



**Figure 15.2** Variations du niveau d'expression des gènes associées à la EMT (*ZEB1*, *ZEB2*, *SNAIL1*).

(D'après *EMT is associated with an epigenetic signature of ECM remodeling genes*, Paul Peixoto et al., doi.org/10.1038/s41419-019-1397-4).

Les mesures sont réalisées avec la méthode qRT-PCR sur des cellules non traitées (barres blanches) et traitées (barres noires) par un stimulant de la EMT.

L'étude du transcriptome est complémentaire de celle du **protéome** ; elle permet de préciser les gènes qui contrôlent la mise en place des différents phénotypes.

Voir chapitre 14,  
§ 2.2

### c) La correspondance transcriptome-protéome-phénotype

Même si les protéines sont issues de la traduction des ARNm, on ne peut pas considérer le protéome comme le reflet exact du transcriptome.

- Les ARNm ne sont pas tous traduits car certains sont dégradés.
- La durée de vie des ARNm est limitée et différente de celle des protéines.
- Les ARNm sont issus d'épissages alternatifs à l'origine de plusieurs protéines.

De même le lien phénotype et protéome n'est pas simple.

- Les protéines connaissent une dégradation sélective mettant en jeu par exemple les protéasomes.
- Les modifications post-traductionnelles donnent des protéines dont les propriétés fonctionnelles sont différentes.

Ainsi cet exemple montre que la mise en place du phénotype est le résultat de la transcription d'une partie des gènes portés par l'ADN en ARN (dont l'ensemble constitue le transcriptome), mais aussi de la traduction des ARNm en protéines (dont l'ensemble constitue le protéome). Les deux profils (transcriptomique et protéomique) sont contrôlés par différents facteurs.

## 1.2 Les facteurs de contrôle de l'expression d'un gène

Les phénotypes résultent de l'intervention de **facteurs internes** à l'organisme (messagers intercellulaires ou intracellulaires) et de facteurs biotiques ou abiotiques de l'environnement.

### a) Des messagers intercellulaires

La construction d'un organisme et son développement mettent en jeu des messagers qui modifient l'expression des gènes des cellules cibles. Dans le cas de la EMT les changements phénotypiques sont activés par le messager TGF $\beta$ . Cette protéine synthétisée par une cellule, diffuse dans la matrice extracellulaire et se lie à un récepteur membranaire. Ce complexe active alors la formation de signaux intracellulaires qui modifient l'expression des gènes codant pour les molécules de la membrane plasmique, du cytosquelette, de la matrice extracellulaire, comme cela a été vu dans la partie précédente. Un tel processus oriente le devenir des cellules notamment dans la voie de la **différenciation**.

### b) Les produits de l'expression d'autres gènes

Les messagers intracellulaires peuvent être des produits d'expression d'autres gènes. Par exemple la formation de la fleur est précédée de la transformation du méristème apical caulinaire en méristème floral. Cet exemple permet d'étudier le contrôle du phénotype déterminé par une cascade d'expression de gènes.

Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, on dispose de deux souches mutantes, *agamous-1* (*ag-1*) et *giant killer* (*gik*), présentant des phénotypes floraux différents de la souche sauvage *WT* (*Wild Type*).

Les mutants *agamous-1* montrent des fleurs dont les étamines sont remplacées par des pétales et les carpelles par des sépales. Les mutants *giant killer* présentent des étamines et carpelles déformées.

L'expression du gène *GIK* est étudiée chez les mutants *agamous-1* (*ag-1*) et *giant killer* (*gik*) (figure 15.3).

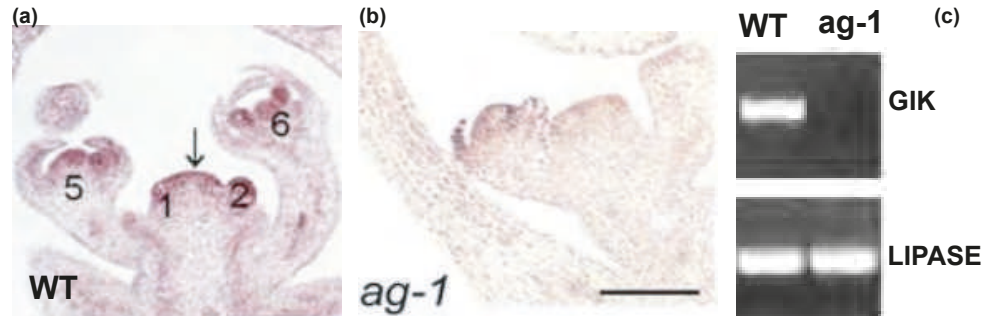
- L'ARNm transcrit du gène *GIK* est détecté par hybridation *in situ* dans les territoires à l'origine des pièces florales chez *WT* mais pas chez les mutants *ag-1* (figure 15.3a et b).
- L'absence de l'expression de *GIK* est confirmée par une étude qRT-PCR chez la souche *ag-1* (figure 15.3c).

Voir ouvrage de  
2<sup>e</sup> année

#### ZOOM 4

La mutagenèse

Ces résultats montrent que *GIK* s'exprime dans les territoires qui participent à la mise en place des pièces florales chez *WT* et qu'il ne s'exprime pas chez les mutants *agamous-1*, suggérant un lien entre ces deux gènes. D'autres travaux montrent en effet le gène *AGAMOUS-1* code un facteur de transcription qui contrôle l'expression du gène *GIK* qui à son tour code un autre facteur de transcription agissant sur l'expression d'autres gènes.



**Figure 15.3** Expression du gène *GIK* au niveau de méristèmes floraux d'*Arabidopsis thaliana* chez *WT* et *ag-1*.

(D'après *AGAMOUS Controls GIANT KILLER, a Multifunctional Chromatin Modifier in Reproductive Organ Patterning and Differentiation*, Kian-Hong Ng et al. doi: 10.1371/journal.pbio.1000251.

(a) et (b) Localisation de l'ARNm du gène *GIK* par hybridation *in situ* dans des coupes longitudinales de méristèmes floraux (le nombre indique l'ordre d'avancement de la formation de la fleur) ; (c) mise en évidence de l'ARNm de *GIK* par RT-PCR dans des extraits de méristèmes floraux. L'ARNm de la lipase est un témoin de charge.

### c) Les facteurs environnementaux

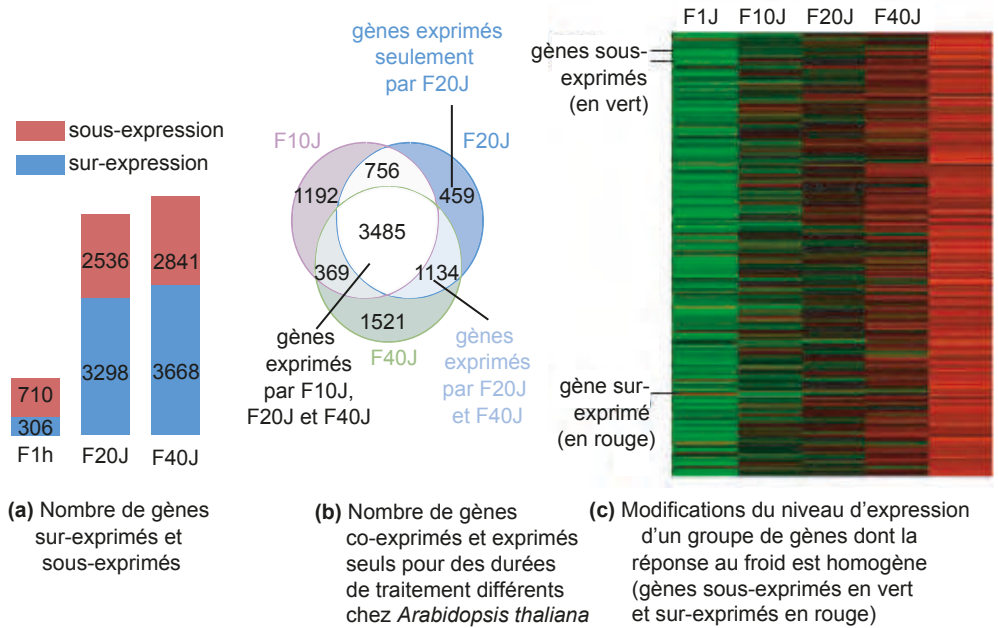
Le phénotype cellulaire est aussi sous le contrôle des facteurs de l'environnement qui peuvent constituer des signaux permettant notamment d'adapter le développement des organismes aux conditions variables du milieu de vie. Ainsi, chez certaines variétés d'*Arabidopsis thaliana*, une période d'exposition prolongée (plusieurs jours à plusieurs semaines) au froid (entre 4 et 7 °C) lors de l'hiver favorise la transition du méristème végétatif en méristème inflorescentiel dans lequel s'individualisent des méristèmes floraux. L'étude du transcriptome total de cette plante montre qu'un traitement prolongé par le froid (4 °C) entraîne des changements d'expression du génome ; certains gènes sont sur-exprimés alors que d'autres sont sous-exprimés (figure 15.4).

- Le nombre de gènes dont le niveau d'expression change suite au traitement par le froid est considérable, 5 834 après 20 jours et 6 509 après 40 jours (figure 15.4a).
- Quelles que soient les durées d'exposition au froid, un groupe de 3 485 gènes est toujours exprimé simultanément (co-expression) (figure 15.4b).
- Enfin, d'autres gènes sont spécifiques de chaque durée de traitement par le froid (1 192 gènes pour 10 jours de traitement et 1 521 pour 40 jours), ce qui montre que la durée du traitement modifie en continu l'expression du génome (figure 15.4b).

L'étude se focalise ensuite sur un groupe de gènes, en distinguant ceux qui sont sous-exprimés (représentés par les bandes vertes) ou sur-exprimés (représentés par les bandes rouges) (figure 15.4c) pour différentes durées de traitement par le froid. L'étude du transcriptome montre que ce groupe se caractérise par une réponse au froid homogène : une sous-expression pour un traitement de faible durée, suivie d'une augmentation progressive, avec une sur-expression de l'ensemble des gènes au bout de 40 jours.

#### ZOOM 5

L'établissement du transcriptome



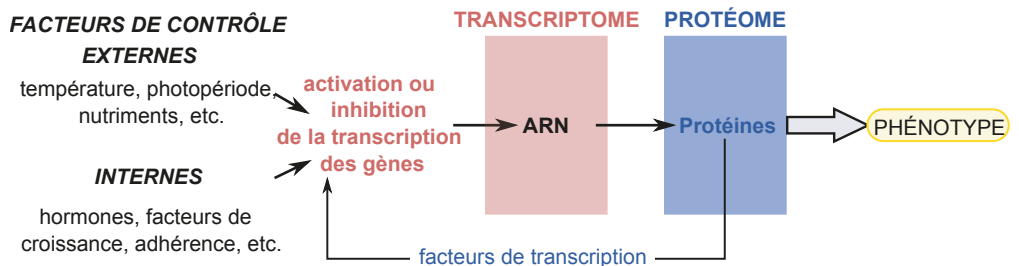
**Figure 15.4** Suivi de l'expression des gènes d'*Arabidopsis thaliana* suite à un traitement par le froid (4 °C).

(D'après *Transcriptome and epigenome analyses of vernalization in Arabidopsis thaliana*, Yanpeng Xi et al. doi:10.1111/tpj.14817).

Durées du traitement : 1 heure (F1h), 1 jour (F1J), 10 jours (F10J), 20 jours (F20J) et 40 jours (F40J).

Ainsi les conditions du milieu influencent au cours du temps le niveau d'expression d'un très grand nombre de gènes. Ces derniers participent alors à la synthèse de protéines qui contrôlent le phénotype cellulaire au cours de ce traitement. Ces changements sont le signe que la plante intègre les informations issues du milieu qui lui permettront de répondre à ses variations.

Ces exemples illustrent les diverses influences qui déterminent les phénotypes et montrent la **plasticité du génome**, c'est-à-dire sa capacité à modifier son expression au cours du temps et en fonction des conditions du milieu (figure 15.5).



**Figure 15.5** Bilan des facteurs intervenant dans la détermination du phénotype.

## 2

## Contrôle de la transcription par modification de la chromatine

Voir chapitre 13, § 3.1

### 2.1 Localisation des gènes actifs dans l'euchromatine

La chromatine est hétérogène dans le nucléoplasme et s'organise en euchromatine et hétérochromatine.

- L'**hétérochromatine** compte deux composantes ; une partie **constitutive**, compactée de manière permanente en solénoïdes de 30 nm de diamètre et une autre **facultative**, compactée de façon transitoire. Cet état est **transcriptionnellement inactif**.
- L'**euchromatine**, sous forme de nucléofilaments de 10 nm de diamètre, est la forme la moins condensée et renferme les gènes **potentiellement transcritibles**.

Au cours de la vie cellulaire, la **cartographie de la chromatine** change, avec des conversions réversibles de l'euchromatine en hétérochromatine facultative ; il s'agit du **remodelage de la chromatine**. Ce remodelage est notamment le résultat de la combinaison de modifications de l'ADN et des histones constituant le **nucléosome**.

### 2.2 Remodelage de la chromatine par méthylation de l'ADN

La méthylation affecte l'ensemble du génome eucaryote. Les brins polynucléotidiques de l'ADN sont méthylés au niveau de certains résidus cytosine (5 à 15 % en moyenne, variable de 50 % chez certaines plantes à 0 % chez la levure et la drosophile par exemple). Le niveau de méthylation des séquences de l'ADN peut, dans certains cas, déterminer sa transcription, comme l'illustre l'exemple du gène *AGOUTI*.

#### a) La méthylation des séquences régulatrices du gène *AGOUTI* et son expression

Dans un groupe de souris ayant la même version du gène *AGOUTI* ( $A^y$  ; *Agouti viable yellow*), certains ont un pelage brun et d'autres un pelage jaune. Cette différence est liée au nombre de groupements méthyle situés à proximité du promoteur du gène (figure 15.6a).

- Si cette séquence est méthylée, l'expression du gène *AGOUTI* est inhibée, la protéine AGOUTI n'est pas synthétisée et le phénotype est brun par accumulation d'un pigment, l'eumélanine, dans des cellules de la peau appelées mélanocytes.
- Si la séquence est déméthylée, l'expression du gène *AGOUTI* est élevée ; la protéine AGOUTI agit sur les mélanocytes qui synthétisent de la phéomélanine ; le pelage est alors jaune.
- Si le niveau de méthylation est intermédiaire, le phénotype est jaune avec des taches brunes.

#### b) L'établissement du profil de méthylation de l'ADN

Les différentes zones fonctionnelles d'un gène (les séquences régulatrices, le promoteur, la séquence d'initiation, les exons et les introns, la séquence de terminaison) sont méthylées. Les séquences intergéniques et les séquences répétées, notamment les éléments transposables, le sont aussi. Cette modification est catalysée par les ADN méthyl-transférases. Cette famille d'enzymes reconnaît notamment les motifs dinucléotidiques 5'-CG-3' (sites CpG et ajoute des groupements méthyles  $-CH_3$  sur les cytosines (figure 15.6b) ; elles déterminent ainsi un **profil de méthylation de la séquence**. La méthylation peut alors :

- être recopiée du profil du brin parental sur le brin néosynthétisé lors de la réplication (**méthylation de maintenance**) ;
- être réalisée sur un nouveau site, en dehors de la réplication (**méthylation de novo**) ;
- être retirée par l'intervention de déméthylases (**déméthylation active**) ou par inaction du recopiage de la méthylation de maintenance lors de la réplication (**déméthylation passive**).

Voir chapitre 13,  
§ 3.1b

En général, la méthylation d'une séquence d'ADN affecte la fixation de différentes protéines (facteurs de transcription et protéines MBD pour *Methyl Binding Domain*) et permet le positionnement de nucléosomes sur cette séquence. Elle interagit alors avec les diverses modifications des histones et des complexes de remodelage de la chromatine qui imposent une configuration de type « hétérochromatine », **inhibant la transcription du gène** (figure 15.6c).

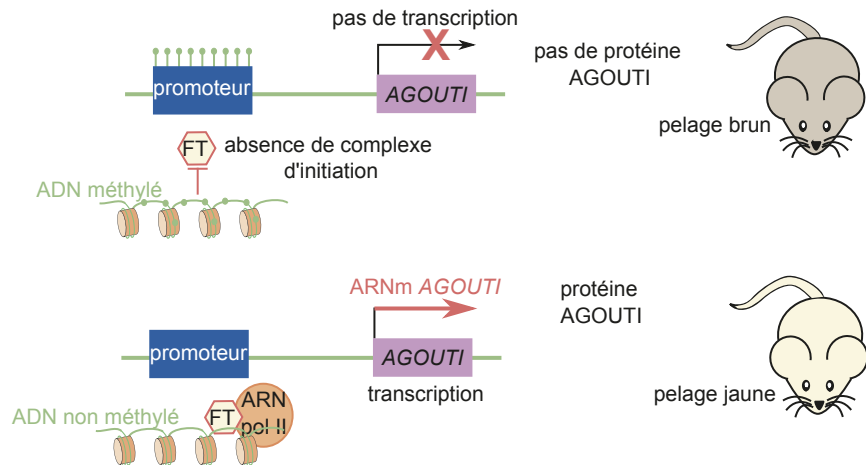


Figure 15.6 Contrôle de l'expression du gène *AGOUTI* par la méthylation de son promoteur.

### 2.3 Remodelage de la chromatine par modification des histones

Les nucléosomes composés d'histone H2 et ceux H1 internucléosomiques sont les éléments constitutifs de la chromatine. Les premiers participent pour beaucoup à son remodelage.

#### a) Les profils des histones nucléosomiques

Le cœur protéique du nucléosome est composé de 8 sous-unités ; 2H2A, 2H2B, 2H3 et 2H4, qui connaissent des changements post-traductionnels au niveau de leur partie N-terminale (queue d'histone) qui se projette hors du cœur nucléosomique (tableau 15.2).

Tableau 15.2 Principales modifications des queues histones.

Acides aminés N-terminaux cibles	Réactions catalysées (groupements impliqués), enzymes mises en jeu	Les conséquences sur la chromatine
<b>Lysine (K)</b>	Acétylation (acétyle), <i>acétyl-transférase/déacétylase</i>	Décondensation
<b>Lysine (K), Arginine (R)</b>	Méthylation (méthyle), <i>méthyl-transférase/déméthylase</i>	Réponse variable
<b>Sérine (S), Thréonine (T)</b>	Phosphorylation (phosphate), <i>Kinase/Phosphatase</i>	Décondensation
<b>Lysine (K)</b>	Ubiquitinylation (ubiquitine), <i>Enzyme d'ubiquitinylation/peptidase</i>	Réponse variable

- Des acides aminés cibles (lysine, arginine, etc.) constitutifs des queues d'histones sont modifiés par des enzymes (dites **writers**, acétyl-transférase, méthyl-transférase, etc.) qui fixent des groupements acétyle, méthyle, phosphate, ubiquitine, etc.
- Les modifications sont réversibles grâce à des enzymes (dites **erasers**) qui catalysent les réactions inverses, comme l'histone déacétylase, déméthylase, etc.

- Les modifications peuvent porter sur plusieurs histones d'un nucléosome (H2, H3 ou H4, etc.), plusieurs positions sur la partie N-terminale (lysine 4 ou lysine 9 ou arginine, etc.), être de plusieurs types (méthylation ou acétylation, etc.) et en plusieurs nombres avec une occurrence variable (diméthylation ou triméthylation). Cela crée une très grande diversité de combinaisons possibles.

Les extrémités présentant alors un **profil de marquage**, émergent à la surface du complexe nucléosomique et repoussent ou rapprochent les nucléosomes voisins (figure 15.7).

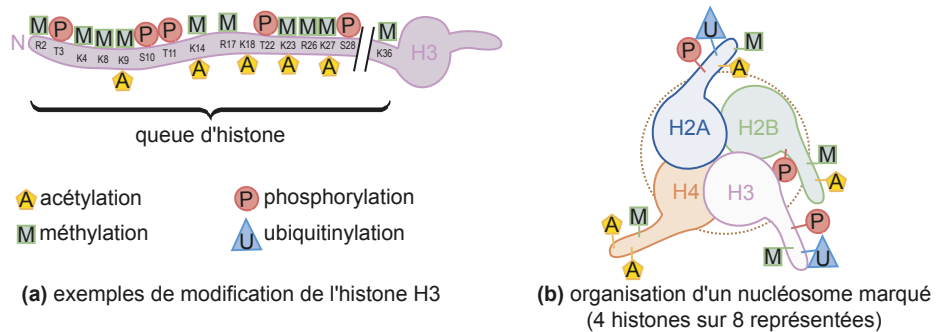


Figure 15.7 Profils de marquage des histones.

### b) Le « code histone » et le remodelage de la chromatine

L'ensemble des modifications sur les histones modulant l'expression des gènes est appelé le « **code histone** ». Il participe au contrôle du **remodelage chromatinien** (figure 15.8), en déterminant localement :

- la configuration « ouverte » de la chromatine rendant les loci accessibles au complexe transcriptionnel, comme au niveau de l'euchromatine ;
- la configuration « fermée » de la chromatine, dont la condensation rend les loci inaccessibles, comme au niveau de l'hétérochromatine.

Il n'est pas possible d'établir une correspondance simple entre le « code histone » et le niveau de compaction de la chromatine au sein d'un organisme et entre espèces différentes. En effet, c'est l'ensemble des marques qui crée un **environnement chromatinien**. Les profils de marquage des histones sont très complexes et les conséquences difficiles à prévoir.

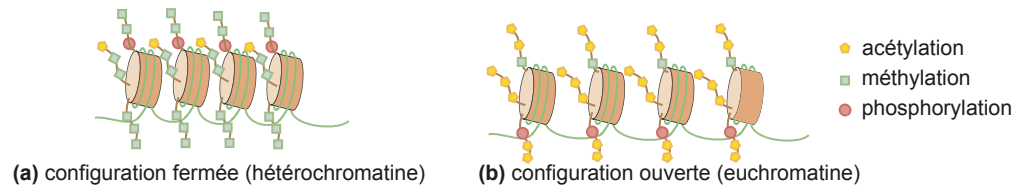


Figure 15.8 Remodelage de la chromatine par modification des profils des histones.

Ce marquage des histones varie au cours du développement et selon les types cellulaires. Il peut être déterminé par les conditions du milieu de vie comme la température, l'alimentation, etc. Il constitue un important mode de régulation de l'expression génétique. Cela peut être illustré par le rôle du froid qui intervient dans le contrôle de l'expression des gènes lors de la mise en place des pièces florales.

## 2.4 Remodelage de la chromatine par la dynamique des nucléosomes

Chez les eucaryotes, et notamment chez la levure, un **complexe SWI/SNF** (*SWItch/Sucrose Non-Fermentable*) active le **remodelage local** de la chromatine (figure 15.9). De tels complexes de remodelage de la chromatine, en interaction avec les marques de la chromatine (méthylation de l'ADN et marques des histones) sont capables :

- de faire glisser les nucléosomes le long de la molécule d'ADN ;
- de retirer ou ajouter des nucléosomes en un site ;
- de modifier les interactions entre l'ADN et les nucléosomes, pour contrôler plus globalement la compaction de la chromatine.

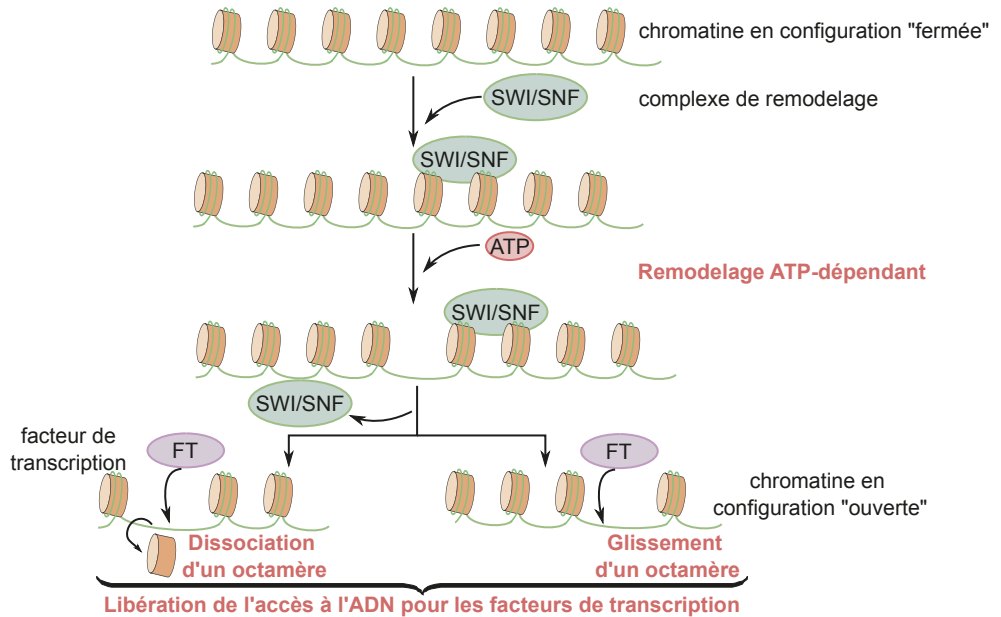


Figure 15.9 Modalités du remodelage local de la chromatine par le complexe SWI/SNF.

Les modifications vues ci-dessus affectent l'expression du gène, et donc le phénotype.

- Elles sont indépendantes des variations de sa séquence d'ADN, c'est-à-dire de l'information génétique.
- Elles sont transmissibles (tout ou partie) aux cellules filles lors de divisions cellulaires.

Elles constituent l'épigénome, on parle alors d'**épigénétique**.

### 3

## Contrôle de l'initiation de la transcription

Lorsque l'ADN est accessible, l'expression d'un gène au moment approprié de la vie d'une cellule commence par une étape primordiale qui est l'**initiation de la transcription**. Ce contrôle repose sur des interactions entre des protéines, les facteurs de transcription spécifiques, les séquences régulatrices et la structure de la chromatine comme nous venons de le voir.

### 3.1 Les facteurs de transcription spécifiques

Lorsque le promoteur d'un gène est ou devient accessible, des facteurs de transcription généraux et l'ARN polymérase forment un complexe de **pré-initiation de la transcription (CPI)**. La transcription ne peut alors qu'être réalisée à un niveau faible.

Interviennent alors les **facteurs de transcription spécifiques *trans***, qui sont des protéines capables de se lier aux **séquences d'ADN *cis* régulatrices** d'un nombre limité de gènes cibles. Lors de cette liaison, ces facteurs de transcription spécifiques du gène recrutent des co-activateurs et des co-répresseurs qui interagissent avec le complexe de transcription positionné sur le promoteur pour donner un **complexe d'initiation actif** (figure 15.10).

Les facteurs de transcription spécifiques sont des protéines codées par d'autres gènes et ils présentent plusieurs domaines :

- un domaine de liaison à l'ADN au niveau des séquences *cis* ;
- un domaine de liaison à un co-répresseur ou un co-activateur permettant d'interagir avec le CPI positionné sur le promoteur.

Les exemples vus dans le § 1.2 mettent en jeu ce mode de contrôle :

- le gène *AGAMOUS* code pour un facteur de transcription spécifique qui active notamment l'expression du gène *GIANT KILLER* ;
- le messenger *TGFβ* active des facteurs de transcription spécifiques intra-cellulaires qui modulent l'expression d'autres gènes.

#### ZOOM 7

Les facteurs de transcription spécifiques

### 3.2 Les séquences régulatrices

Les séquences *cis* régulatrices sont des régions distales, c'est-à-dire distinctes du promoteur. Elles sont plus ou moins éloignées du point d'initiation de la transcription, en amont ou en aval du gène cible et peuvent même être positionnées dans la région génique (figure 15.10).

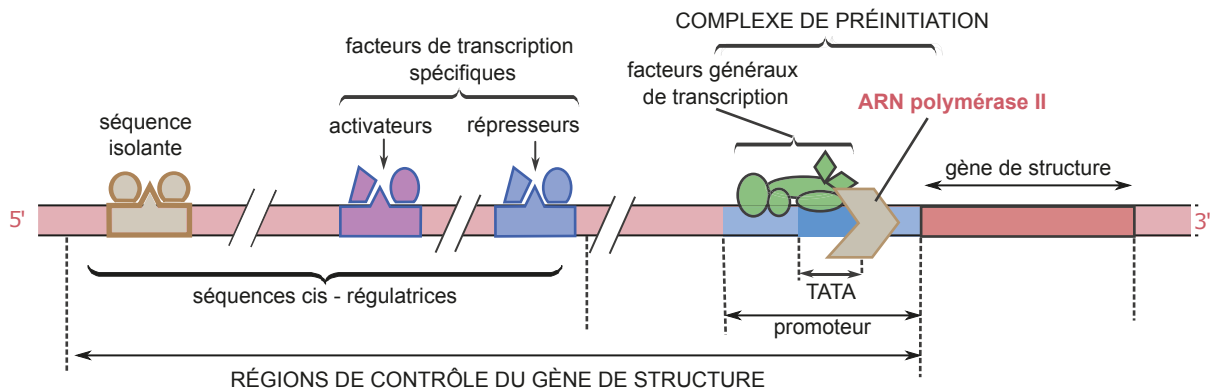


Figure 15.10 Organisation des séquences *cis* régulatrices associées à leurs facteurs *trans*-régulateurs.

- Les **séquences amplificatrices** (*enhancers*) lient les facteurs de transcription spécifiques activateurs et déclenchent ou amplifient l'initiation de la transcription.
- Les **séquences atténuatrices** (*silencers*) lient les facteurs de transcription spécifiques inhibiteurs et répriment l'initiation de la transcription.
- Les **séquences isolantes** (*insulators*) se combinent à des protéines et bloquent ou réduisent l'action des amplificateurs et des atténuateurs sur le CPI.

Cette coopération moléculaire complexe permet de contrôler finement la fréquence d'initiation de la transcription et donc le niveau d'expression ; il s'agit là d'un **contrôle génétique de l'expression**.

### 3.3 Conséquences de l'interaction facteurs (*trans*) et séquences (*cis*) régulateurs

#### a) L'augmentation de la probabilité de l'initiation de la transcription

La probabilité de l'initiation de la transcription dépend de la combinaison de très nombreuses conditions :

- de la conformation ouverte de la chromatine et de l'accès à l'ADN ;
- de la mise en place du CPI, et donc du bon recrutement des facteurs de transcription généraux et de l'ARN polymérase II par les séquences *cis* proximales ;
- de l'interaction des facteurs spécifiques *trans* avec les séquences *cis* régulatrices.

Lorsque toutes ces conditions sont réalisées le complexe de transcription est complet et opérationnel. Alors la **probabilité de l'initiation de la transcription** est augmentée, et le gène s'exprime.

#### b) La formation d'un complexe d'initiation complet opérationnel

Le modèle le plus courant est celui « *looping* » qui propose que les **séquences régulatrices distales *cis*** chargées de leurs facteurs *trans* interagissent avec le **promoteur, séquence régulatrice proximale**, où se forme le CPI. Ce rapprochement des zones éloignées sur la chromatine se fait par un repliement en boucle de la chromatine. De telles interactions recrutent des co-répresseurs (CoR) et co-activateurs (CoA) qui se combinent aux facteurs de transcription généraux (figure 15.11).

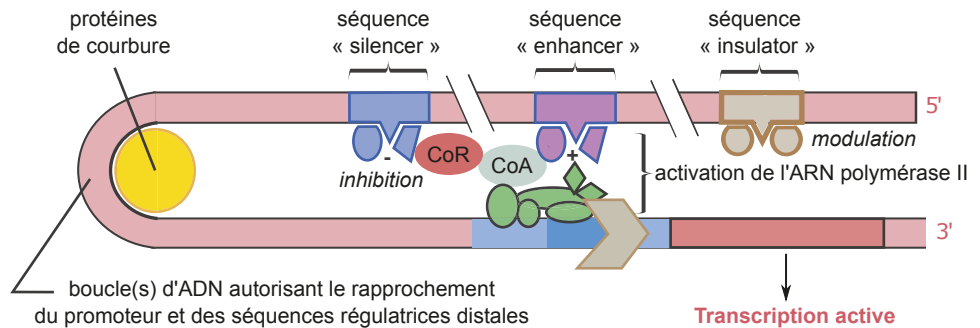


Figure 15.11 Modèle « *looping* » de repliement de la chromatine et de la formation d'un complexe de transcription fonctionnel.

## 4 Contrôle post-transcriptionnel par interférence ARN

Il s'agit du contrôle de la durée de vie fonctionnelle de l'ARNm par des ARN non-codants et notamment des petits ARN qui se lient par complémentarité au messager ; c'est l'**interférence**. Ces séquences d'une vingtaine de nucléotides nommées **ARNsi** (*small interfering RNA*) et **ARNmi** (*micro RNA*) sont codées entre autres par le génome de la cellule et constituent un mode de régulation post-transcriptionnel dans le cytosol.

Dans le cas des ARNsi l'inhibition de l'expression du gène se réalise selon les modalités suivantes (figure 15.12) :

- un gène est transcrit en un précurseur des ARN interférents qui quitte le noyau ;
- les précurseurs d'ARN interférents double brin sont coupés par un complexe endonucléase du cytosol (Dicer), en fragments d'ARNsi d'une vingtaine de nucléotides ;

- l'ARNsi se lie alors à un autre complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*) qui ne retient que le brin antisens permettant un ciblage de l'ARNm par une complémentarité parfaite ; ce marquage de l'ARNm permet alors sa dégradation dans le cytosol par des nucléases.

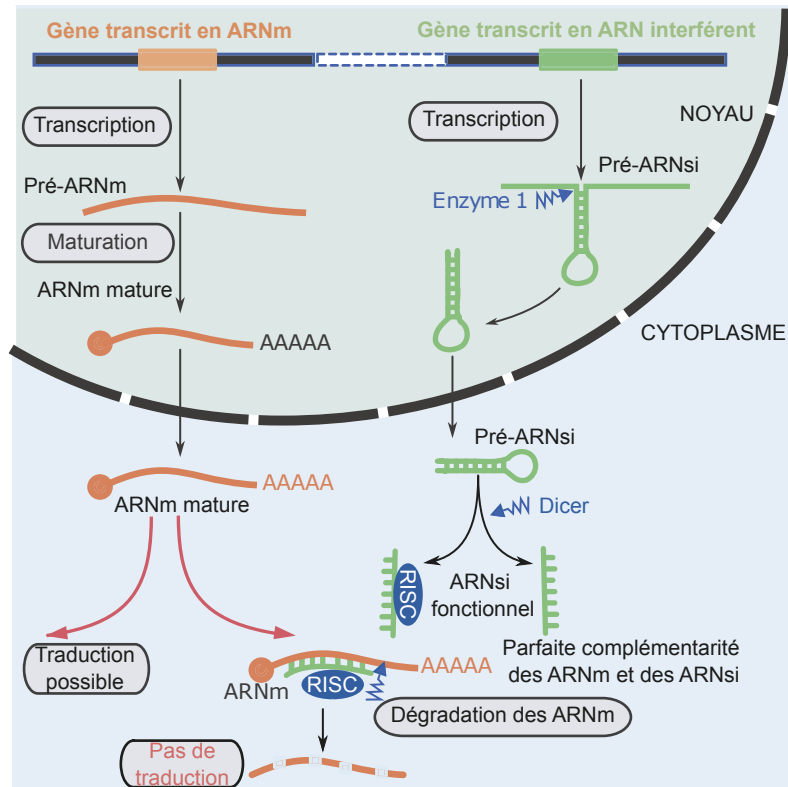


Figure 15.12 Modalités du contrôle de l'expression par interférence mettant en jeu les ARNsi.

Ce système contrôle la quantité d'ARNm disponible pour la traduction et donc la quantité de protéine présente dans la cellule.

Chez les plantes, les ARNsi sont également capables d'induire la méthylation de l'ADN des séquences identiques dans le génome (voie RdDM ou *RNA-directed DNA methylation*). Il existe également d'autres mécanismes de modification de la chromatine guidés par des ARN chez les champignons et les animaux.

## 5 L'établissement du phénotype et son hérédité

Les parties précédentes abordent les différents niveaux de contrôle de l'expression des gènes, qui ensemble contribuent à établir le phénotype.

### 5.1 La combinaison des systèmes de contrôle et phénotype cellulaire

Les travaux récents amènent à envisager un mode de fonctionnement **intégratif** où se combinent les marquages de la chromatine, de l'ADN et l'information codée par les séquences géniques (figure 15.13).

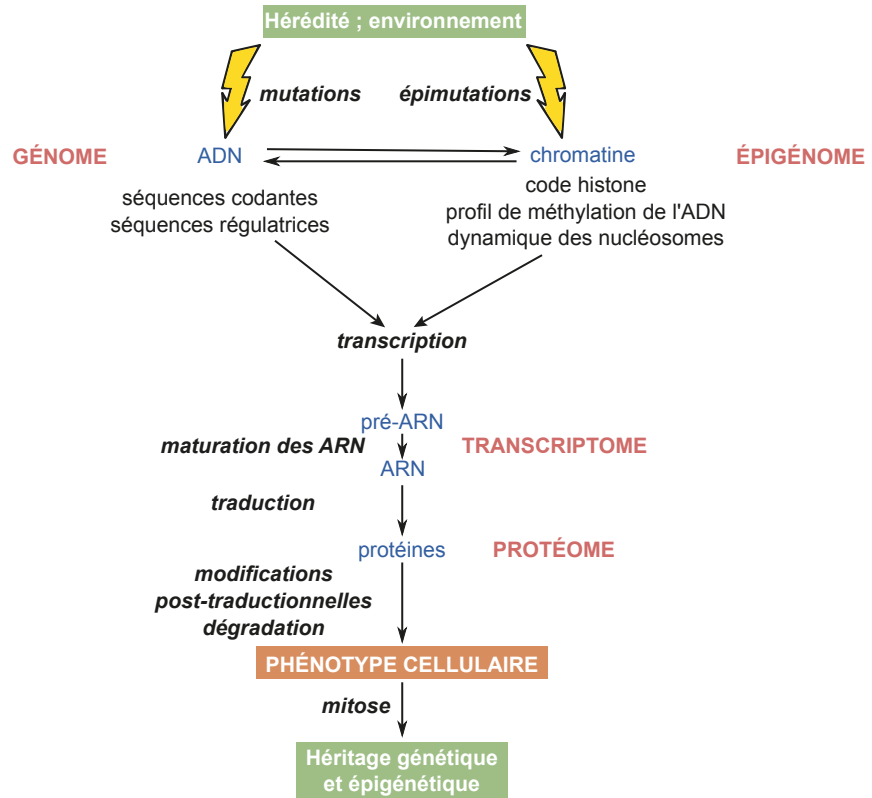


Figure 15.13 Combinaison des mécanismes du contrôle de l'expression génétique et acquisition du phénotype.

Selon cette approche le phénotype cellulaire est le résultat :

- des **caractéristiques génétiques** contenues dans les allèles qui composent le **génom** ;
- des caractéristiques **épigénétiques**, c'est-à-dire les profils des histones et de méthylation des cytosines qui déterminent l'accessibilité des allèles ; on parle alors d'**épigénom** ;
- de l'**initiation de la transcription** (contrôlée par les facteurs de transcription et les séquences de régulation) et du **contrôle de la durée de vie fonctionnelle des ARNm** qui détermine le **transcriptome** ;
- de la nature des protéines fonctionnelles (déterminée par leur synthèse et leur dégradation) qui définit le **protéome** ;
- le protéome contrôle notamment l'ensemble des intermédiaires métaboliques présents dans une cellule qui constitue le **métabolome**.

Ainsi le phénotype apparaît comme la combinaison des patrimoines génomique et épigénomique et de la réalisation transcriptomique, protéomique et métabolomique.

## 5.2 La transmission de l'hérédité cellulaire

Les caractéristiques génétique et épigénétique sont transmises lors des divisions ; c'est l'**hérédité parentale**.

- L'**hérédité génétique** est la transmission du génome lors du partage des chromosomes pendant la mitose et la méiose. Le génome peut changer lors de **mutations** qui sont des change-

ments relativement peu fréquents (fréquence de l'ordre de  $10^{-7}$ ). Les mutations sont en général irréversibles.

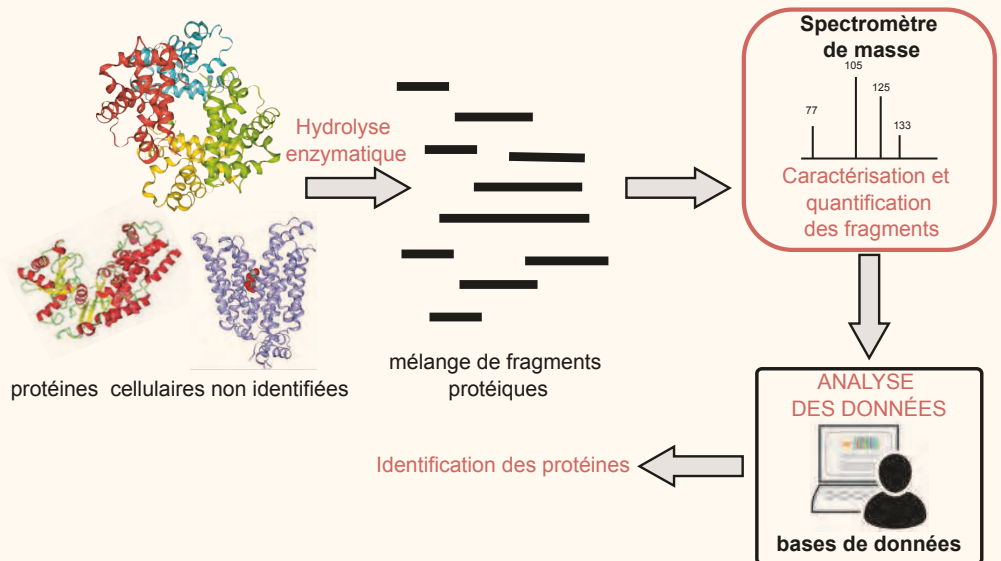
- L'**hérédité épigénétique** est la transmission des profils des histones et de méthylation des cytosines ; on parle d'**épigénome**. Ils sont possiblement conservés ou non lors des divisions cellulaires et peuvent être remaniés à tout moment de la vie de la cellule par les enzymes (*writers* et *erasers*) ; c'est l'**épimutation**. La fréquence des épimutations (ordre de  $10^{-5}$ ) est plus forte que celle des mutations mais elles sont plus facilement réversibles à l'échelle de la vie d'une cellule, à l'échelle des générations cellulaires.

Ainsi après une division cellulaire, les cellules filles reçoivent le génome et l'épigénome de la cellule mère ; c'est l'hérédité cellulaire qui se distingue de l'**hérédité entre générations**, où le génome et l'épigénome sont modifiés ; le génome est sujet aux **brassages génétiques** lors de la méiose et la fécondation, et l'épigénome des parents (animaux et la majorité des plantes) est **effacé et refait de novo** dans les gamètes.

### ZOOM 1

#### L'établissement du protéome

L'approche fonctionnelle des cellules peut s'envisager *via* le protéome, c'est-à-dire l'ensemble des protéines présentes dans la cellule à un moment donné pour des conditions définies. Les méthodes sont très diverses. La plus courante consiste à hydrolyser partiellement les protéines isolées des cellules. Le mélange peptidique est ensuite séparé par chromatographie avant d'être analysé en spectrométrie de masse, une technique qui identifie les séquences des fragments peptidiques. Les séquences sont assemblées et comparées à des protéines référencées dans les banques de données, ce qui permet leur **identification**. La **quantification** se fait à partir de l'intensité des signaux spectrométriques.



Principe de l'établissement d'un protéome.

La comparaison des protéomes établis sur un même type cellulaire, pour des conditions différentes permet de comprendre le mode d'action des facteurs de l'environnement cellulaire. On peut aussi rechercher dans le protéome des marqueurs spécifiques d'une pathologie en comparant des cellules malades et saines.

## ZOOM 2

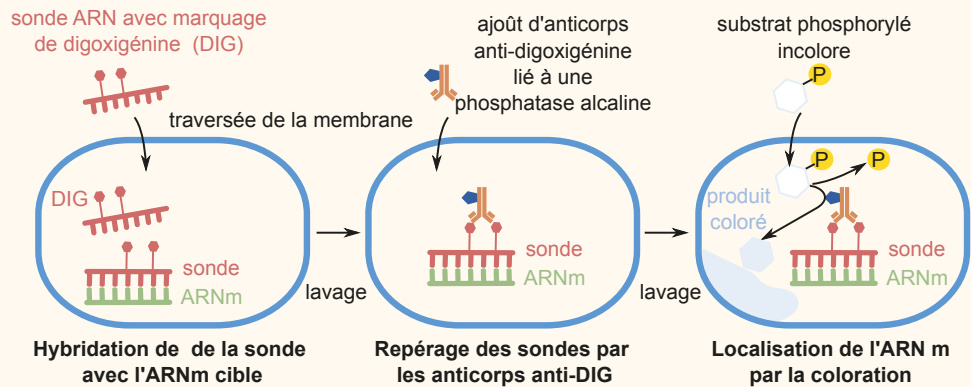
### L'hybridation *in situ*

Différentes techniques permettent d'identifier les sites (tissus, cellules, organites voire même partie d'un chromosome) où se trouve une séquence nucléotidique d'intérêt (ARN ou ADN).

#### Principe de l'hybridation *in situ* (HIS)

Cette technique utilise des sondes nucléotidiques pour localiser les séquences d'intérêt dans les tissus, les cellules, les organites et même au niveau des chromosomes : séquences sonde et cible s'apparient par **complémentarité des bases**. La sonde est marquée :

- soit par des isotopes radioactifs ( $H^3$ ,  $P^{32}$ , etc.) ;
- soit par des fluorophores (cyanine) ou des dérivés fluorescents (DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole, FITC *Fluorescein isothiocyanate*) ;
- soit par des produits non fluorescents comme la digoxigénine (une molécule lipophile capable de se lier ensuite à des anticorps) comme représenté ci-dessous.



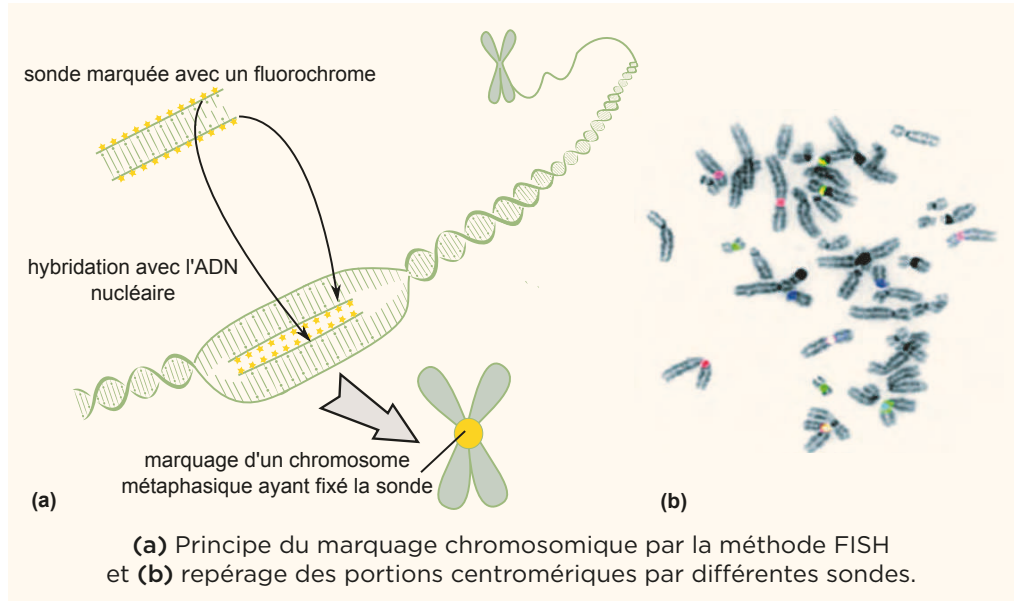
Marquage cellulaire par hybridation *in situ* utilisant la digoxigénine.

Les cellules contenant l'ARNm cible, *i.e.* exprimant le gène d'intérêt, sont alors repérables sur des préparations microscopiques.

#### Principe de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)

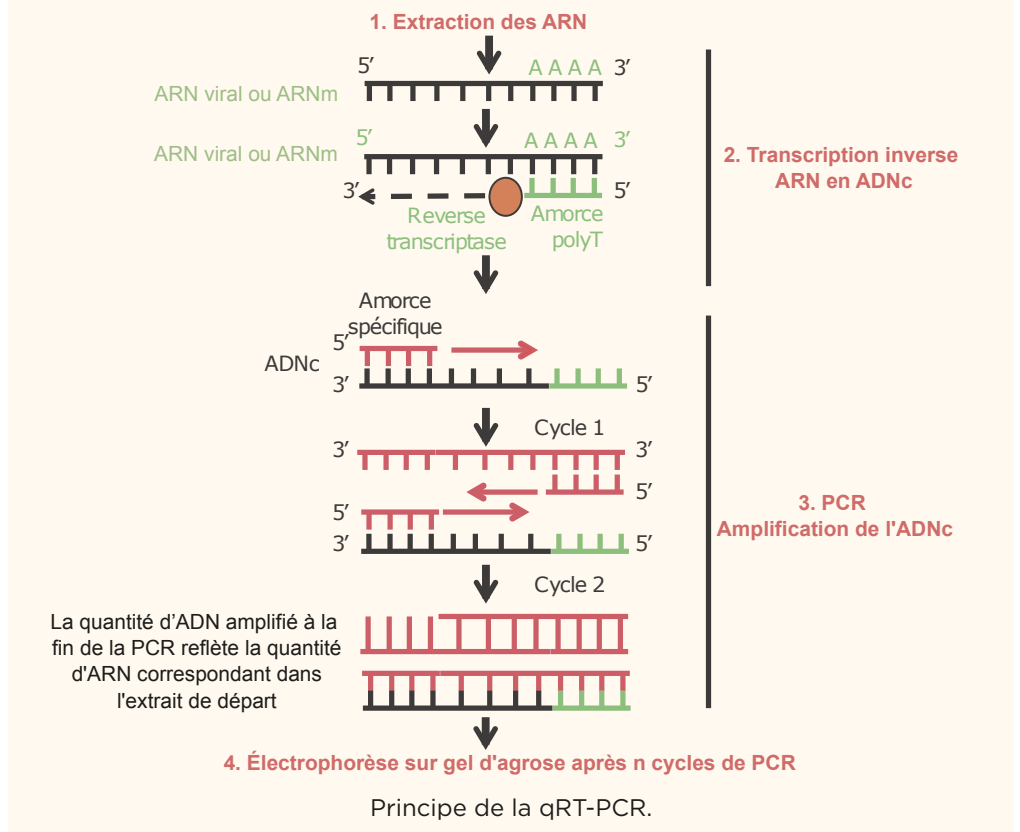
Cette technique permet de localiser des séquences à l'intérieur des cellules. Les sondes nucléotidiques complémentaires de la séquence cible (ADN ou ARN) sont d'abord marquées par des fluorochromes puis dirigées sur les coupes histologiques ou des cellules fixées.

Cette technique permet notamment de rechercher des séquences d'intérêt de 500 Kb à 4 Mb au niveau des chromosomes métaphasiques, comme les séquences télomériques, centromériques, etc. Il s'agit d'un outil complémentaire à l'étude des caryotypes pour mettre en évidence des anomalies chromosomiques.



### ZOOM 3

#### La technique qRT-PCR



Voir chapitre 13,  
Zoom 7

La qRT-PCR (*quantitative Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction*) est une technique qui permet de quantifier un ARN d'intérêt (ARN viral ou ARN transcrit d'un gène bactérien ou eucaryote). C'est une technique très rapide et efficace qui permet l'étude du transcriptome des virus, des bactéries et des cellules eucaryotes.

La technique se réalise en deux temps : d'abord l'isolement des ARNm et synthèse de l'ADN complémentaire, puis amplification de cet ADN par PCR.

À la fin de ces cycles, soit après une heure environ, on obtient des millions de molécules d'ADN complémentaire de l'ARN d'intérêt ; c'est l'amplification. Puisque l'on connaît le nombre de cycle d'amplification, le nombre de séquences amplifiées permet de déterminer la quantité initiale d'ARN et, s'il s'agit d'un ARNm de quantifier le niveau d'expression du gène.

## ZOOM 4

### La mutagenèse

L'ingénierie génétique dispose de nombreux outils pour modifier le génome des cellules de manière plus ou moins ciblée. La comparaison des différents phénotypes ainsi générés permet de comprendre les conséquences de l'expression de gènes d'intérêt et d'envisager d'éventuelles applications thérapeutiques ou agronomiques.

#### La mutagenèse aléatoire

Elle consiste à traiter les organismes avec des **agents chimiques** (acide nitrique, 5-bromo-uracile, colchicine, N-nitroEthylUrée, etc.) ou **physiques** (rayonnements ionisants ou UV) reconnus comme mutagènes.

Ces agents provoquent des erreurs d'appariements ou génèrent des lésions dans la molécule d'ADN, qui si elles ne sont pas corrigées, constituent des mutations qui apparaissent en des sites et en nombre variables : ce sont des **mutations aléatoires**.

Les phénotypes mutants du caractère d'intérêt sont sélectionnés (anomalie de l'organisation des fleurs, des membres, disparition de l'aptitude à réaliser une réaction métabolique, etc.). Le gène muté peut alors être identifié et le rôle de son expression validé.

Le criblage de ces mutants est fastidieux et l'interprétation des phénotypes peut s'avérer parfois difficile.

#### La mutagenèse ciblée

Elle permet de modifier spécifiquement le gène d'intérêt et d'en étudier les conséquences phénotypiques. Différentes techniques sont envisagées.

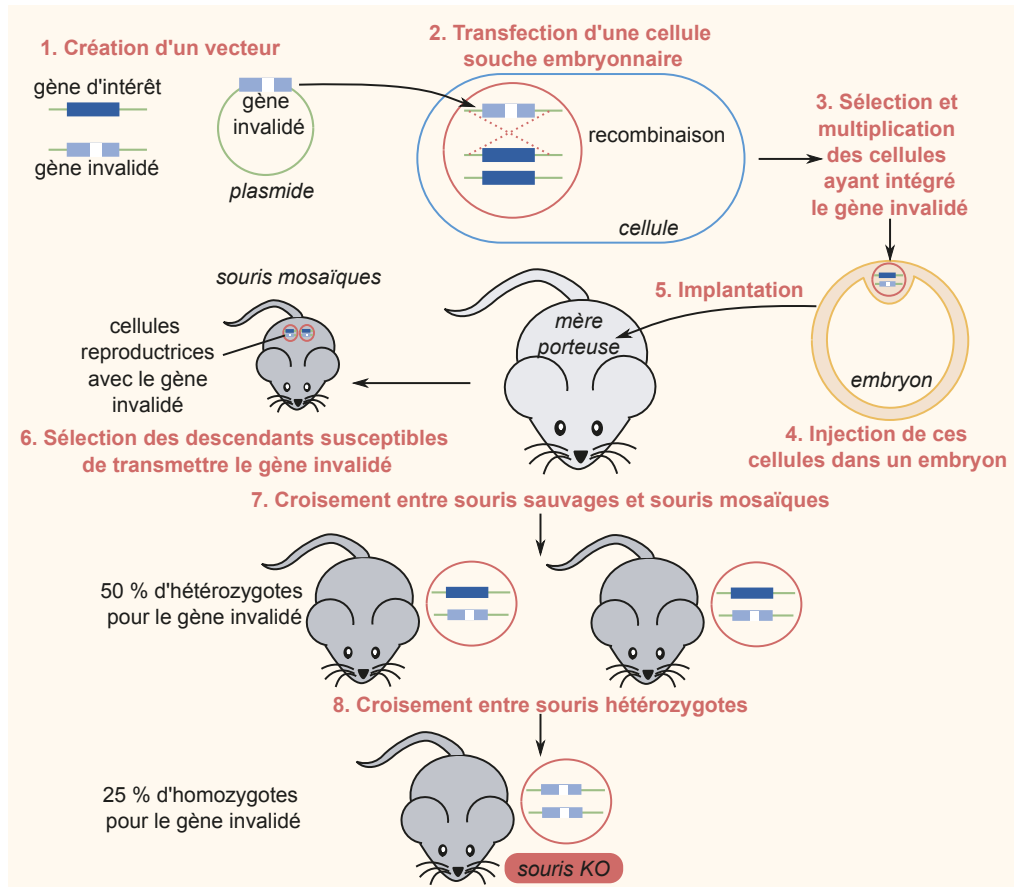
- **L'inactivation des gènes par Knock-Out (KO)**

Cette technique consiste à inactiver un gène, par exemple chez la souris, en le remplaçant par une version non fonctionnelle (invalidée). Il est alors possible d'envisager des hypothèses sur le rôle de l'expression du gène, en comparant les phénotypes KO et sauvages.

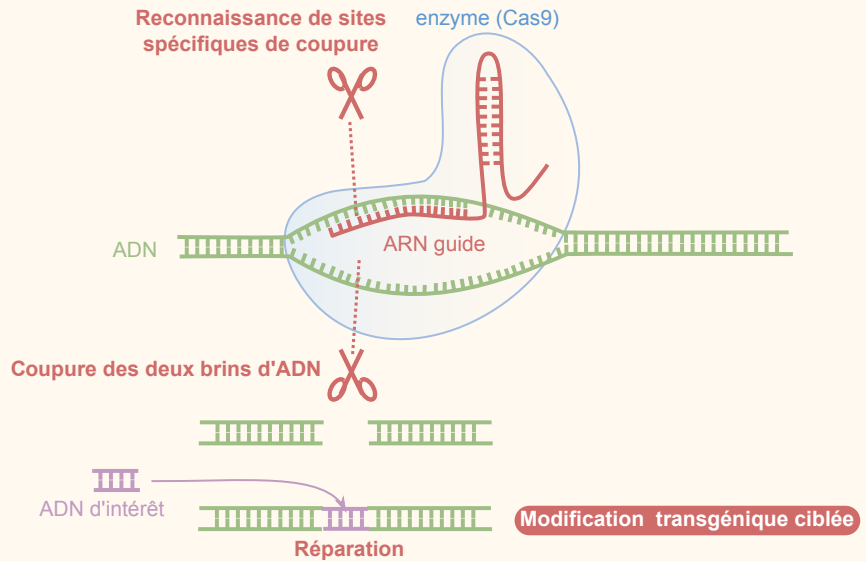
Cette méthode est très longue (plusieurs mois) et coûte cher. Des laboratoires sont exclusivement consacrés à la conception de telles souches expérimentales.

- **La transgénèse**

Cette méthode consiste à modifier le génome en insérant de manière dirigée un gène d'intérêt sur un site spécifique de l'ADN. Pour cela on utilise des enzymes endonucléasiques capables de reconnaître une séquence précise de l'ADN, par exemple en aval d'un promoteur, et de couper les deux brins.



Principe de la mutagenèse dirigée par Knock-Out.



Principe de la mutagenèse dirigée par CRISPR-Cas9.

Le système CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) utilise pour cela un ARN-guide qui, en se liant à un site spécifique de l'ADN, oriente l'enzyme Cas-9 qui coupe alors l'ADN ; on parle de « ciseaux moléculaires ». La transgénèse utilise ces propriétés pour insérer entre ces extrémités libres une séquence d'intérêt (nouvelle séquence ou séquence inactivée) sous le contrôle d'un promoteur choisi ; La séquence d'intérêt fait alors partie du génome modifié.

## ZOOM 5

## L'établissement du transcriptome

Le transcriptome représente l'ensemble des ARN transcrits codants et non-codants présents dans une cellule. Il est l'image de l'expression instantanée des gènes et sa composition diffère selon le type cellulaire, l'état biologique et les conditions de l'environnement.

Plusieurs méthodes permettent de l'établir dont l'analyse par puce à ADN.

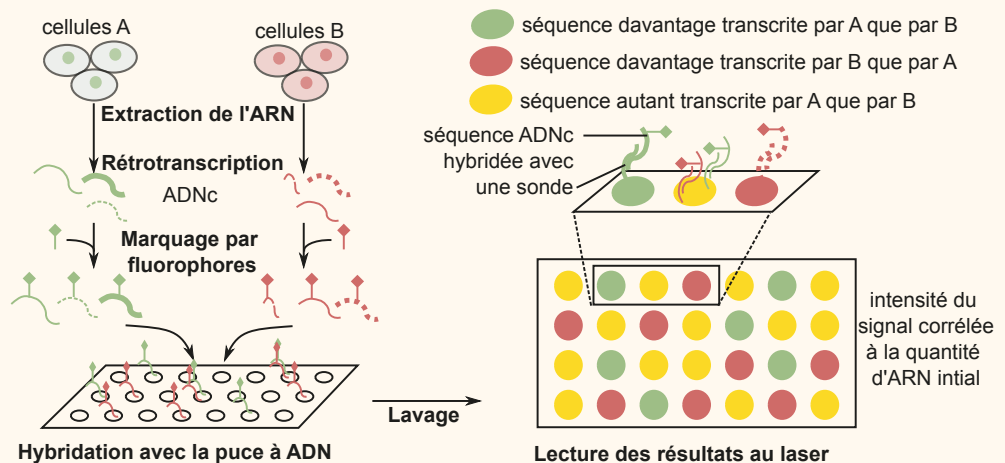
Les fragments d'ADN retenus sur la puce donnent une image des gènes transcrits. Le traitement bio-informatique des signaux portés par la puce et l'exploitation des banques de données permettent d'identifier les gènes exprimés et de quantifier leur niveau d'expression.

La représentation de ce profil transcriptomique est illustrée par la [figure 15.4](#).

Une approche technologique plus récente, appelée RNA-seq, permet *via* l'utilisation du séquençage haut-débit, d'établir la représentation de tous les ARNm présents dans un échantillon biologique.

L'étude transcriptomique permet une approche de la dynamique de l'expression génétique. Elle est souvent établie lors d'analyse différentielle des transcrits pour des cellules ayant connu des conditions différentes. Ainsi il est possible de détecter les gènes actifs, les mécanismes de régulation des gènes et de construire des réseaux d'expression.

Voir chapitre 13,  
§ 1.2b



Principe de l'établissement d'un transcriptome par l'utilisation d'une puce à ADN.

ZOOM 6

Le contrôle du gène *FLC*

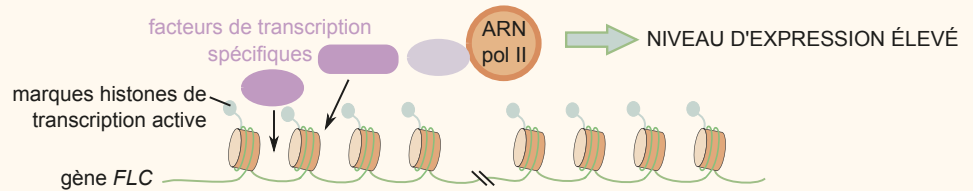
La floraison de certaines plantes (blé d'hiver, betterave sucrière, certaines variétés d'*Arabidopsis thaliana*) nécessite impérativement une exposition prolongée au froid lors des stades précoces du développement ; ce processus est la **vernalisation**. Durant cette période, des modifications affectent notamment les profils des histones, remodelant la chromatine et inhibant l'expression du gène *FLOWERING LOCUS C (FLC)* qui code un facteur de transcription empêchant la floraison.

Chez *Arabidopsis*, la répression de *FLC* augmente quantitativement avec la durée du traitement par le froid, elle est mitotiquement stable même après le retour de températures plus clémentes mais se réinitialise à la génération suivante. Le déroulement de la vernalisation se produit en 4 phases.

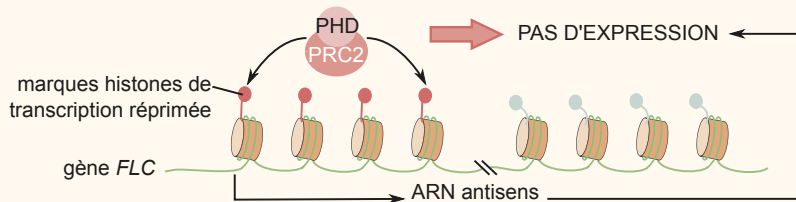
**Avant la vernalisation**, l'expression de *FLC* est élevée dans la plante à l'état végétatif. La chromatine du locus *FLC* est alors associée à des marques histones en lien avec une transcription active (notamment des méthylations d'histones).

La répression de *FLC* est induite par le froid **au cours de la vernalisation**. Elle résulte de l'association de 2 complexes protéiques (PRC2 et PHD) activés par le froid qui permet d'ajouter sur une partie du locus *FLC* une marque réprimant la transcription et de retirer la marque activatrice. De plus, dès le début de la période de froid, un ARN non-codant antisens de *FLC* est produit et participe à la répression de *FLC*.

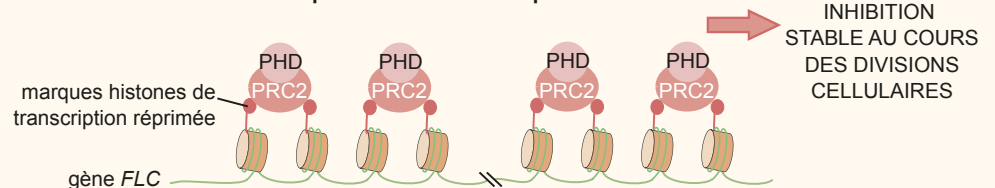
Phase 1 : AUTOMNE (avant vernalisation)



Phase 2 : HIVER (au cours de la vernalisation)



Phase 3 : retour à des températures clémentes après la vernalisation

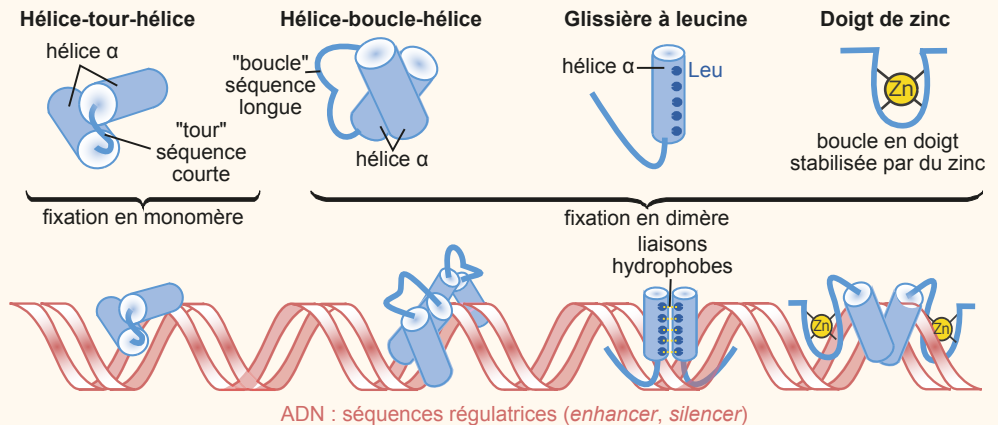


Modification épigénétique de la chromatine au niveau du locus *FLC* au cours des saisons (d'après Sharma et al. 2020. doi:10.1111/pp113163).

**Après la vernalisation**, lors du retour à des températures ambiantes et jusqu'à la floraison, le complexe PRC2-PHD étend son action (ajout d'une marque répressive) sur tout le locus *FLC*. Cette action stabilise alors la chromatine dans un état répressif et stable au cours des mitoses. **Lors de la fécondation**, l'expression de *FLC* semble consécutive à l'action d'un facteur de transcription embryonnaire capable d'activer la transcription de gènes portant des marques répressives de la chromatine. Puis des facteurs de transcription embryonnaires stabilisent l'expression de *FLC* à un niveau élevé, ce qui empêche une floraison trop précoce.

## ZOOM 7

## Les facteurs de transcription spécifiques



Diversité des facteurs de transcription spécifiques et modalités de liaison à l'ADN.

En fonction de leur structure, on distingue 4 grandes familles de facteurs de transcription ; les facteurs hélice-tour-hélice, hélice-boucle-hélice, glissière à leucines, doigts de zinc. À part l'hélice-tour-hélice ces molécules se dimérisent pour former des **facteurs trans** régulateurs. Ils sont tous capables de se lier aux séquences *cis* de l'ADN au niveau des grands sillons par des liaisons faibles.

## Réviser

## Résumé

Le contrôle de l'expression de **génétique dépend de facteurs internes à la cellule, de messages intercellulaires, des caractéristiques physico-chimiques de l'environnement biotique.**

Plusieurs niveaux de contrôle se combinent. Le contrôle de l'initiation de la transcription est la principale voie de contrôle de l'expression génétique. Il dépend d'abord de l'état de la chromatine : modifications des histones et méthylation des cytosines modulent l'accès à l'ADN. C'est un contrôle épigénétique. L'initiation même de la transcription d'un gène repose sur des interactions entre des séquences régulatrices et de très nombreux facteurs de transcription spécifiques et généraux, qui réunis, activent l'ARN polymérase. L'ARN produit de la transcription connaît une maturation qui peut donner plusieurs transcrits fonctionnels dont la traduction est contrôlée en dernier lieu par les ARN interférents.

Le génome (ensemble de l'ADN cellulaire) et l'épigénome (ensemble des modifications de la chromatine d'une cellule) sont transmis de manière plus ou moins fidèle selon des modalités différentes lors des divisions cellulaires mitotiques et méiotiques. Ainsi les profils génétiques et épigénétiques peuvent être modifiés respectivement par les mutations et les brassages génétiques d'une part, et les épimutations d'autre part.

Ces processus entraînent pour les premiers de la nouveauté génétique et pour les seconds de la plasticité d'expression.

La compréhension des caractéristiques phénotypiques d'une cellule ou d'un organisme dans son milieu passe donc par les analyses épigénomique, transcriptomique, protéomique et métabolomique qui permettent d'identifier les voies métaboliques et les processus physiologiques majeurs qui interviennent à ce moment de la vie.

### Attention

- Distinguez les différents niveaux de contrôle et leurs conséquences.
- Mémorisez la diversité des interactions moléculaires intervenant dans les étapes de l'expression génétique.
- Transposez les exemples envisagés à d'autres situations biologiques.
- Maîtrisez les techniques associées à l'étude de l'expression du génome pour pouvoir interpréter leurs résultats.
- Envisagez le génome comme une unité plastique aux différentes échelles temporelles, à long terme avec les mutations et à court terme avec l'épimutation.

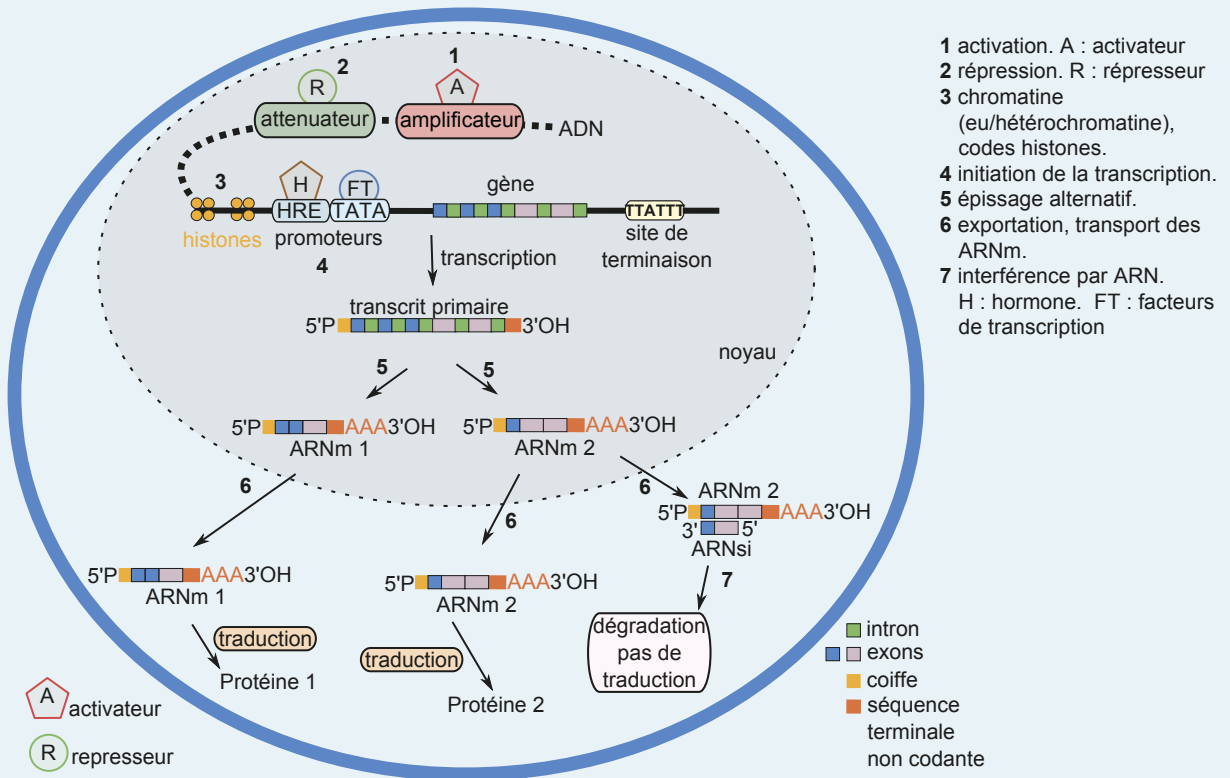


Figure de synthèse Différents niveaux de contrôle de l'expression génétique des eucaryotes.

# S'entraîner

## QCM de connaissances

- 1 La méthylation des gènes des eucaryotes :
  - a. Met en jeu des acétylases.
  - b. Se réalise sur des lysines.
  - c. Est irréversible et permanente.
  - d. N'affecte pas les promoteurs.
- 2 Le « code histone » :
  - a. Correspond à des modifications qui portent sur les histones H1.
  - b. Est universel et permet de prédire le comportement de la chromatine.
  - c. Détermine le niveau de condensation de la chromatine.
  - d. Se met en place après la traduction des histones.
- 3 La chromatine :
  - a. Connaît des changements de conformation au cours de la vie de la cellule.
  - b. Présente les mêmes marques des histones que la cellule mère dans les gamètes.
  - c. Est remaniée par l'acétylation des cytosines.
  - d. Est décondensée dans l'hétérochromatine des nucléoles.
- 4 Les mutants :
  - a. S'obtiennent uniquement par mutagénèse induite.
  - b. Ont le même phénotype que la souche WT.
  - c. D'*Arabidopsis thaliana* sont utilisés afin de comprendre le rôle de l'expression des gènes.
  - d. Peuvent être obtenus par Knock-Out.

## QCM à partir de documents

- 1 On étudie le niveau d'expression des gènes *FLC* et *VIN3* d'*Arabidopsis*, suite à différents traitements par le froid (figure 15.14) : pas de traitement par le froid (NF) ; traitement par le froid pendant 1 jour (F1J), 20 jours (F20J), 40 jours (F40J) ; traitement par le froid pendant 40 jours suivi de 10 jours à 20 °C (T10).

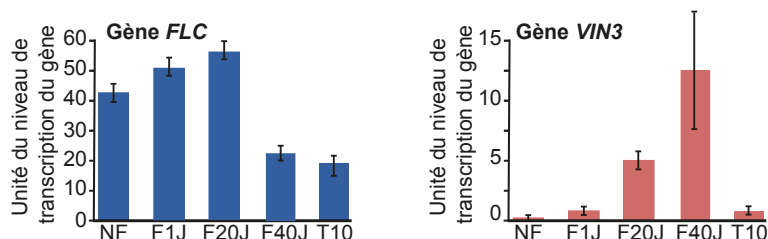


Figure 15.14 Niveaux d'expression des gènes *FLC* et de *VIN3* en fonction des traitements.

Parmi les affirmations ci-dessous, lesquelles sont exactes ?

- a. Le froid inhibe l'expression du gène *FLC*.
- b. La sous-expression de *FLC* se maintient bien après le traitement par le froid.
- c. L'expression du gène *VIN3* est activé par le froid.

- d. Le retour à la température de 20 °C réactive l'expression de ces deux gènes.
  - e. Le produit de l'expression du gène *FLC* pourrait inhiber l'expression de *VIN3*.
  - f. Il existe un décalage temporel des pics d'expression des gènes *FLC* et *VIN*
- 2 La quantité de sites CpG chez l'humain et la souris a été déterminée. La figure 15.15 exprime leurs pourcentages intragénique, extragénique et au niveau des séquences d'initiation (TSS) pour 25 495 et 23 021 sites CpG étudiés respectivement chez l'homme et chez la souris.

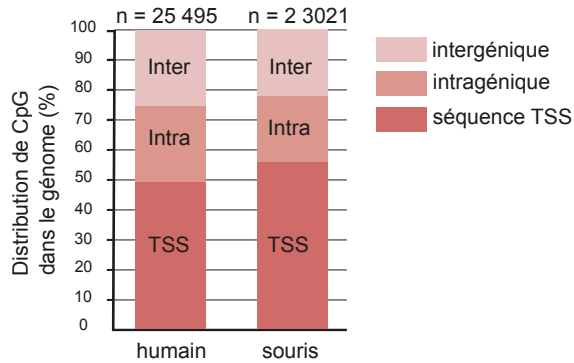


Figure 15.15 Distribution des sites CpG chez les vertébrés humains et murins.

Parmi les affirmations ci-dessous, lesquelles sont exactes ?

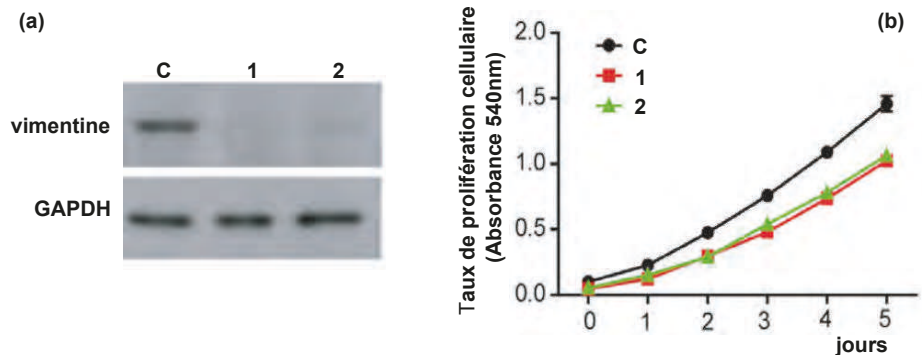
- a. Les sites sont plus fréquents au niveau des séquences codantes.
- b. La portion où se forme le complexe d'initiation sont très riches en sites CpG.
- c. Les séquences non codantes ne renferment pas de sites CpG.
- d. La distribution des sites CpG est identique chez les deux vertébrés.
- e. Ces résultats ne sont pas significatifs.

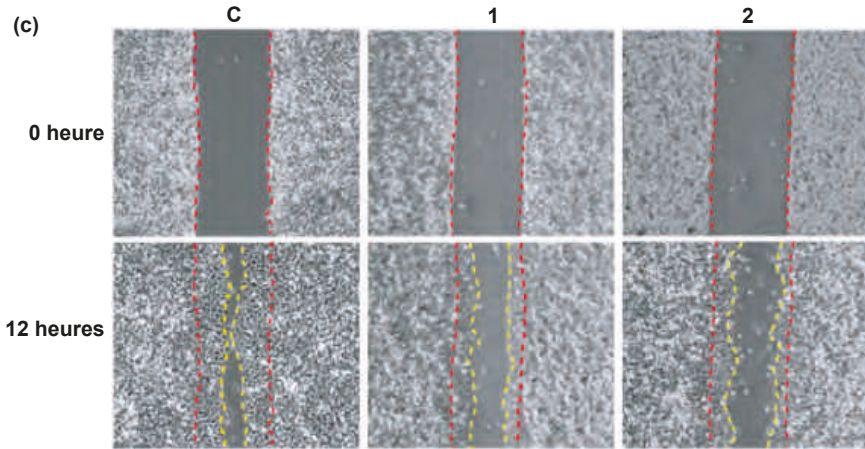
### Question de synthèse courte

Les mutants.

### Sujet sur documents (analyse et mise en relation)

On étudie trois souches de cellules mésenchymateuses cancéreuses (cellules témoins et cellules de deux types de mutants K.O.). Les résultats sont présentés par la figure 15.16.



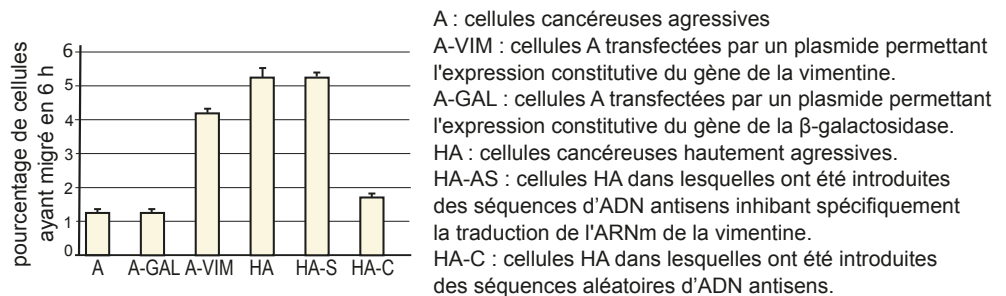


**Figure 15.16** (a) *Western blot* permettant de quantifier la vimentine chez les souches c (contrôle), et des mutants KO (1 et 2) ; (b) prolifération des cellules de ces 3 souches ; (c) migration des 3 souches au bout de 12 h.

(D'après *Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation* Ching-Yi Liu. doi : 10.18632/oncotarget.3862).

- 1 Rappeler les méthodes permettant d'obtenir des souches KO.
- 2 Analysez et interprétez les résultats de la [figure 15.16a](#).
- 3 Mettez en relation ces informations avec celles apportées par les [figures 15.16b et c](#).

Certaines cellules présentent la capacité de se déplacer (phénotype migrateur) ou celle de former de nouvelles colonies cellulaires à distance de la culture initiale (phénotype invasif). La [figure 15.17](#) recense les effectifs de ces différents types dans des cultures soumises ou non à un traitement induisant la transition épithélium-mésenchyme (EMT).



**Figure 15.17** Mesure de la capacité migratoire de différentes cellules cancéreuses.

- 4 Comparez les résultats des cellules A, HA, A-GAL et A-VIM. Que pouvez-vous en déduire concernant la vimentine ?
- 5 Comparez les résultats des cellules A, HA, HA-C et HA-AS.
- 6 Qu'apporte cette expérience par rapport à celle de la [figure 15.16](#) ?

# Les divisions cellulaires

## Activités pratiques

### PLAN DU CHAPITRE

- 1 La mitose : transmission conforme des chromosomes aux cellules filles
- 2 La méiose : passage d'une phase diploïde à une phase haploïde recombinée

### INTRODUCTION

Les cellules des eucaryotes peuvent présenter deux types de divisions. La mitose, qui peut affecter tous types de cellules, haploïdes et diploïdes, conduit à une répartition des chromosomes en deux lots identiques. La méiose conduit à la formation des gamètes et des méiospores, avec deux divisions permettant de passer d'une phase diploïde à une phase haploïde.

➔ **Quels sont les caractères cytologiques de ces deux types de division ?**

## 1 La mitose : transmission conforme des chromosomes aux cellules filles

### 1.1 Au microscope photonique

#### a. Mitoses des cellules d'embryophytes (méristèmes apicaux)

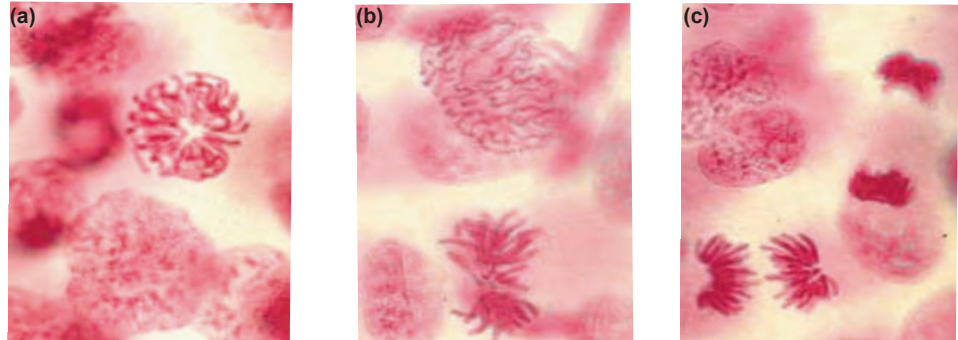
Les événements chromosomiques de la prophase, de la métaphase, de l'anaphase et de la télophase sont identifiables par la répartition des chromosomes dans la cellule en division. Ils s'accompagnent de changements cytologiques qui participent au partage des chromosomes et du cytoplasme (figure TP9.1).



**Figure TP9.1** Observation des étapes de la mitose au niveau du méristème apical racinaire d'oignon au MO  $\times 1\,000$ .

## b. Mitoses des cellules de métazoaires

Les figures chromosomiques sont identiques à celles vues pour la cellule végétale (figure TP9.2).



**Figure TP9.2** Observation des étapes de la mitose au cours des divisions mitotiques régénératrices de la queue de triton (MO  $\times 1\,000$ ).

(Cichés A. Boutier <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/Mitose/54triton.htm>).

Il s'agira d'identifier les différents stades en se fondant principalement sur la disposition des chromosomes : chaque photographie présente deux stades ; **(a)** métaphase en vue polaire (en haut) et noyau interphasique (avec enveloppe nucléaire, en bas) ; **(b)** métaphase en vue équatoriale (en bas) et noyau en prophase (en haut) ; **(c)** début d'anaphase (en bas) et télophase (en haut).

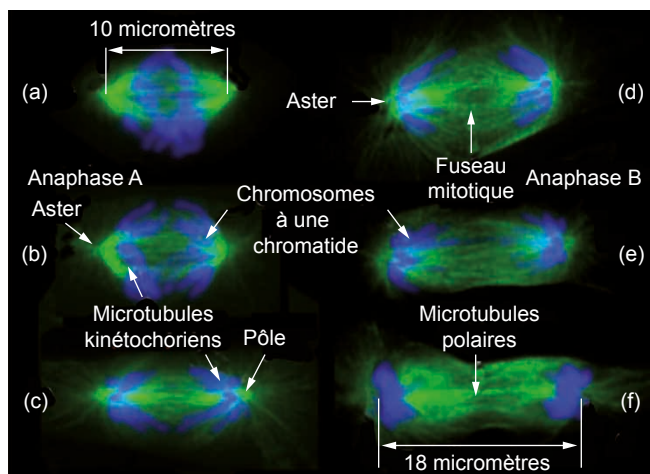
Deux particularités de la mitose des cellules animales pourraient être identifiées par une observation de l'ensemble de la cellule :

- la présence d'une paire de centrioles qui se dédouble pour se placer aux deux pôles du fuseau de division à partir desquels s'organise le réseau de microtubules ;
- la cytokinèse par contraction d'un anneau médian de filaments d'actine associés à de la myosine qui provoque l'étranglement du cytoplasme de la cellule-mère.

## 1.2 Au microscopie à fluorescence

Cette technique permet notamment de mieux observer le cytosquelette. La figure TP9.3, précise le déroulement de la séparation des chromosomes lors des deux étapes de l'anaphase :

- **l'anaphase A**, qui est l'ascension de deux lots de chromosomes monochromatidiens vers les pôles (distants de  $10\ \mu\text{m}$ , figure TP9.3a) par raccourcissement des microtubules fixés aux chromosomes (microtubules kinétochoriens) ;
- **l'anaphase B**, qui est marquée par l'éloignement des pôles et la séparation nette des deux lots de chromatides (distants de  $18\ \mu\text{m}$ , figure TP9.3f).



**Figure TP9.3** Observation des cellules en anaphase au microscope à fluorescence.

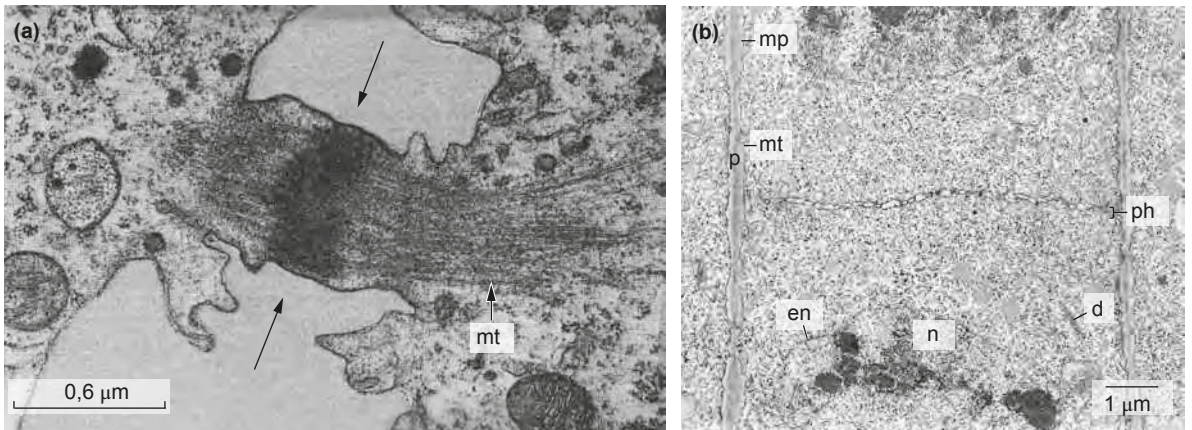
(Site Molecular expressions, <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/fluorescencemitosis/index.html>).

En bleu : les chromosomes ; en vert : la tubuline des microtubules du fuseau.

Voir chapitre 5,  
zoom 1.

### 1.3 Au microscopie électronique

Les observations au microscope électronique donnent accès aux ultrastructures révélant des informations fonctionnelles sur les modalités de la distribution des chromatides et la cytokinèse.



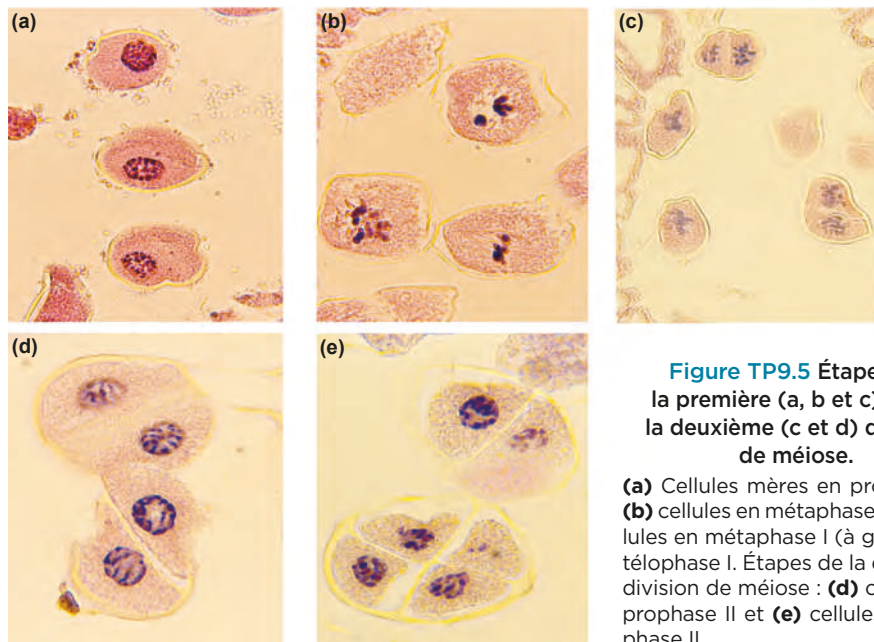
**Figure TP9.4** (a) Cytodiérèse d'une cellule animale d'embryon de rat (MET  $\times 35\ 000$ ) avec l'étranglement cytoplasmique matérialisé par l'anneau contractile (flèches) dense aux électrons, fragmentant les microtubules (mt) ; (b) cloisonnement de la cellule végétale de racine de glycine par mise en place du phragmoplaste (MET  $\times 18\ 500$ ).

(a) Cliché Labo BC4, Orsay ; (b) cliché E. Newcomb et W. Wergin.

d : dictyosomes, en : enveloppe nucléaire, mp : membrane plasmique, mt : microtubules, n : noyau, p : paroi, ph : phragmoplaste

## 2 La méiose : passage de la phase diploïde à la phase haploïde

La méiose est un ensemble de deux divisions qui s'observent lors de la formation des gamètes (métazoaires) et des méiospores (embryophytes).



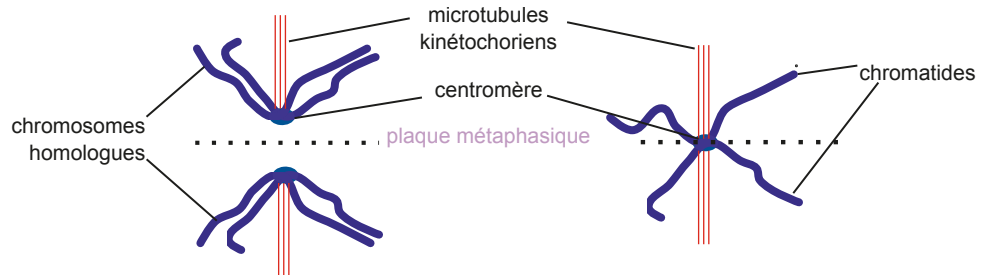
**Figure TP9.5** Étapes de la première (a, b et c) et de la deuxième (c et d) division de méiose.

(a) Cellules mères en prophase I ; (b) cellules en métaphase I ; (c) cellules en métaphase I (à gauche) et télophase I. Étapes de la deuxième division de méiose : (d) cellules en prophase II et (e) cellules en télophase II.

## 2.1 L'identification des différents stades

Les principales figures observables lors de cette division sont (figure TP9.5) :

- (a) des **cellules diploïdes** en prophase I : condensation des chromosomes ;
- (b) des cellules en métaphase I : mise en place des chromosomes à deux chromatides appariés (bivalents) sur le plan équatorial. Une métaphase I se distingue d'une métaphase de mitose et de métaphase II par le fait que les centromères des deux chromosomes homologues sont de part et d'autre du plan équatorial, alors que dans celui-ci des chiasmats réunissent les deux chromosomes homologues (figure TP9.7) ;
- (c) anaphase I : séparation de deux lots haploïdes de chromosomes bichromatidiens, séparation des cellules-filles (mise en place du phragmoplaste dans les cellules végétales) ;
- (d) prophase II : noyaux à  $n$  chromosomes, faiblement décondensés ;
- (e) après séparation des chromatides, télophase II : 4 noyaux haploïdes.



(a) Position des centromères lors de la métaphase I (b) Position des centromères lors de la métaphase II

Figure TP9.6 Métaphase de la première (a) et de la seconde (b) division de méiose.

## 2.2 Les caractères originaux de la prophase I

La prophase I est une étape longue qui peut représenter jusqu'à 90 % de la durée de la méiose. Elle est caractérisée par l'appariement des chromosomes homologues bichromatidiens, formant alors des paires ou bivalents (figure TP9.7). Les points de contact entre chromatides homologues sont les **chiasmats**, qui matérialisent les **crossing-over**. Ces derniers génèrent des chromatides recombinés et sont à l'origine du **brassage intrachromosomique**.

Voir ouvrage de  
2<sup>e</sup> année

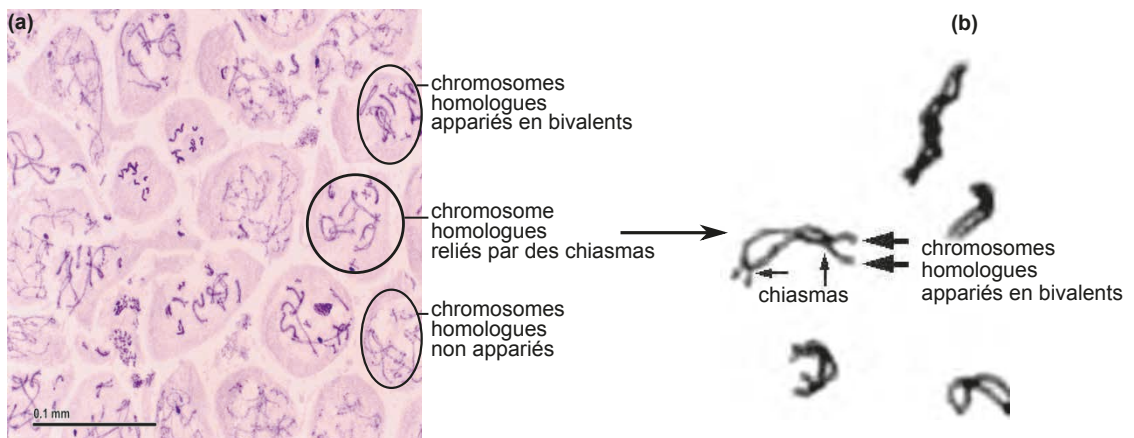


Figure TP9.7 Appariement des chromosomes homologues et formation des bivalents.

(a) Différentes figures de prophase I ; (b) chromosomes homologues appariés et chiasmats.

Lors de l'anaphase I, les chromosomes homologues bichromatidiens recombinés sont distribués aléatoirement entre les deux cellules haploïdes. Et pendant l'anaphase II, ils sont distribués aléatoirement au sein des quatre cellules. Ces deux processus constituent le **brassage interchromosomique**.

# Méthodes d'étude des gènes et de leur expression

## Activités pratiques

### PLAN DU CHAPITRE

- 1 Interpréter des résultats d'électrophorèse d'ADN
- 2 Exploiter des résultats de séquençage
- 3 Étudier l'expression d'un gène

### INTRODUCTION

Différentes techniques sont couramment utilisées au laboratoire pour étudier les génomes et leur expression. Leurs principes ont été présentés dans les chapitres 13 et 15. Ce TP permet d'approcher quelques-unes de leurs applications.

Seul un petit nombre d'entre elles, comme l'électrophorèse d'ADN peut être mis en œuvre en TP. Les autres donneront lieu à des exercices utilisant l'outil informatique, pour exploiter les résultats de banques de séquences d'ADN, ou mettant en relation les résultats de différentes méthodes, pour explorer les conséquences de l'expression d'un gène.

## 1 Interpréter des résultats d'électrophorèse d'ADN

### 1.1 Séparer les fragments de restriction par électrophorèse

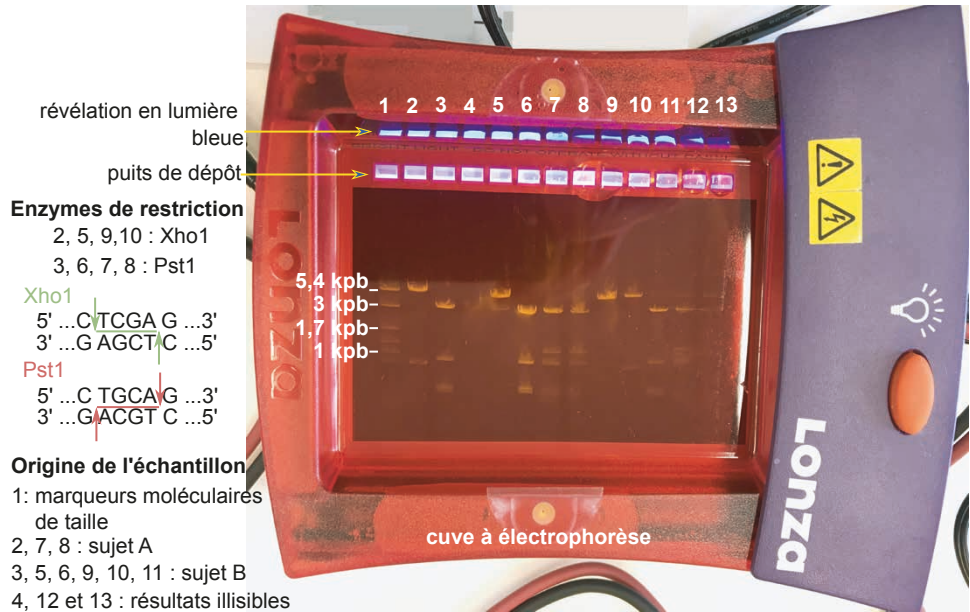
L'ADN peut être clivé, de façon reproductible, en fragments par des enzymes produites par des bactéries appelées **endonucléases de restriction** ou plus simplement **enzymes de restriction**. Elles catalysent l'hydrolyse de la liaison phosphodiester entre deux nucléotides situés à l'intérieur de la molécule (et non pas à l'une de ses extrémités). Cette hydrolyse a lieu au niveau d'une séquence spécifique ; les fragments de restriction sont donc spécifiques de l'enzyme.

Pour une enzyme donnée, les sites de coupure (site de restriction) varient selon les individus, du fait de la diversité des séquences génomiques : la taille des fragments de restriction varie aussi. C'est le **polymorphisme des fragments de restriction**. En séparant les fragments issus de l'action d'une ou plusieurs enzymes de restriction sur deux ADN différents, on obtient des bandes situées à des distances variables sur le gel. C'est là le principe de diverses méthodes d'analyse, comme celle des empreintes génétiques.

Dans l'expérience dont le résultat est rapporté sur la [figure TP10.1](#), on s'intéresse à l'allèle d'un gène porteur d'une délétion. Une portion d'ADN incluant ce gène et provenant de deux sujets (A et B), dont l'un est porteur de la délétion, a été digérée par deux enzymes de restriction. **On cherche à savoir lequel des sujets est porteur de la délétion.**

Voir chapitre 13,  
§ 3.1b

On s'attend à ce que la séquence d'ADN avec la délétion présente moins de sites de restriction pour une enzyme donnée, donc moins de fragments, que la séquence complète. L'électrophorèse montre qu'avec chacune des deux enzymes, le sujet A présente plus de fragments que le sujet B : avec l'enzyme Xho1, 2 fragments de restriction pour A (piste 2) et un seul fragment pour B (pistes 5, 9 et 10) ; avec l'enzyme Pst1, 4 fragments au moins pour A (pistes 7 et 8) et 3 fragments pour B (pistes 3, 6 et 11). C'est donc le **sujet B qui est porteur de la délétion**.



**Figure TP10.1** Résultats de l'électrophorèse sur gel d'agarose de fragments de restriction de l'ADN de deux sujets (coloration au bromure d'éthidium et révélation par lumière bleue).

Xho1 et Pst1 sont deux endonucléases de restriction (dont les sites de coupure sont indiqués). Les marqueurs de taille de la piste 1 ne sont pas exploités dans cet exemple.

## 1.2 Déterminer la taille de fragments d'ADN séparés par électrophorèse

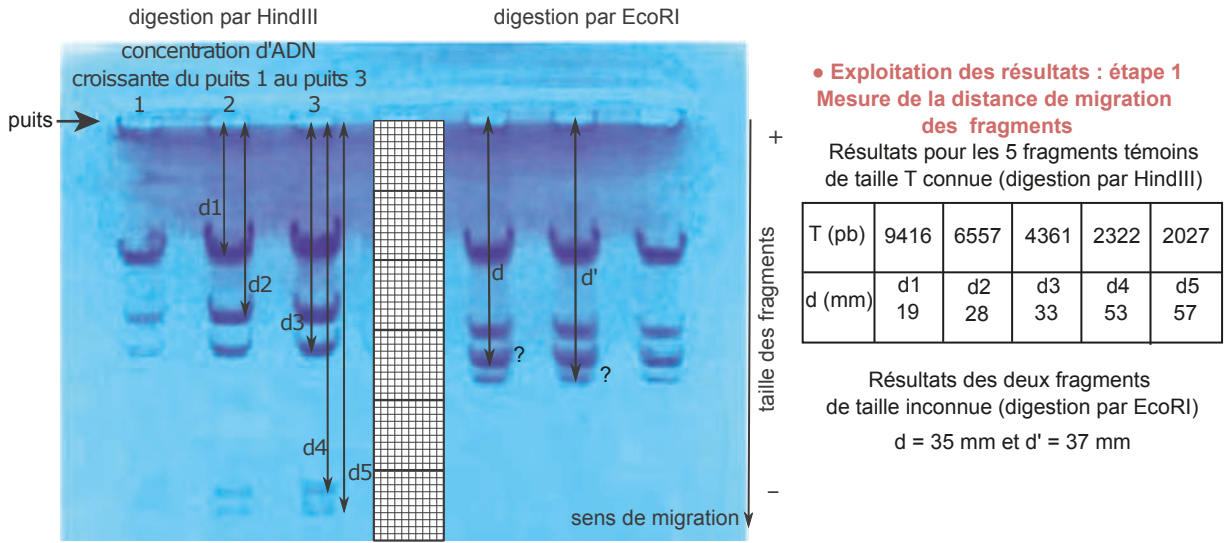
La **figure TP10.2** montre comment déterminer la taille de fragments de restriction à partir d'une autre électrophorèse d'ADN.

L'ADN d'un virus (bactériophage  $\lambda$ ) a été digéré séparément par une des deux enzymes de restriction, HindIII ou EcoRI. Après chaque digestion, les fragments sont soumis à une électrophorèse sur gel ; après révélation ils apparaissent sous forme de bandes bleu foncé. On connaît les tailles des 5 fragments obtenus avec HindIII. **On cherche à déterminer les tailles des deux plus petits fragments obtenus avec EcoRI.**

La méthode utilisée est la même que celle déjà vu pour les protéines. Le logarithme de la taille T (ou du poids moléculaire) d'un fragment est une fonction affine de sa distance de migration D :  $\log(T) = a \times D + b$  avec  $a < 0$ .

**Résultats** : pour les distances  $d = 35$  mm et  $d' = 37$  mm, la courbe étalon indique respectivement une taille d'environ **4 900 pb et 4 500 pb**.

Voir TP4, figure 7.4



Électrophorèse de fragments de restriction d'ADN du bactériophage  $\lambda$  après traitement pas deux enzymes de restriction

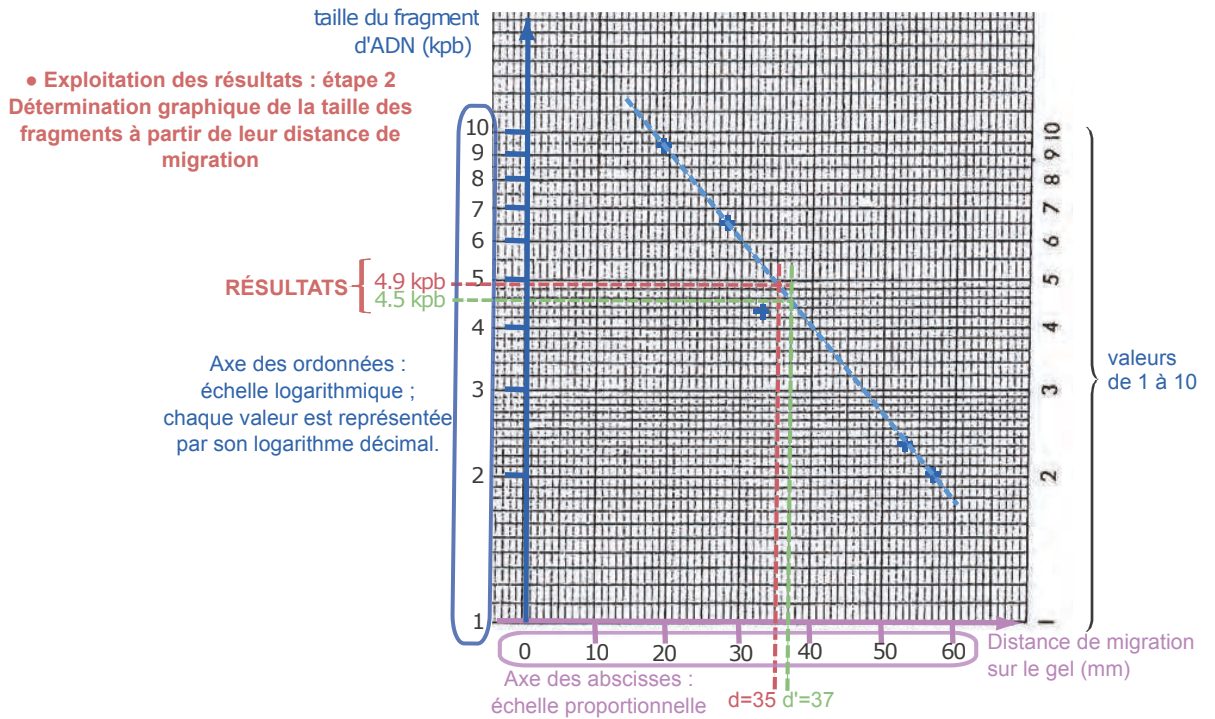


Figure TP10.2 Détermination de la taille de fragments d'ADN.

## 2

## Exploiter des résultats de séquençage

Voir chapitre 13, § 1.2

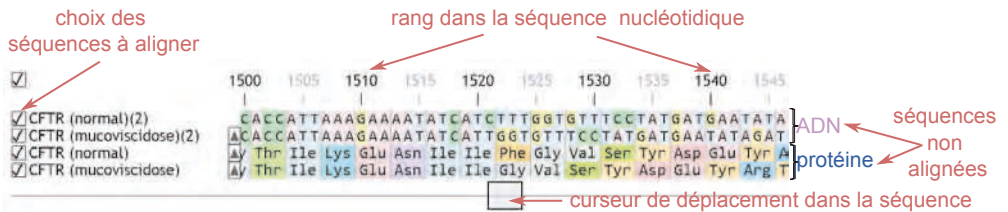
Des bases de données internationales comme celle du NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) mettent à la disposition de tous, les résultats du séquençage des différents génomes ainsi que les annotations qui les accompagnent. Elles comprennent aussi des outils de recherche d'une séquence nucléotidique donnée dans le génome d'une espèce ou celui d'un groupe d'espèces (BLAST pour *basic local alignment search tool*). Nous verrons ici deux exemples qui illustrent des applications des alignements de séquences.

## 2.1 Alignement des séquences de deux allèles d'un gène

Aligner deux ou plusieurs séquences (ADN et ADN ou ADN et ARN) revient à les superposer, de manière à en faire ressortir les régions homologues (héritées d'un ancêtre commun) ou complémentaires pour l'ADN et l'ARN. Ceci est réalisé par des programmes informatiques, dont certains sont accessibles en ligne. Pour optimiser les similarités entre séquences, des « trous » (*gap*) doivent être introduits, qui correspondent soit à des délétions, soit à des insertions.

Dans l'exemple rapporté sur la figure TP10.3, l'alignement permet de comparer deux allèles du gène codant la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). La déficience de cette protéine formée d'environ 1 500 acides aminés est à l'origine de la mucoviscidose, une maladie génétique qui se traduit notamment par des troubles respiratoires.

## 1. Chargement des séquences



## 2. Alignement des séquences

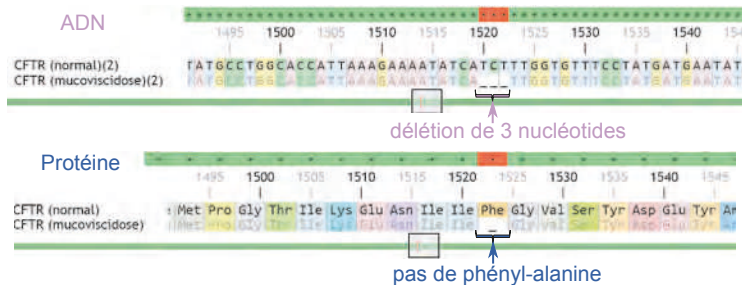


Figure TP10.3 Alignement de séquences de deux allèles du gène codant la protéine humaine CFTR et de leurs produits, réalisé avec le logiciel Géniegen 2 (<http://acces.ens-lyon.fr/acces/logiciels/applications/geniegen>).

L'allèle muté est porteur d'une **délétion** ; son expression conduit à une protéine à qui il manque un acide aminé.

Il est également possible de chercher à aligner des séquences homologues de différentes espèces, par exemple pour réaliser un arbre phylogénétique sur des données moléculaires.

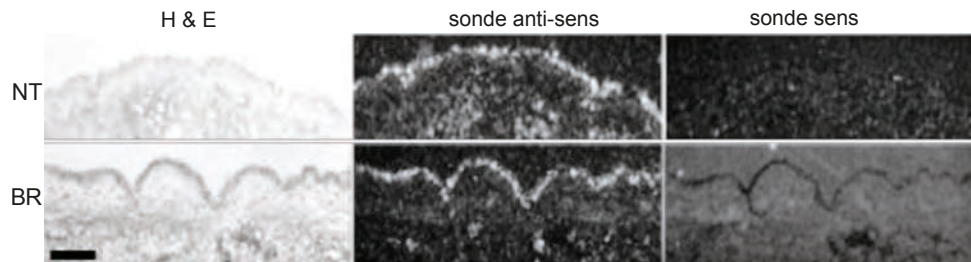
Voir TP 14, § 2



de l'ARNm *CFTR* (figure TP10.5). Les coupes sont ensuite exposées à une émulsion photographique (impressionnée par les particules radioactives).

L'échelle des micrographies ne permet pas de déceler les contours cellulaires. Sur les images de gauche, on distingue la lumière du conduit respiratoire, son épithélium qui apparaît plus sombre et un tissu sous-jacent qui pourrait être un conjonctif. Puisque les images de droite sont des vues en négatif de l'autoradiographie, les particules radioactives apparaissent en clair. Elles révèlent la présence de l'ARNm codant la CFTR au voisinage de la lumière des conduits respiratoires donc très probablement au niveau de l'épithélium des voies nasales comme des bronches.

Cette étude permet de localiser les ARNm codant la protéine CTR donc de démontrer que **les cellules épithéliales des voies respiratoires expriment le gène *CFTR***.



**Figure TP10.5** Coupes de la paroi du conduit nasal (NT) et d'une bronche (BR) d'un sujet sain.

(clichés du Dr Kreda, reproduit de Kreda et al., 2005. « Characterization of Wild-Type and  $\Delta F508$  Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator in Human Respiratory Epithelia », *Molecular Biology of the Cell* 16, 2154 -2167).

H & E : photographies en noir et blanc de coupes colorées à l'hématoxyline et à l'éosine ; *sonde anti-sens* : vue en négatif d'une autoradiographie de coupes incubées avec une sonde nucléotidique radioactive et spécifique de l'ARNm *CFTR* ; *sonde sens* : vue en négatif d'une autoradiographie de coupes incubées avec une sonde nucléotidique radioactive servant de contrôle ; barre d'échelle : 1 mm.

### 3.2 Analyser les effets d'une mutation

#### a) Distribution de la protéine CFTR chez des sujets sains ou malades

**On cherche à localiser la protéine CFTR dans les voies respiratoires par immunodétection. Cette protéine est un transporteur membranaire des ions  $Cl^-$ .**

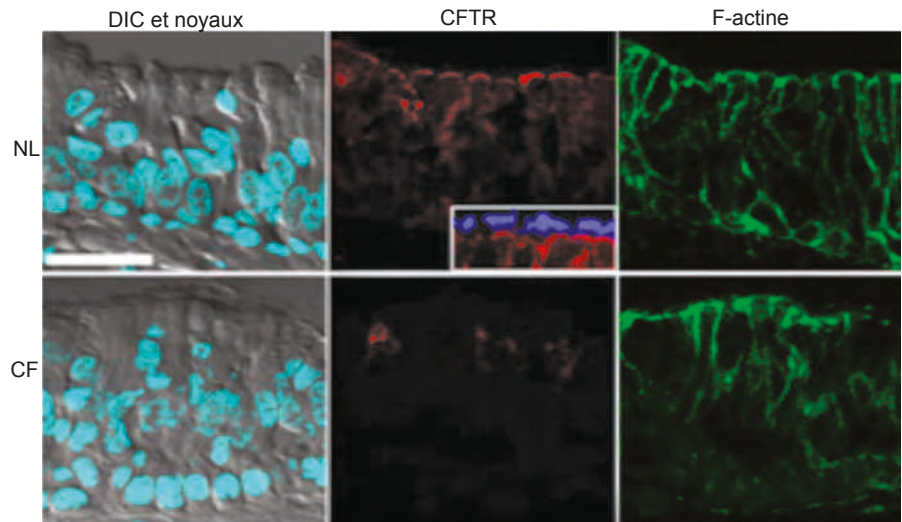
Des prélèvements de la paroi nasale ont été réalisés sur des sujets sains (NL) et sur des sujets atteints de mucoviscidose (*Cystic Fibrosis* CF). La figure TP 10.6 montre des résultats représentatifs de chacun des deux groupes.

Les marquages bleu et vert permettent respectivement de repérer le pôle basal (vers lequel se trouvent de nombreux noyaux) et le pôle apical où l'actine est plus abondante. On retrouve ici la polarité structurale et moléculaire observée pour les entérocytes. La fluorescence rouge qui repère la protéine CFTR n'est présente que dans les cellules des sujets sains. L'encart révèle qu'elle est associée à la fluorescence bleue qui repère les cils. **La protéine CFTR est donc présente au pôle apical des cellules de l'épithélium des voies respiratoires** (au moins les voies nasales) et uniquement chez les sujets sains. C'est en accord avec sa localisation membranaire. La mutation du gène *CFTR* entraîne donc l'absence d'une protéine membranaire au pôle apical des cellules épithéliales.

Des expériences analogues permettent de montrer que l'effet de la mutation est le même dans les cellules épithéliales des bronches et bronchioles.

Voir TP 7, § 2.1

Voir chapitre 5, § 1.3



**Figure TP10.6.** Immunodétection de la protéine CFTR dans l'épithélium nasal chez des sujets sains (NL) ou atteints de mucoviscidose (CF).

(clichés du Dr Kreda, reproduit de Kreda et al., 2005. « Characterization of Wild-Type and  $\Delta F508$  Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator in Human Respiratory Epithelia », *Molecular Biology of the Cell* 16, 2154–2167).

DIC et noyaux : microscopie à contraste interférentiel et marquage de l'ADN par le DAPI (bleu) ; CFTR : immunodétection avec des anticorps de souris (rouge) dirigés contre la protéine CFTR ; encart : immunodétection avec des anticorps de souris (rouge) dirigés contre la protéine CFTR et des anticorps dirigés contre la tubuline pour révéler les cils (bleu foncé) ; F-actine : marquage de l'actine du cytosquelette par la phalloïdine (verte) ; barre d'échelle : 40  $\mu\text{m}$ .

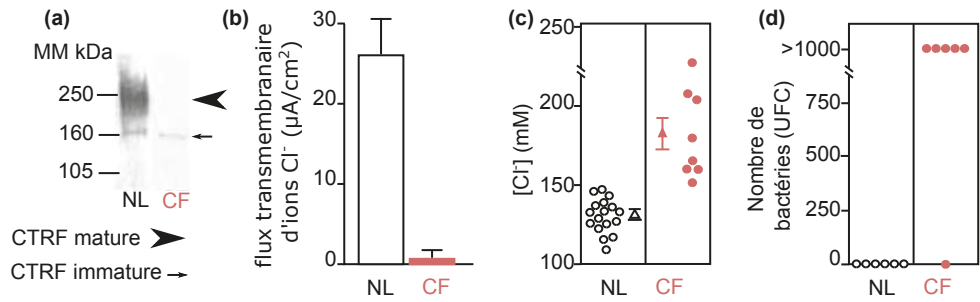
Les voies respiratoires (dont le conduit nasal) sont bordées d'un épithélium cilié. La structure de ces cellules est proche de celle vue au chapitre 6 pour les cellules de l'épithélium intestinal (mais les entérocytes ne sont pas ciliés).

### b) Fonctionnement des tissus mutés

Les résultats de différentes mesures de fonctionnalités associés à la membrane des cellules épithéliales sont rapportés par la [figure TP10.7](#).

**On cherche les fonctions de la protéine CFTR dans les cellules des voies respiratoires ; pour cela on compare les propriétés membranaires (flux membranaires d'ions  $\text{Cl}^-$ ) et l'environnement bactérien de cellules mutées ou non.**

Le *western blot* (a) confirme l'absence de la protéine CFTR mature dans les cellules mutées. En comparaison avec les cellules prélevées sur les sujets sains, les cellules mutées montrent une absence de flux transmembranaire de  $\text{Cl}^-$  (b), un excès de  $\text{Cl}^-$  dans le liquide à la surface de l'épithélium nasal (c) et une importante densité de bactéries, alors que celles-ci sont absentes chez les sujets sains (d). On peut donc en déduire que la protéine CFTR est une **protéine impliquée dans la réabsorption des ions  $\text{Cl}^-$**  vers l'intérieur des cellules épithéliales ; l'excès de  $\text{Cl}^-$  à la surface des voies nasales est corrélé à un important développement bactérien qui peut être à l'origine d'infections chez les patients atteints de mucoviscidose. Le *western blot* (a) montre aussi que la protéine codée par l'allèle muté est produite mais soit elle est dégradée avant d'être fonctionnelle, soit la mutation empêche sa maturation post-traductionnelle (glycosylation).



**Figure TP10.7** Comparaison des fonctions de la protéine CFTR dans des cellules prélevées sur des sujets sains (NL) ou porteurs d'une mutation du gène codant la protéine CFTR (CF).

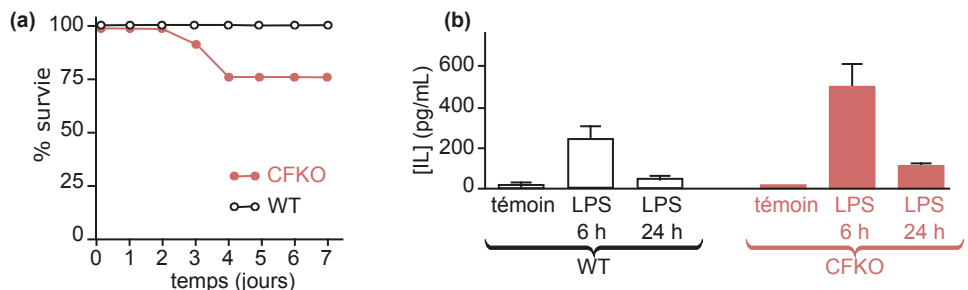
(a) et (b) d'après Kreda et al., 2005 ; (c) et (d), d'après Smith et al., 1996. « Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid », *Cell* 85, 229-236.

(a) western-blot réalisé sur des extraits de cellules de l'épithélium nasal après révélation avec des anticorps dirigés contre la protéine CFTR ; (b) flux d'ions Cl<sup>-</sup> à travers la membrane plasmique de ces mêmes cellules ; (c) concentration en ions Cl<sup>-</sup> dans le liquide récolté à la surface de l'épithélium nasal ; (d) nombre de bactéries récoltées après 24 heures à la surface de l'épithélium nasal (UFC : unités formant colonies).

### 3.3 Analyser les effets de l'inactivation d'un gène

L'inactivation d'un gène, plus communément appelée le knock-out (KO) d'un gène, est une technique consistant à insérer un ADN exogène non codant à la place du gène à invalider. On obtient alors des individus transgéniques homozygotes pour cet allèle muté. Il en résulte l'inactivité ou l'absence de la protéine codée par ce gène (perte de fonction). Ainsi, d'après les phénotypes observés, cela permet de proposer un rôle pour la protéine codée par le gène d'intérêt. On dispose d'une souche de souris (CFKO) dans laquelle le gène *CFTR* a été invalidé. Des souris KO et des souris témoins sont exposées à des lipopolysaccharides bactériens, ce qui déclenche une inflammation (figure TP10.8). On compare les taux de survie des deux groupes de souris pendant 7 jours et les concentrations plasmatiques d'interleukine (IL), une molécule impliquée dans la réponse inflammatoire (réponse immunitaire à une infection pouvant entraîner une dégradation de l'état général).

**En comparant les phénotypes des souris CFKO et des souris sauvages (WT) on cherche à préciser les rôles de la protéine CFTR.**



**Figure TP10.8** Comparaison des effets de la réaction inflammatoire sur des souris KO pour le gène *CFTR* (CFKO) et des souris sauvages (WT).

(d'après Vij et al., 2010. « CFTR is a negative regulator of NFκB mediated innate immune response », *PLoS ONE* 4(2) : e4664. Doi :10.1371/journal.pone.0004664).

(a) Taux de survie suite à une injection de lipopolysaccharides bactériens induisant une réponse inflammatoire ; (b) concentration plasmatique d'une interleukine (IL) suite à l'injection de sérum physiologique (témoin) et de lipopolysaccharides bactériens (LPS).

Voir chapitre 15,  
zoom 4

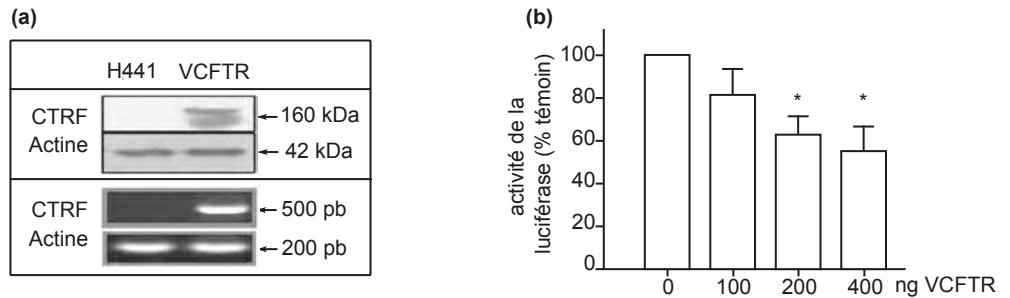
Les souris CFKO récupèrent moins bien que les souris WT, de l'inflammation induite par les lipopolysaccharides bactériens, leur survie est diminuée de 25 %. La concentration en interleukine dans le plasma est le double de celle des souris WT, que ce soit 6 h ou 24 h après l'injection. Ces résultats suggèrent que la protéine CFTR protège les souris de la réaction inflammatoire qui peut être létale.

### 3.4 Analyser les effets d'une transgénèse

D'autres protocoles, dits de gain de fonction, permettent de faire synthétiser la protéine d'intérêt dans une cellule (ou un tissu) où le gène qui la code est absent ou réprimé. Le phénotype conféré par cette expression artificielle (ectopique) du gène est alors analysé. Sa comparaison avec celui **de cellules n'exprimant pas le gène contribue à préciser les rôles de la protéine d'intérêt.**

Dans les expériences dont les résultats sont rapportés par la [figure TP10.9](#), on réalise une construction génétique (transgène) comprenant la séquence de l'allèle du gène *CFTR* et son promoteur. Elle est suivie par la séquence du gène de la luciférase (une protéine catalysant une réaction de bioluminescence) placée sous le contrôle d'un autre promoteur P. Celui-ci est activé par un facteur de transcription produit lors de la réponse inflammatoire.

Ce transgène est inséré dans un vecteur (plasmide) (vecteur VCFTR) puis transfecté dans des cellules pulmonaires humaines (lignée H441). Le témoin est constitué par des cellules H441 qui reçoivent un vecteur comprenant uniquement le gène de la luciférase sous contrôle du promoteur P.



**Figure 10.9** Effets de l'expression artificielle du gène *CFTR*.

(d'après Hunter et al., 2010 « Expression of wild-type CFTR suppresses NF- $\kappa$ B-driven inflammatory signaling », *PLoS ONE* 5(7): e11598. doi:10.1371/journal.pone.0011598).

**(a)** en haut : électrophorèse d'extraits cellulaires suivie d'un transfert sur feuille de nitrocellulose, et d'une immunodétection de la protéine CFTR (*western-blot*) réalisée sur des cellules H441 (H441) et sur des cellules transfectées (VCFTR) ; en bas : électrophorèse après *Reverse-Transcriptase PCR* (RT-PCR) de l'ARNm CTRF et de celui de l'actine ; **(b)** activité de la luciférase dans des cellules H441 transfectées avec différentes quantités de vecteur VCFTR (100 à 400 ng) ou avec un vecteur ne contenant que le gène de la luciférase et le promoteur P activé lors de la réponse inflammatoire (lot 0) ; un test statistique a montré que les différences marquées d'une étoile sont significatives.

- **Les résultats (a) testent l'efficacité de la transgénèse.**

- L'actine sur l'électrophorèse du haut, et le produit de RT-PCR de l'ARNm de l'actine sur celle du bas, sont présents dans les mêmes quantités dans les cellules transfectées ou non. Ces molécules ont été choisies parce qu'elles sont présentes à un niveau élevé dans tous les types cellulaires. Ce sont des **témoins de charge**, qui indiquent que la même quantité d'extrait cellulaire a été déposée dans les deux puits d'une même électrophorèse, ce qui autorise la comparaison quantitative entre les deux échantillons.
- L'électrophorèse du bas a séparé des **acides nucléiques**, ici de l'ADNc rétrotranscrit de l'ARNm (repère de taille exprimés en pb). La présence de **l'ARNm codant la protéine**

Voir chapitre 15,  
zoom 3

Voir TP8, §1.1

**CFTR** est mise en évidence par RT-PCR. On constate ainsi que **les cellules transfectées transcrivent le gène CFTR**, mais pas les cellules H441.

- L'électrophorèse du haut a séparé des **protéines** (repère de masse moléculaire exprimé en kDa). La présence de la **protéine CFTR** est mise en évidence par un **western-blot dans les cellules transgéniques seulement**. Les cellules transgéniques synthétisent bien la protéine CFTR.
- **Les résultats (b) testent les effets de l'expression ectopique du gène CFTR.**
  - L'enzyme luciférase a été retenue comme outil parce que son activité forme un produit **luminescent** : il émet une radiation lumineuse dont l'intensité à une longueur d'onde donnée peut être mesurée, pour quantifier l'activité de l'enzyme. Le gène codant la luciférase a été placé sous le contrôle d'un promoteur activé lors de la réponse inflammatoire : ainsi, l'activité de la luciférase rend compte de la présence éventuelle dans les cellules des facteurs de transcription produits lors de la réaction inflammatoire. Le gène de la luciférase n'est pas l'objet de l'étude, c'est un outil, qui rend compte de l'expression d'un gène d'intérêt (ici le gène *CFTR*) : c'est un **gène rapporteur**. Plus l'activité de la luciférase est élevée, plus le promoteur contrôlant la transcription de son gène est actif.
  - Les cellules transfectées avec les vecteurs ne contenant que le gène de la luciférase et le promoteur P constituent le **témoin négatif** : elles permettent de quantifier le niveau de transcription en l'absence de protéine CFTR dont le gène n'a pas été introduit. Ce niveau n'est pas nul, ce qui suggère que l'activation du promoteur P ne se fait pas exclusivement dans le contexte d'une réaction inflammatoire.
  - Les résultats montrent que l'activité de la luciférase (donc l'activation du promoteur P) est inversement corrélée à la quantité de vecteurs VCFTR qui a servi à transfecter les cellules. Donc **la protéine CFTR inhibe l'activité d'un promoteur qui est habituellement activé par la réaction inflammatoire**.
- **Les résultats des expériences de perte de fonction (§ 3.3) et de gain de fonction (§ 3.4) peuvent être confrontés.**

Les résultats obtenus *in vitro* confirment ceux obtenus *in vivo*. Ils montrent que la protéine CFTR joue un **rôle inhibiteur de réactions impliquées dans la réponse inflammatoire**. Elle a donc des propriétés anti-inflammatoires : en son absence, la réaction est plus longue et potentiellement mortelle pour les souris.

La figure TP10.10 résume différentes approches permettant d'étudier l'expression d'un gène.

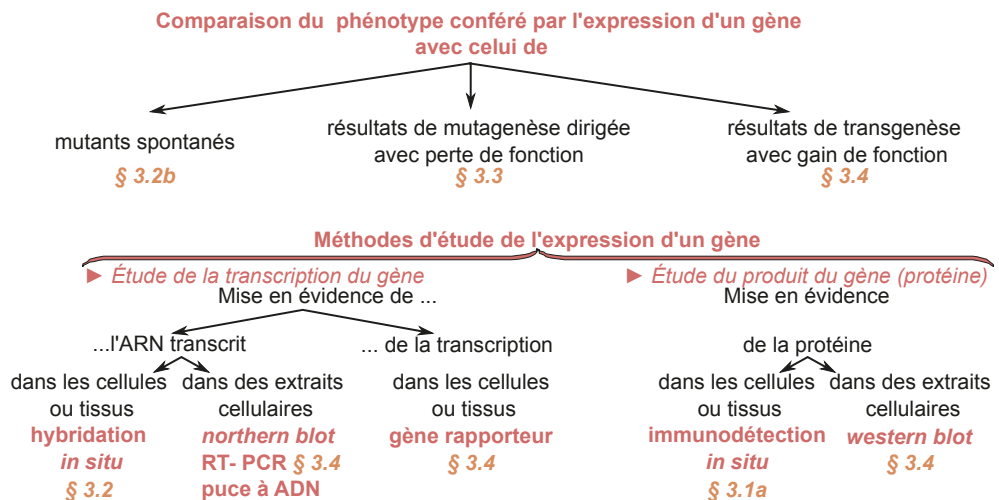


Figure TP10.10 Différentes méthodes d'étude de l'expression d'un gène.

Voir chapitre 15,  
zoom 5

# S'entraîner

1 Repérez les propositions exactes à propos des résultats de la figure TP10.11.

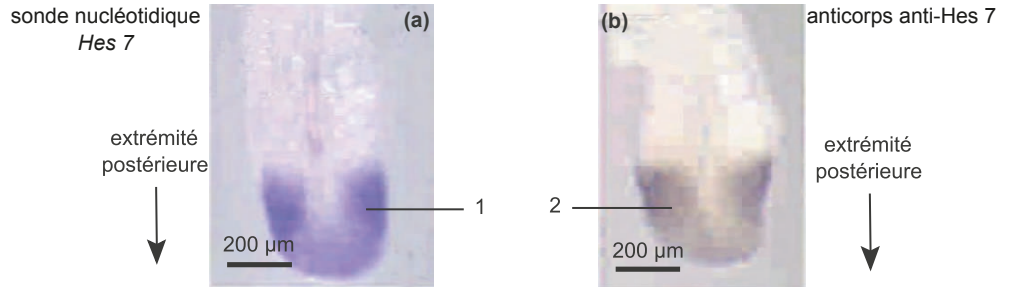


Figure TP10.11 Embryons de souris de 5,5 jours après fécondation.

(a) Incubation avec une sonde nucléotidique spécifique de l'ARNm du gène *Hes 7* ; (b) incubation avec un anticorps spécifique de la protéine *Hes 7*.

- a. La coloration 1 montre que le gène *Hes 7* est présent dans la région postérieure.
- b. La coloration 1 montre que le gène *Hes 7* est transcrit dans cette région.
- c. La coloration 1 montre que la protéine *Hes 7* est synthétisée dans cette région.
- d. L'image (b) montre les résultats d'une expérience d'hybridation *in situ*.
- e. Pris individuellement, les résultats de l'image (a) permettent de connaître le domaine de transcription du gène *Hes 7*.
- f. Pris individuellement, les résultats de l'image (b) permettent de connaître le domaine de traduction de la protéine *Hes 7*.

2 Lorsqu'ils sont immergés, les plants de riz produisent de l'éthylène. L'une des réactions de la chaîne de synthèse est catalysée par l'enzyme ACS. Des plants de riz ont été génétiquement modifiés pour exprimer le gène *GUS* codant la  $\beta$ -glucuronidase sous le contrôle du promoteur du gène *ACS*. L'activité de la protéine *GUS* est quantifiée en présence de son substrat (*X-Gluc*) qui est clivé en un produit bleu, dans des tiges de plants de riz transgéniques *ACS-GUS* cultivés 24 h en immersion ou à l'air libre (figure TP10.12).

activité de la protéine *GUS* (U/mg protéine)

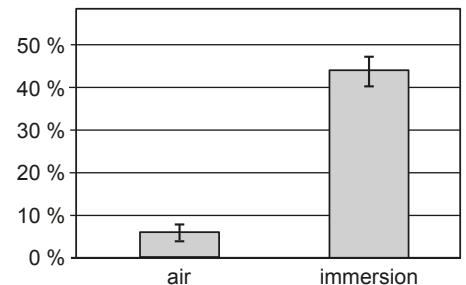


Figure TP10.12 Activité de la protéine *GUS* dans des plants de riz transgéniques à l'air libre ou en immersion

Repérez les propositions exactes à propos de ces résultats :

- a. Le protocole étudie les effets de l'immersion sur l'activité de la protéine *GUS*.
- b. Le gène *GUS* est un gène rapporteur.
- c. L'activité de la protéine *GUS* est 9 fois plus importante à l'air libre qu'en immersion.
- d. Ces résultats démontrent que l'immersion active la transcription du gène *ACS*.
- e. Ces résultats démontrent que l'immersion active la synthèse de la protéine *ACS*.

## Partie SV-G

# Reproduction

### OBJECTIFS DU PROGRAMME

#### Capacités exigibles

Réaliser une dissection florale et établir le diagramme floral et la formule florale correspondants. **1**

Utiliser une flore et/ou un outil numérique de détermination pour identifier le genre d'une fleur. **2**

Sélectionner la flore la plus appropriée pour répondre au problème posé.

Mettre en lien les deux principaux types de pollinisation (anémogame et entomogame) et les caractères des fleurs et des grains de pollen associés. **3**

Émettre des hypothèses sur le mode de pollinisation à l'aide des structures observées suite à une dissection florale et/ou un montage de grains de pollen.

# La fleur des angiospermes

## Activités pratiques

### PLAN DU CHAPITRE

- 1 Comprendre l'organisation florale
- 2 Identifier le genre d'une fleur
- 3 Relier caractères floraux et modes de pollinisation

### Introduction

La fleur est l'appareil reproducteur des angiospermes. Après fécondation, certaines structures se transforment en fruit contenant des graines. L'organisation de la fleur présente une grande diversité et son étude permet d'identifier les espèces.

## 1 Comprendre l'organisation florale

### 1.1 L'analyse florale

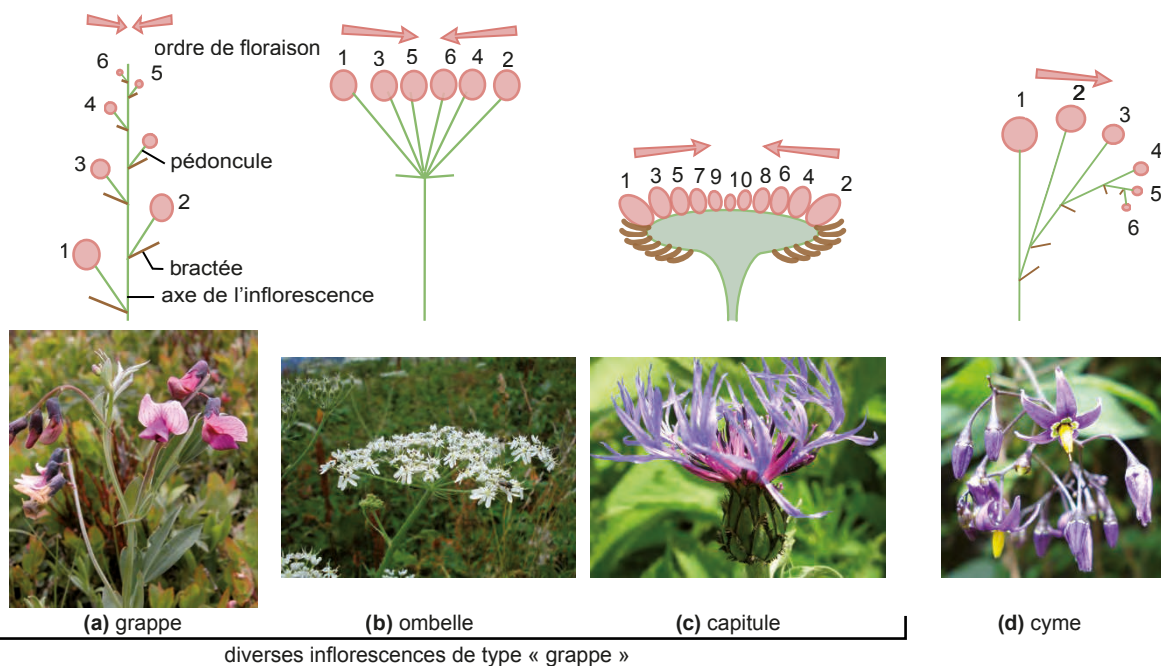
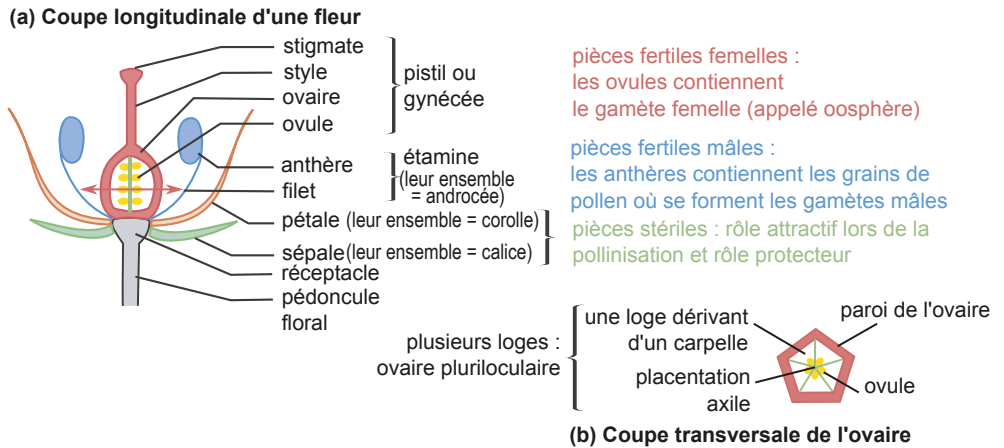


Figure TP11.1 Deux catégories d'inflorescences chez les angiospermes.

Lorsque les fleurs sont regroupées et non isolées, on parle d'inflorescence. Les diverses inflorescences dérivent de deux catégories : la **grappe** et la **cyme** qui se distinguent par l'ordre de mise en place des fleurs (chiffres 1 à 6). (a) grappe de gesse (*Lathyrus montanus*, fabacées) ; (b) ombelle d'ombellules de berce (*Heracleum spondylium*, apiacées) ; (c) capitule de bleuet (*Centaurea montana*, astéracées) (d) cyme de morelle noire (*Solanum dulcamara*, solanacées).

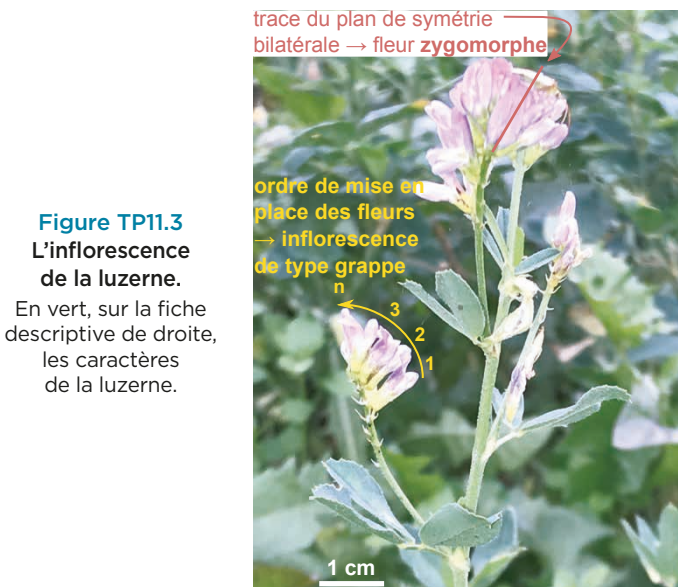
L'analyse florale comporte la caractérisation de l'**inflorescence** (figure TP11.1), le dénombrement et l'identification des caractéristiques des **pièces florales stériles et fertiles** (et du fruit, s'il est présent) (figure TP11.2). Elle permet de repérer les principaux caractères qui sont utilisés pour déterminer la famille, le genre et l'espèce d'un échantillon (à l'aide d'une flore) et de relier certains de ces caractères aux modalités de pollinisation des fleurs.



**Figure TP11.2** Organisation fonctionnelle d'une fleur d'angiosperme.

Les différents types de pièces florales sont disposés en **verticilles** (cycles) concentriques. Le **gynécée** peut être formé d'un (comme pour la luzerne) ou plusieurs **carpelles**, libres ou soudés. Dans ce dernier cas, une coupe transversale (flèche rouge) peut montrer plusieurs loges (ovaire pluriloculaire), chacune d'entre elles dérivant d'un carpelle. Elle montre également le type de **placentation** : **pariétale** ou **axile** selon que les ovules sont fixés à la paroi de l'ovaire ou sur la structure centrale résultant de la fusion des carpelles. Sur ce schéma l'ovaire est situé au-dessus du point d'insertion des autres pièces florales : il est dit « **supère** » (« **infère** » dans le cas contraire).

L'analyse florale peut être conduite en suivant la démarche présentée dans la figure TP11.3 appliquée ici à l'exemple de la luzerne.



**Figure TP11.3** L'inflorescence de la luzerne.

En vert, sur la fiche descriptive de droite, les caractères de la luzerne.

Inflorescence	
fleur isolée – type grappe – type cyme	
Organisation de la fleur	
symétrie	actinomorpe - <b>zygomorphe</b>
calice	♦ nombre de sépales : 5 ♦ libres - <b>soudés</b>
corolle	♦ nombre de pétales : 5 ♦ <b>soudés</b> - libres et 2 pétales ventraux soudés ("carène") ♦ aspect particulier : bilabiée, <b>papilionacée</b> , présence d'un éperon...
androcée	♦ nombre d'étamines : 10 ♦ libres - <b>soudées entre elles</b> - à la corolle <b>9 soudées et une libre</b>
gynécée	♦ nombre de carpelles : 1 ♦ libres - <b>soudés</b> ♦ si carpelles soudés (ovaire composé) : o ovaire uni - ou pluriloculaire o placentation axile ou pariétale ♦ <b>ovaire supère</b> - ovaire infère ♦ nombre d'ovules : n

## 1.2 La dissection florale

La dissection florale permet de présenter l'organisation de la fleur : le nombre, la disposition et les relations entre les différentes pièces florales (figure TP11.4a).

- La présentation des pièces est organisée en deux parties :
  - l'une (à gauche sur l'exemple présenté) est destinée à montrer le nombre de pièces florales, sans tenir compte de leurs soudures éventuelles ;
  - l'autre (à droite sur l'exemple présenté) est constituée de préparations destinées à mettre en évidence la position du gynécée et les soudures éventuelles.
- La présentation est orientée : la bractée est placée sous la dissection, l'axe de la tige est figuré par un cercle au-dessus.
- La présentation rend compte du type de **symétrie** de la fleur :
  - lorsque la fleur est **actinomorphe** (fleur régulière à symétrie radiale), des cercles concentriques sont tracés pour accueillir les pièces ;
  - lorsque la fleur est **zygomorphe** (symétrie bilatérale), ce sont des ellipses.
- La dissection débute par les verticilles les plus externes : les pièces du **calice**, puis les pièces de la **corolle**, de l'**androcée** et du **gynécée** sont placées sur les cercles ou ellipses concentriques tracés en respectant la disposition relative (**superposée** ou **alterne**) des différents verticilles et en repérant si un sépale est superposé à la bractée ou pas.
- La position **supère** ou **infère** de l'ovaire est montrée à l'aide d'un sépale, d'un pétale, d'une étamine et de l'ovaire prélevés sur une autre fleur et disposés sur le côté.
- Si certaines pièces sont soudées, elles sont présentées non séparées mais étalées sur le côté.

### Remarque

Une observation à la loupe binoculaire d'une coupe transversale de l'ovaire est souvent nécessaire pour préciser la structure du gynécée. La dissection des boutons floraux peut aider à repérer la disposition relative des pièces florales. Celle des jeunes fruits peut aider à comprendre l'organisation de l'ovaire, à repérer le nombre d'ovules.

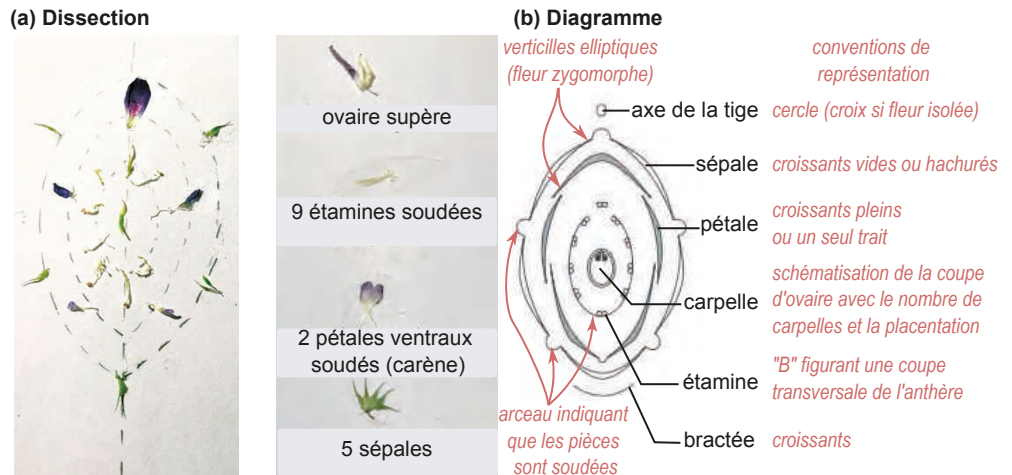


Figure TP11.4 (a) Dissection et (b) diagramme floral de la fleur de luzerne.

La dissection n'est pas légendée, en revanche un titre précise ce que l'on met en évidence avec les pièces présentées sur le côté.

Sur le diagramme d'une fleur isolée, une croix est figurée à la place de l'axe de la tige.

D'autres éléments typiques ou importants pour la biologie de la fleur peuvent être représentés (symboles à l'initiative de l'observateur) : éperons de pétales, nectaires etc.

Les conventions de représentation du diagramme dispensent de légendes : celles de la figure b ne sont données que pour permettre de comprendre ces conventions.

### 1.3 Le diagramme floral et la formule florale

#### a) Le diagramme floral

C'est une représentation théorique d'une coupe transversale de la fleur sur laquelle figureraient toutes les pièces florales. Il est rare de toutes les rencontrer sur une seule coupe transversale : le diagramme est la projection sur un plan de différentes coupes. Comme pour la dissection florale, le diagramme est orienté en positionnant la bractée et l'axe de la tige. Les différentes pièces sont représentées en utilisant des figurés conventionnels (figure TP11.4b).

#### b) La formule florale

La formule florale récapitule les informations sur l'organisation de la fleur. On indique les éléments suivants en respectant les conventions d'écriture : symétrie, sexe, nombre de pièces florales pour chaque verticille (« n » s'il y a plus de 12 pièces) et leur soudure éventuelle, ovaire infère ou supère (figure TP11.5).

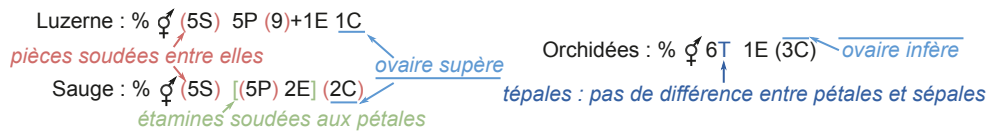


Figure TP11.5 Les éléments d'une formule florale.

#### Remarque

Il convient de vérifier que toutes les fleurs mises à disposition ont la même structure : il peut y avoir des variations sur le nombre ou la forme des pièces : par exemple hétérostylie (styles de longueurs différentes), fleurs fertiles et fleurs stériles, etc.

## 2 Identifier le genre d'une fleur

Il existe diverses flores qui permettent de conduire une identification raisonnée d'une fleur. L'exemple pris ici est la « Flore complète portable » de Gaston Bonnier, avec laquelle il est possible de déterminer le nom de famille, de genre ou d'espèce de l'échantillon étudié.

À chaque étape, deux propositions sont faites (à repérer avec le même signe distinctif : ⊕, Δ, O...) et l'on sélectionne celle qui convient pour l'échantillon à identifier (attention à bien lire en totalité chaque proposition).

#### Remarque

Les mots et expressions employés sont expliqués dans un glossaire à la fin de l'ouvrage. Les abréviations employées sont expliquées en tout début d'ouvrage. À la fin de l'ouvrage figurent les tables des noms de familles, des noms latins des genres, des noms français des genres et des noms français. Les premières pages sont numérotées en chiffres romains (I à XXVII).

#### Exemple : la luzerne

Reportez-vous d'abord au tableau général de la page X de la flore. À chaque étape, les choix successifs des caractères sont séparés par le signe « < » ; à la fin de chaque étape une flèche indique le choix (en gras) qui permet d'avancer dans la détermination.

1. p. X : plante ayant des fleurs... < fleurs non réunies en capitule... < fleurs à deux enveloppes de couleur et de consistance différente < corolle papilionacée...  
→ **Section C : plantes à corolle papilionacée, p. XVIII**
2. Section C : plante n'ayant pas ces caractères  
→ **Papilionacées, p. 65**

3. Papilionacées : feuilles non terminées par une vrille ou par un filet < feuilles à 0, 1, 2 ou 3 folioles... < stipules (= expansions de certaines feuilles situées à la base du pétiole) de plus de 3 mm de longueur... < stipules très différentes des folioles  
→ **3<sup>e</sup> groupe, p. 67**
4. 3<sup>e</sup> groupe : fleurs à carène non contournée... < carène obtuse au sommet... < calice à 5 divisions peu inégales < fruit plus ou moins enroulé sur lui-même...  
→ **Genre Medicago, p. 73 ; Luzerne [37 espèces]**
5. Genre Medicago : fruit courbé sur plus d'un seul tour... < fruit sans épines ni tubercules...  
→ **Série 2, p. 74**
6. Série 2 : bord extérieur du fruit mûr sur un cercle de 4 à 8 mm de diamètre < fleurs violettes, bleues ou bleuâtres...  
→ **Medicago sativa, luzerne cultivée**  
Entre crochets, des caractéristiques (lieux de récolte, taille des plants, couleur des fleurs, période de floraison) permettent de vérifier la cohérence de la détermination.

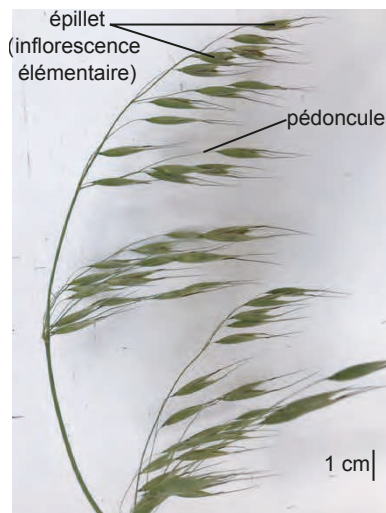
### 3 Relier caractères floraux et modes de pollinisation

#### 3.1 Des fleurs à pollinisation anémogame

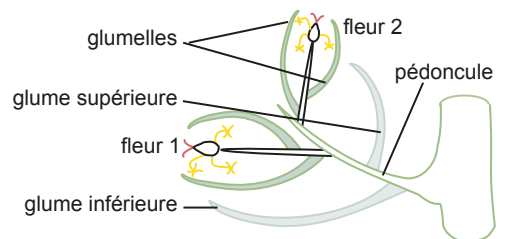
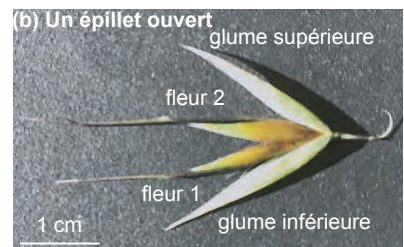
L'exemple des poacées permet d'illustrer les caractéristiques rencontrées chez les plantes dont le pollen est transporté par le vent : on parle de **pollinisation anémogame**.

##### a) Des fleurs groupées au périanthe réduit

Les fleurs sont regroupées en **épillets**, inflorescences élémentaires des poacées, eux-mêmes regroupés en grappe lâche comme chez l'avoine (figure TP11.6), ou grappe condensée en épi comme chez le blé. L'épillet comporte en général à sa base deux bractées appelées **glumes** qui entourent l'inflorescence. Chaque fleur est protégée par deux **glumelles**. Le périanthe se limite à deux **glumellules**, petites pièces vertes qui, lors de l'épanouissement de la fleur, écartent les glumelles, permettant ainsi la sortie des **anthères** et des **stigmates** (figure TP11.7b).



(a) Inflorescence d'avoine cultivée



(c) Schéma de l'organisation d'un épillet

Figure TP11.6 Inflorescence d'avoine cultivée (*Avena sativa*, poacée).

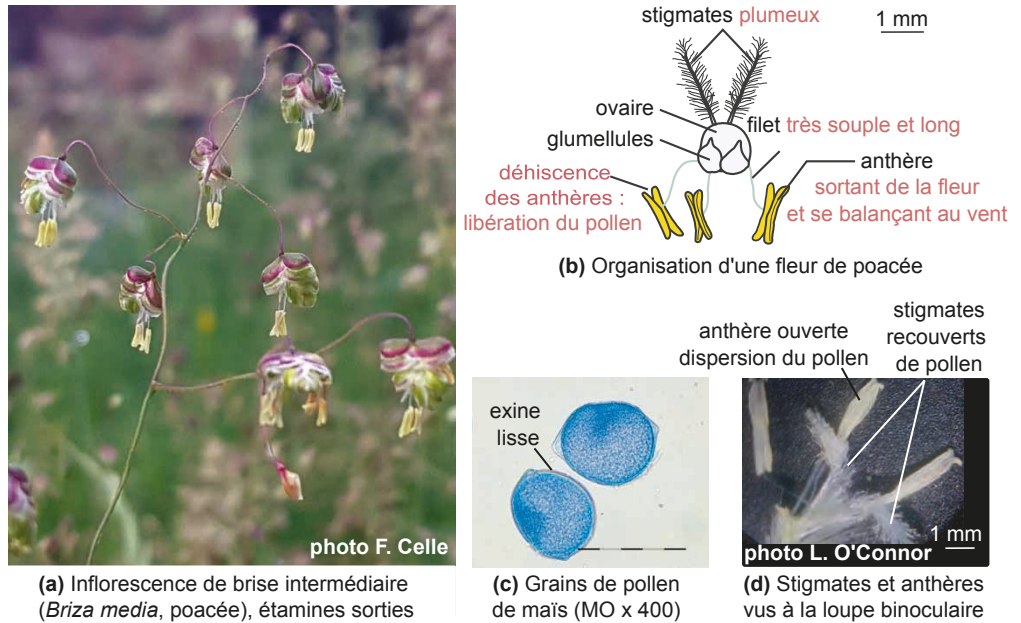


Figure TP11.7 La fleur de poacée et la pollinisation anémogame.

### b) Des anthères pendantes, un pollen abondant

À maturité, les **longs filets** des étamines placent les anthères hors du périanthe. Leur balancement dans le vent facilite la dispersion des **nombreux grains de pollen de petite taille**, légers et lisses (figure TP11.7).

### c) De grandes surfaces réceptrices du pollen

Les **stigmates** sont de taille importante, **plumeux ou collants**, exposés en surface, ce qui favorise la réception du pollen transporté par le vent (figure TP11.7).

## 3.2 Des fleurs à pollinisation entomogame

90 % des plantes à fleurs sont pollinisées par des insectes en quête de nourriture ou d'un partenaire et qui transportent involontairement le pollen d'un plant à l'autre.

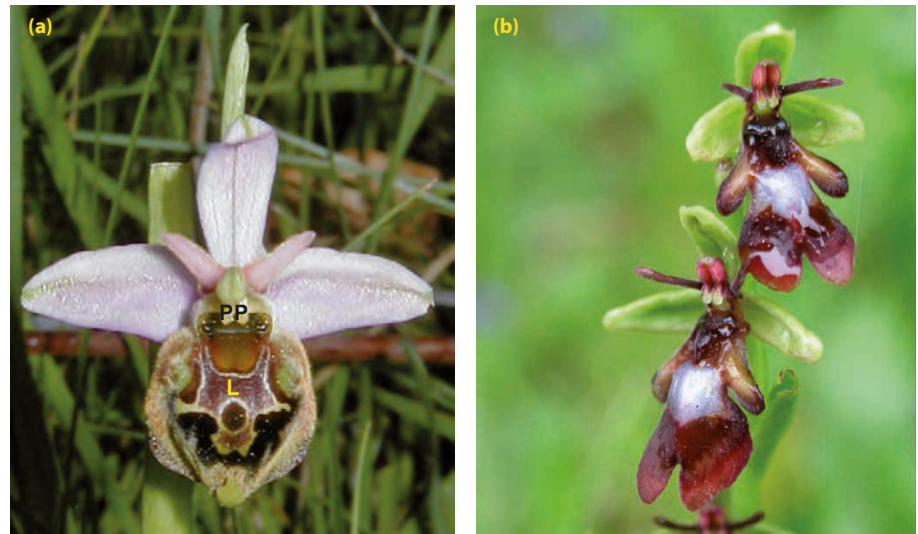
### a) Des structures attractives pour les insectes

- Des pièces périnthaires de couleurs vives exercent une **attraction visuelle** ; la **forme et la couleur des pétales miment parfois l'aspect de femelles d'insectes** (figure TP11.8).
- Des **nectaires**, souvent localisés à la base des pétales, sécrètent le **nectar**, liquide sucré consommé par les insectes ; ils **consommement également le pollen**, riche en réserves.
- La corolle des **fleurs zygomorphes** présente un ou des pétales inférieurs ménageant une large surface facilitant l'atterrissage et induisant un positionnement précis du pollinisateur (figures TP11.8 et 11.9).
- La production de molécules odorantes permet une **attraction olfactive**.

### b) Des dispositifs optimisant la pollinisation

Une très grande diversité de structures et de mécanismes contribue à faciliter l'accrochage des grains de pollen sur le corps de l'insecte et leur dépôt sur le stigmate d'une autre fleur. Les grains de pollen sont de grande taille (et produits en moindre quantité que chez les fleurs anémogames) ; ils présentent une **exine très ornementée adhérent** au pollinisateur.

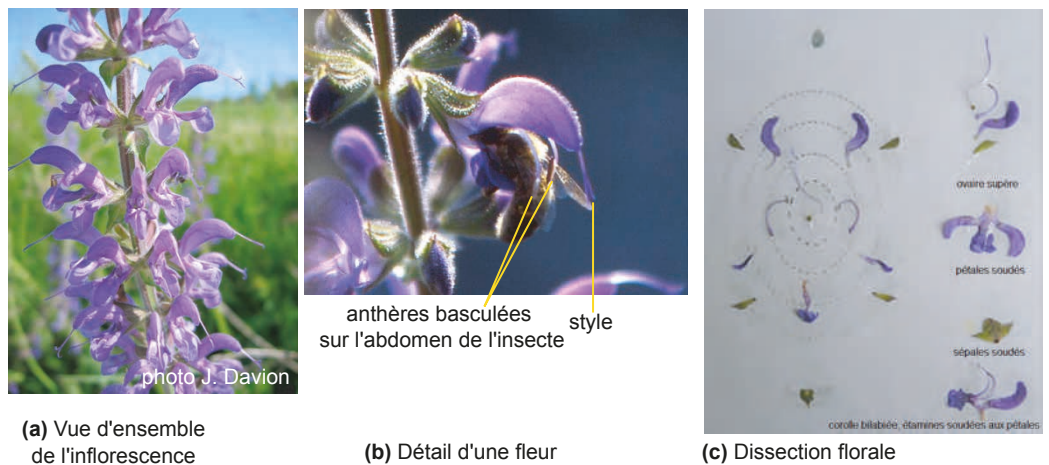
Chez la sauge, l'insecte heurte la base des **étamines qui basculent** et déposent du pollen sur son dos (figure TP11.9). Chez certaines orchidacées (figure TP11.8), les **pollinies** sont reliées par un petit pédoncule à un disque collant qui se fixe sur le corps de l'insecte.



**Figure TP11.8** Un exemple d'organisation attractive pour les insectes : la fleur des orchidacées.

(a) *Ophrys frelon* (*Ophrys holosericea*) ; (b) *ophrys mouche* (*Ophrys insectifera*).

Le pétale inférieur, ou labelle (L) présente un aspect qui mime une femelle d'une espèce précise d'insecte ; les grains de pollen sont regroupés en deux amas, les pollinies (P).



(a) Vue d'ensemble de l'inflorescence

(b) Détail d'une fleur

(c) Dissection florale

**Figure TP11.9** Un exemple de dispositif optimisant la pollinisation chez la sauge des prés (*Salvia pratensis*, lamiacée).

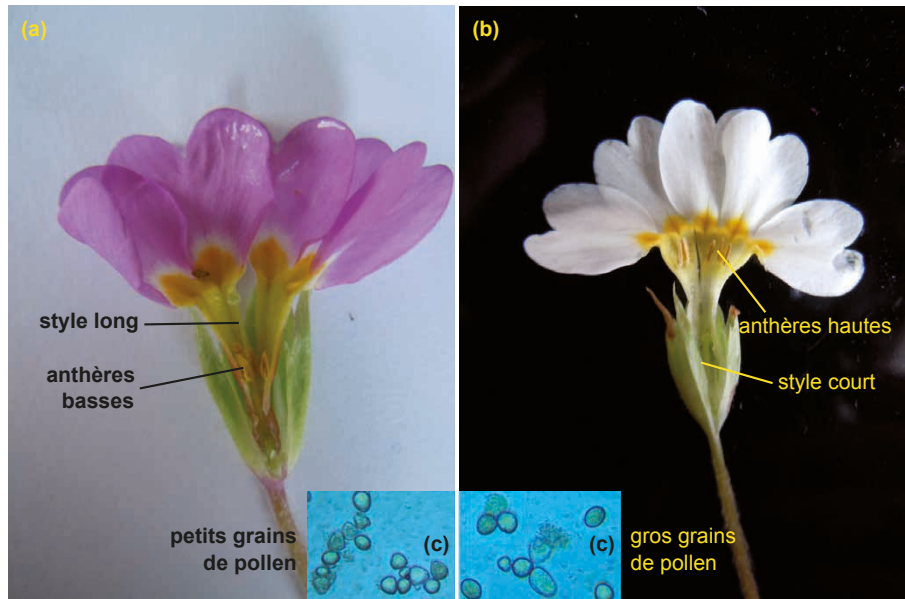
### 3.3 Des dispositifs favorisant l'allopollinisation

Bien que la plupart des fleurs soit hermaphrodite, il existe des dispositifs favorisant la pollinisation croisée ou **allopollinisation** (par opposition à l'autopollinisation).

- Séparation des sexes dans l'espace : chez les espèces dites **monoïques**, les fleurs sont unisexuées, soit mâles soit femelles et le plant porte les deux types de fleurs. C'est le cas du maïs

(*Zea mays*, poacée), par exemple. Chez les espèces dites **dioïques**, les fleurs mâles et les fleurs femelles sont portées par des individus différents.

- Séparation des sexes dans le temps : par exemple chez la pâquerette (*Bellis perennis*, astéracée), les étamines sont mûres avant le pistil.

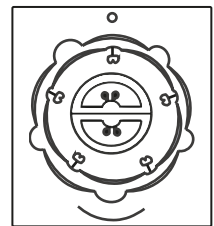


**Figure TP11.10** L'hétérostylie chez la primevère (*Primula grandiflora*, primulacée). **(a)** Fleur longistylée ; **(b)** fleur brévistylée ; **(c)** grains de pollen de chaque type de fleur. Seuls les petits grains de pollen des fleurs longistylées peuvent germer sur les petites papilles stigmatiques des fleurs brévistylées, et seuls les gros grains de pollen des fleurs brévistylées peuvent germer sur les grosses papilles stigmatiques des fleurs longistylées.

- Obstacle mécanique à l'autopollinisation : Chez les orchidacées, le rostellum est une structure saillante localisée sous les pollinies et les séparant du stigmate. Chez la primevère (*Primula sp.*, primulacées), on distingue des individus à style long (fleurs longistylées) et des individus à style court (fleurs brévistylées). Cette **hétérostylie** s'accompagne de différences portant sur la taille des papilles stigmatiques et du pollen, et la localisation des anthères : ces caractéristiques imposent une fécondation croisée (figure TP11.10).

## S'entraîner

- 1 Sélectionnez la ou les proposition(s) cohérente(s) avec le diagramme floral présenté ci-contre (figure TP11.11) :
- a. La fleur est gamosépale.
  - b. L'ovaire est infère.
  - c. La fleur est zygomorphe.
  - d. Les étamines sont soudées aux pétales.
  - e. La placentation est pariétale.



**Figure TP11.11**

- 2 Pour l'échantillon présenté sur photo ci-contre (figure TP11.12), déterminez les caractéristiques de l'inflorescence et le type de symétrie de la fleur.



Figure TP11.12

- 3 Pour la dissection florale ci-contre (figure TP11.13) :
- a. Précisez si cette dissection est complète, sinon indiquez ce qu'il conviendrait d'ajouter.
  - b. Réalisez le diagramme floral correspondant.
  - c. Établissez la formule florale.



Figure TP11.13

- 4 Récapitulez, sous la forme d'un tableau, les caractéristiques des fleurs (et inflorescences) à pollinisation anémogames et entomogames.
- 5 À partir de la dissection florale présentée sur la photo ci-dessous (figure TP11.14), établissez la formule florale correspondante.



Figure TP11.14