



uOttawa

Criblage de lignées rapporteuses pour le transgène 2Pand1eGFP responsable dans l'expression d'actinodine

Par : Omar Salah Salah

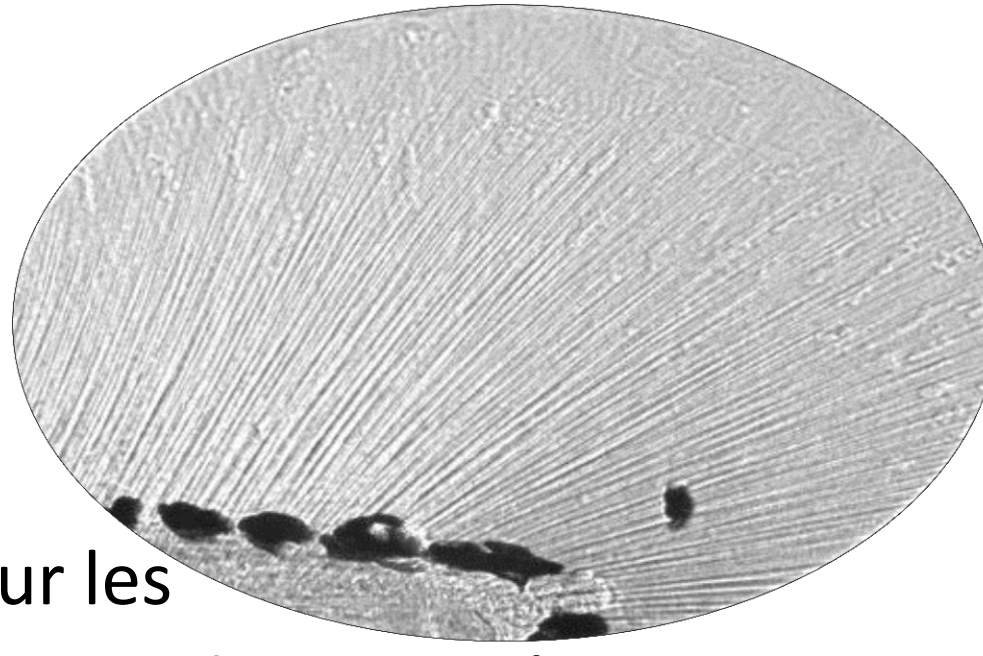
Superviseurs: Dr. Marie-Andrée Akimenko ,
Robert Lalonde (candidat PhD)

Departement de Biologie, Université d'Ottawa

Contexte

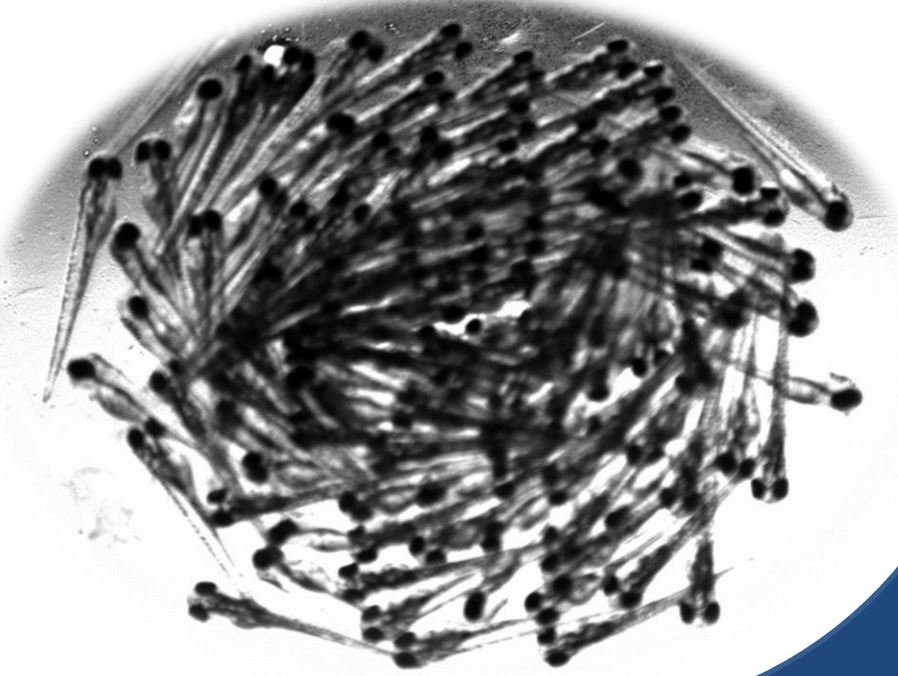
Le passage des êtres vivants du milieu aquatique au milieu terrestre suscite l'attention des chercheurs depuis longtemps. En fait, le mécanisme de transition des nageoires en membres apparents reste incertain. Il est prétendu que la perte de la famille de gènes actinodine a mené à l'apparition des premiers tétrapodes.

L'actinodine est une protéine structurale qui forme les actinotriches chez les poissons cartilagineux et les embryons des poissons osseux.



L'injection du transgène rapporteur pour les cellules mésenchymateuses (2PΔEPI) et du transgène rapporteur pour les cellules épithéliales (1,35-1,2+β.G) dans *Danio rerio* permettent une meilleure compréhension de l'actinodine. Les transgènes 2PΔEPI et 1,35-1,2+β.G ont été couplés respectivement aux gènes rapporteurs mCherry et GFP et mis sous le promoteur d'actinodine. En réalité, mCherry et GFP sont des protéines qui deviennent fluorescentes sous des longueurs d'onde spécifiques, permettant ainsi de suivre les cellules qui les expriment par microscopie ultra-violette.

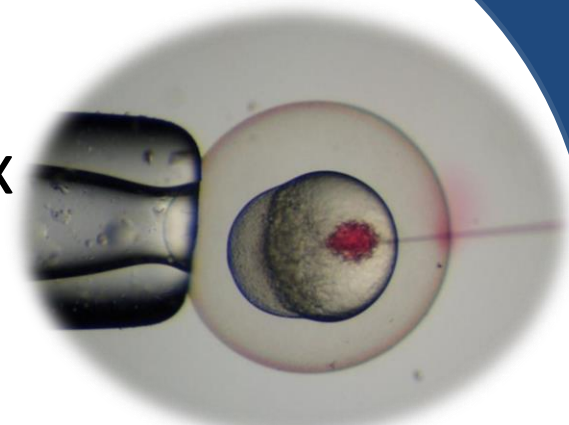
Sachant que les transgènes s'insèrent aléatoirement dans le génome des poissons, un criblage est indispensable pour trouver des lignées transgéniques pures. Le criblage est effectué sur des embryons de deux ou trois jours quand l'expression des cellules épithéliales et mésenchymateuses a déjà commencée dans les nageoires.



Méthodes

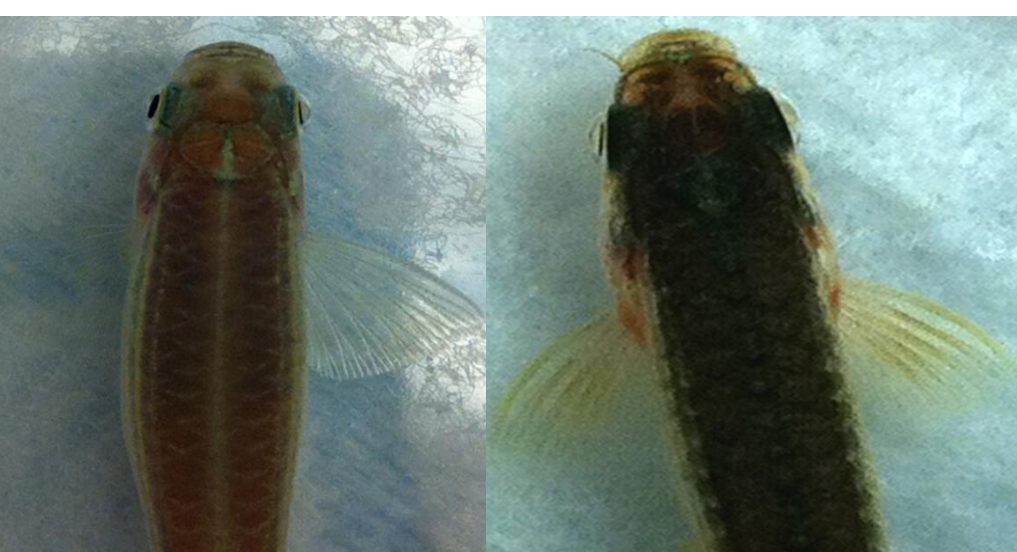
-Injections des transgènes au stade unicellulaire [1].

-Élevage des poissons transgénique qui survivent aux injections.



-Croisement des poissons transgéniques avec des sauvages.

-Reconnaître les mâles et les femelles avec les tubercules nuptiaux. [2]



-Inclination des cages de croisements

-Poissons de tailles égales.

-Changement d'eau quotidien et nourriture.

-Récouter les embryons avec une passoire et utiliser un medium embryonnaire.



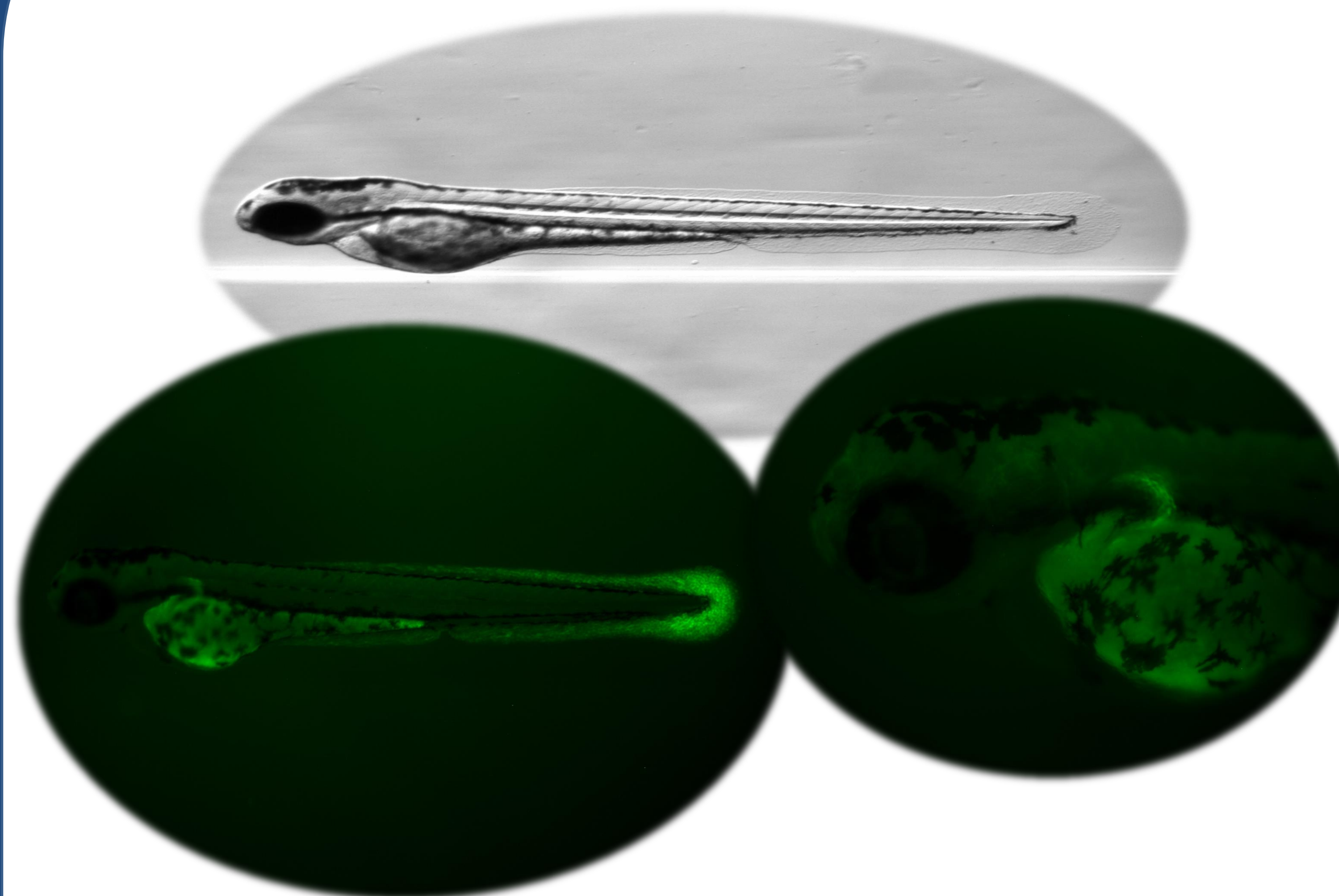
-Déchorioner les embryons à 24H.

-Cribler les embryons à 48H.

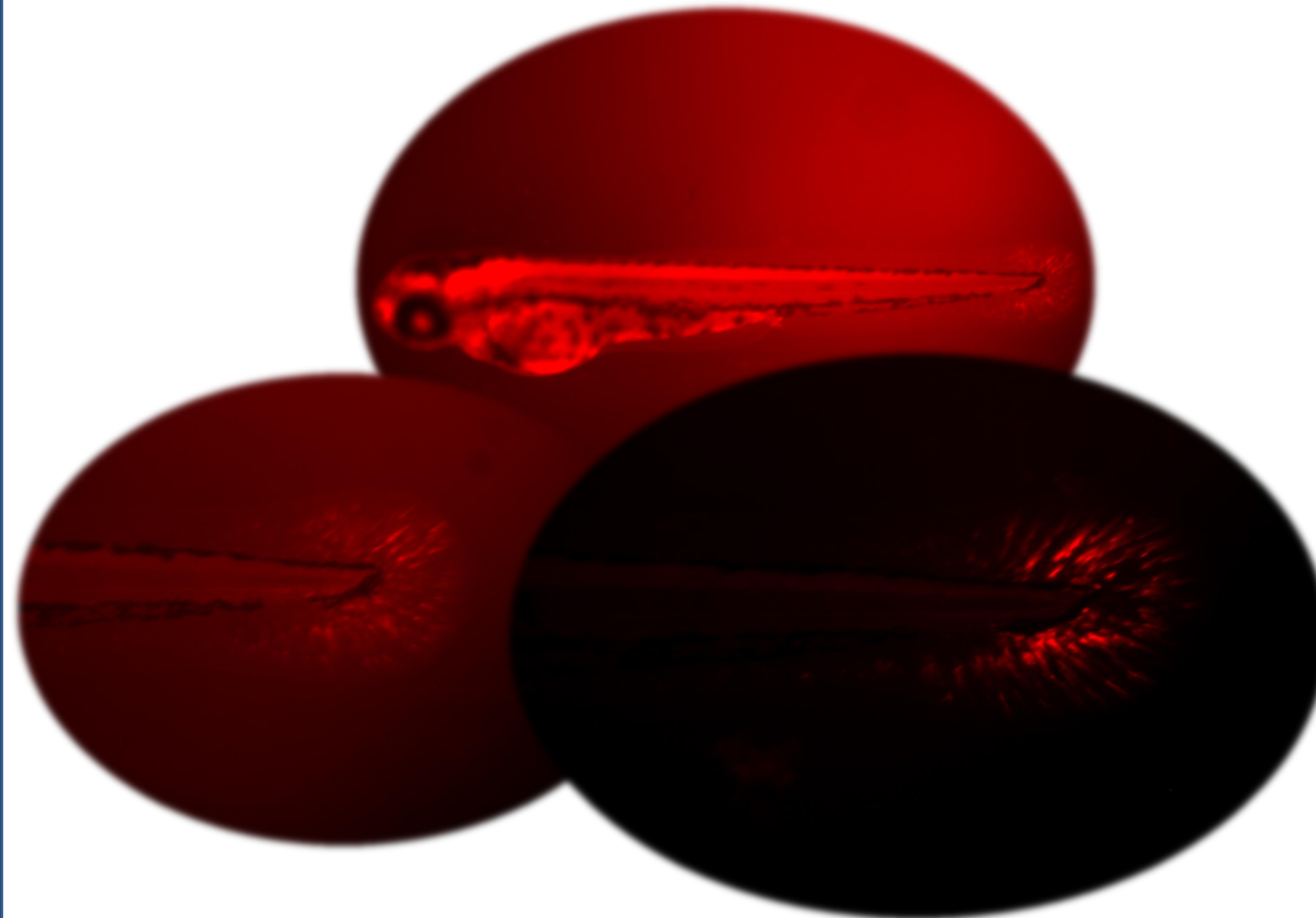
-Utiliser un microscope ultra-violet équipé avec les bonnes longueurs d'ondes.

Résultats

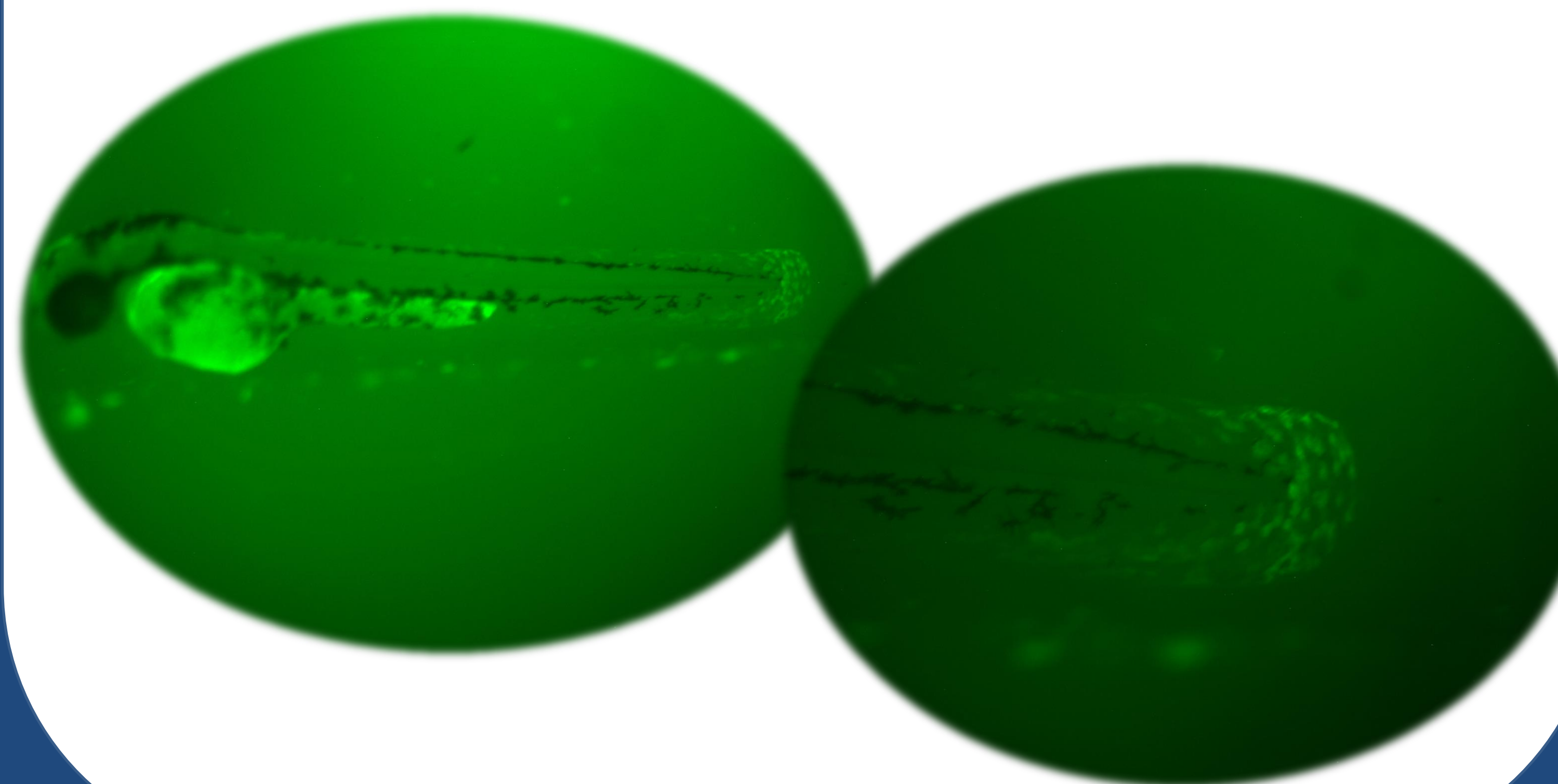
Lignée transgénique 2Pand1eGFP dont l'expression est parfaite dans les nageoires pectorales et caudales. Ce résultat n'est pas précis, car les cellules épithéliales et mésenchymateuses peuvent se superposer.



Expression complète du transgène 2PΔEPI dans les nageoires caudales.



L'expression du transgène 1,35-1,2+β.G est presque parfaite dans les nageoires caudales.



Conclusion

-Le criblage a donné de bonnes lignées transgéniques.

-Il faut couper les nageoires pectorales pour pouvoir regarder si l'expression du transgène 2PΔEPI est complète.

-Continuer à cribler la lignée 1,35-1,2+β.G pour obtenir une meilleure expression dans les nageoires caudales. Aussi, fixer les embryons pour regarder de plus près l'expression dans les nageoires pectorales.

-Élever les embryons transgéniques qui ont de bonnes expressions.

-Faire des croisements entre les lignées transgénique 2PΔEPI et 1,35-1,2+β.G afin d'obtenir une lignée transgénique double.

-Avoir une lignée transgénique double 2PΔEPI et 1,35-1,2+β.G est important pour analyser si l'actinodine est exprimée dans les cellules épithéliales ou mésenchymateuses en premier.

Références

[1] Joan Heath, 2013. Animals in research: zebrafish. The conversation, science + technology.

[2] McMillan Stephanie. C., Géraudie Jacqueline, and Akimenko Marie-Andrée. Zebrafish. February 2015, 12(1): 121-123. doi:10.1089/zeb.2014.1060.

Remerciements

Je désire à remercier Dr. Marie-Andrée Akimenko qui était toujours présente pour moi. Mes remerciements les plus chaleureux à Robert Lalonde qui m'a aidé tout le long de mon projet de recherche. Je remercie aussi l'équipe du PIRPC qui a créé ce merveilleux programme d'initiation à la recherche au premier cycle. Aussi, je remercie toute l'équipe du laboratoire Akimenko qui est très dynamique et chaleureuse, ainsi que les techniciens.