



COMPTE RENDU TRAVAUX PRATIQUES

UED611

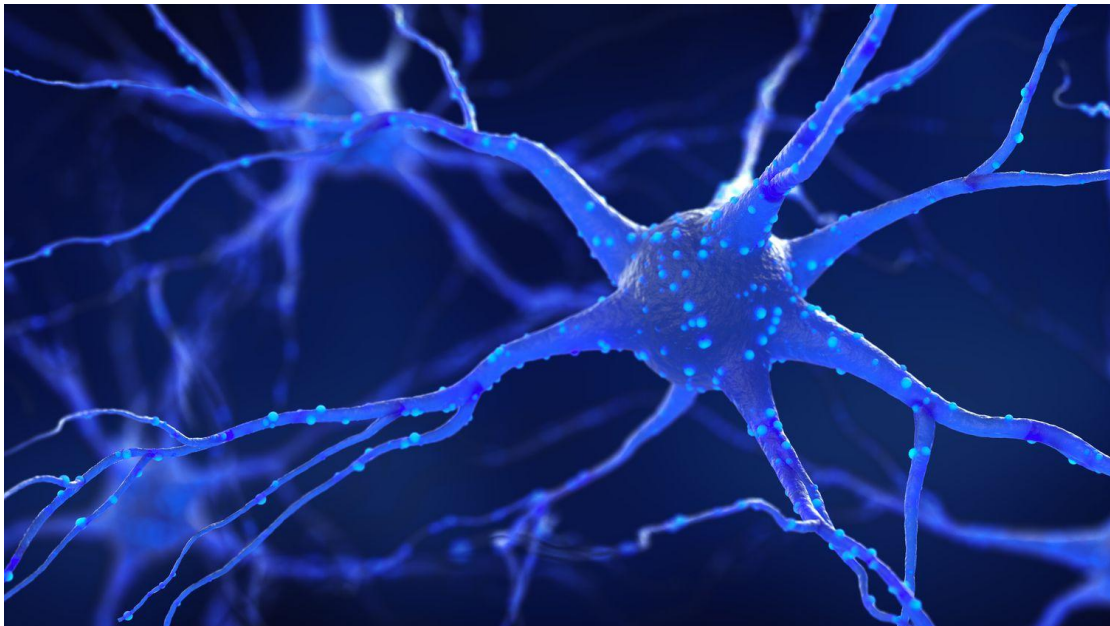
*REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES*

L3S6

2024/2025

**GROUPE : LDD**

*FERNANDES TELES Hugo / MOHAMMED KHOKAN Akshey*



# Analyse de l'Expression des Gènes précoces et tardifs lors de la différenciation neuronale des cellules NS-1.

Akshey MOHAMMED KHOKAN<sup>1</sup>, Hugo FERNANDES TELES<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Etudiants en Licence Double-Diplôme : Biologie et Informatique

## Résumé

Ce travail pratique a pour objectif d'étudier la régulation de l'expression génique lors de la différenciation neuronale en utilisant les cellules NS-1, une lignée dérivée des cellules PC12, reconnue pour sa sensibilité au Nerve Growth Factor (NGF). La stimulation au NGF active plusieurs voies de signalisation intracellulaires (MAPK, PI3K, PLC), entraînant des changements morphologiques caractéristiques (extension des neurites) et l'induction de gènes précoces impliqués dans la neurogenèse. Nous avons analysé l'expression de *Egr1*, *Atf3* et *c-fos* à différents temps après stimulation, en combinant des observations microscopiques, des techniques de biologie moléculaire (extraction d'ARN, RT-PCR), et une analyse bio-informatique préalable des séquences cibles. Ce TP illustre concrètement les mécanismes d'activation génique précoce lors de la différenciation neuronale et valide l'utilisation des cellules NS-1 comme modèle pertinent pour ces études.

## Introduction

La différenciation neuronale est un processus biologique important qui permet à des cellules non spécialisées de devenir des neurones. Ce processus est contrôlé par des signaux extérieurs à la cellule, comme le NGF, un facteur de croissance qui agit en se fixant à son récepteur spécifique (TrkA). Cette fixation déclenche plusieurs voies de signalisation dans la cellule (comme les voies MAPK, PI3K et PLC), qui vont activer l'expression de certains gènes dès les premières minutes. Ces gènes, appelés gènes précoces, jouent un rôle clé dans le déclenchement de la différenciation.

Dans ce travail pratique, nous avons utilisé les cellules NS-1, une lignée dérivée des cellules PC12, connues pour leur sensibilité au NGF. En

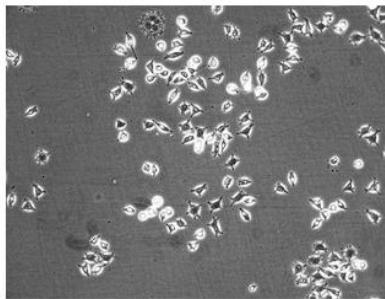
présence de NGF, ces cellules s'arrêtent de se diviser et commencent à changer de forme en développant des prolongements (appelés neurites), ce qui est un signe de différenciation neuronale.

L'objectif de notre TP était d'étudier l'expression de trois gènes précoces (*Egr1*, *Atf3*, *c-fos*) à différents temps après stimulation au NGF, et de comparer cette expression avec les changements morphologiques observés. Pour cela, nous avons utilisé différentes techniques : culture cellulaire, extraction d'ARN, reverse transcription, PCR et observation des cellules au microscope.

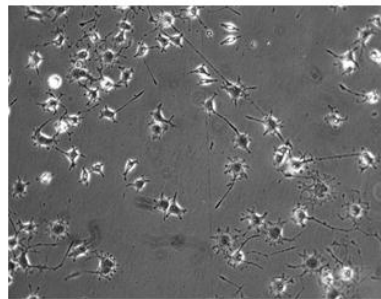
## Résultats

### Comptage de cellules différenciées

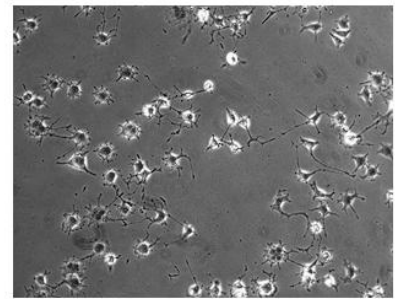
Lors de ce travail pratique, nous avons compté les cellules différenciées en fonction de la quantité de NGF inclus dans le milieu. Ces cellules ont été observées au microscope en contraste de phase après trois jours de traitement avec différentes concentrations de NGF dans le milieu (0, 20 et 100 ng/mL). Les cellules différenciées présentent une extension de neurite faisant le double de la taille de leur corps. La figure 1 présente des images avec les différentes conditions avec un grossissement x20. La figure 2, quant à elle, permet de visualiser le nombre de cellules différenciées en moyenne en fonction de la concentration de NGF dans le milieu.



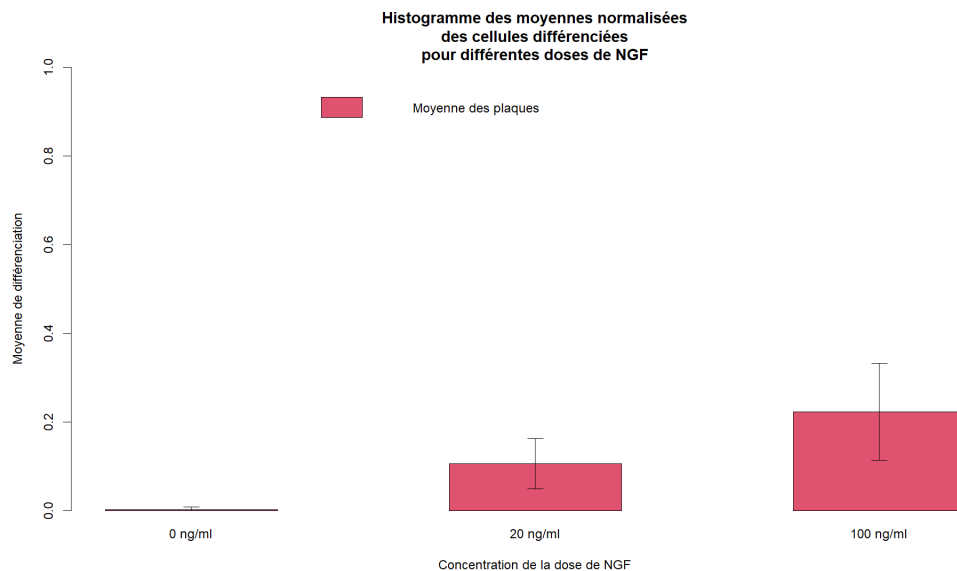
*Figure 1A : Plaque 3 de cellule NS-1 dans un milieu avec 0 ng/ml de NGF*



*Figure 1B : Plaque 3 de cellule NS-1 dans un milieu avec 20 ng/ml de NGF*



*Figure 1C : Plaque 3 de cellule NS-1 dans un milieu avec 100 ng/ml de NGF*



*Figure 2 : Histogramme des moyennes normalisées des cellules différenciées pour différentes doses de NGF dans le milieu (généré par un script R)*

## Analyse Bio-Informatique

Avant de réaliser la RT-PCR pour étudier la régulation transcriptionnelle de NF-1, nous avons utilisé Benchling pour savoir la taille des produits PCR attendus, et dans quel exon se trouve l'amorce. La figure 3 résume l'analyse obtenue via Benchling.

Gène	Forward	Reverse	Taille attendue (BP)
c-fos	5'tctcctgaagaggaagagaaacg 3' Exon 3 571	5'tctgcaacgcagacttctc 3' Exon 4 674	145
Atf3	5'ggctgacaacatccctccta 3' Exon 4 1093	5'tagcacaacaccaggctcag 3' Exon 4 1204	150
Erg1	5'aggctttagagcacgatgaggaag 3' Exon 2 26465758	5'actcagtaggtaaccgcagcattc 3' Exon 2 26465880	169
Hprt1	5'ccttggccaagcagctacagc 3' Exon 6 132736590	5'ccaacaaagtctggcctgtatc 3' Exon 7-8 132736646	97

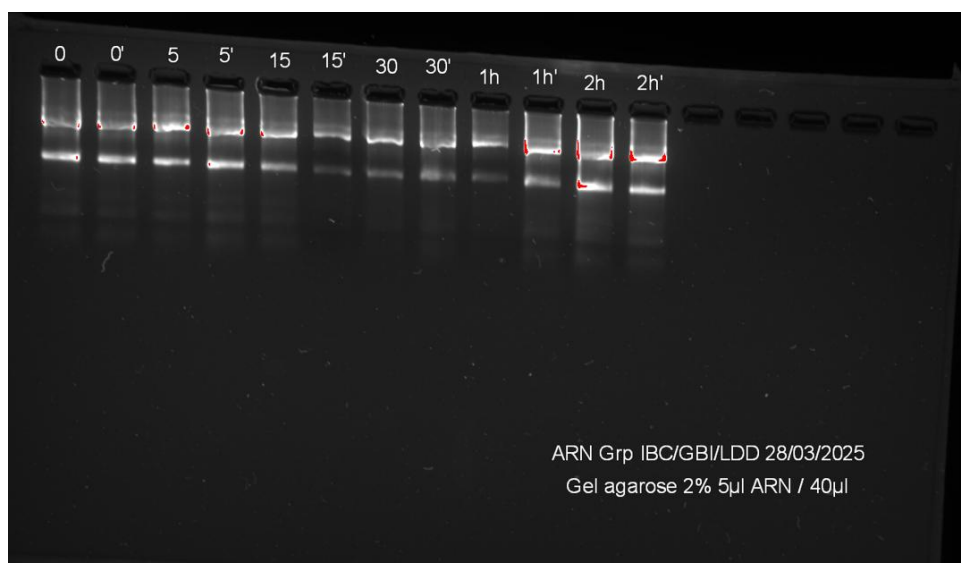
*Figure 3 : Tableau récapitulatif de l'analyse obtenue via Benchling*  
Les positions exactes sont données en orange.

## Contrôle qualité des ARNs

Avant de passer à la RT-PCR, il a fallu extraire les ARN des cellules NS-1, nécessaires pour cette technique. Pour évaluer la qualité de l'extraction, une électrophorèse a été effectuée, comme illustré dans la figure 4.

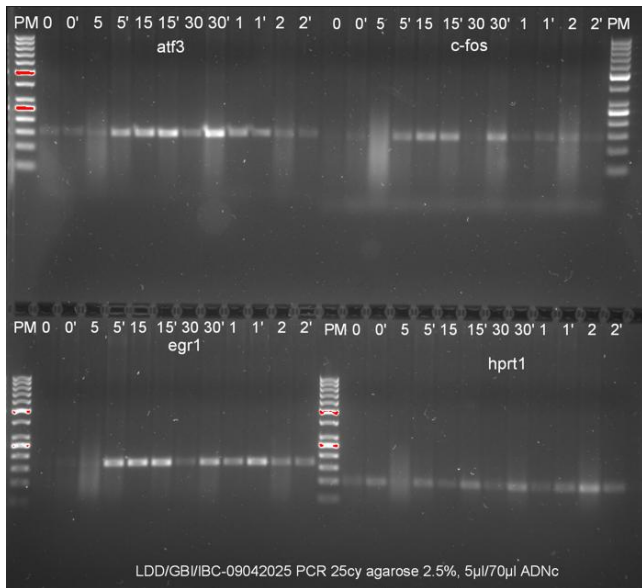
*Figure 4 : Etude de la qualité de ARN extrait*

Les puits 1- 12 représentent respectivement 0, 5, 15, 30, 60, 120 min d'incubation des cellules avec du NGF dans le milieu. Nous avons répliqué l'expérience pour chaque temps d'incubation. En effet, le temps d'incubation à 0 minute sert de contrôle. Nous pouvons voir que chaque puits contient plusieurs bandes et aucun smear.



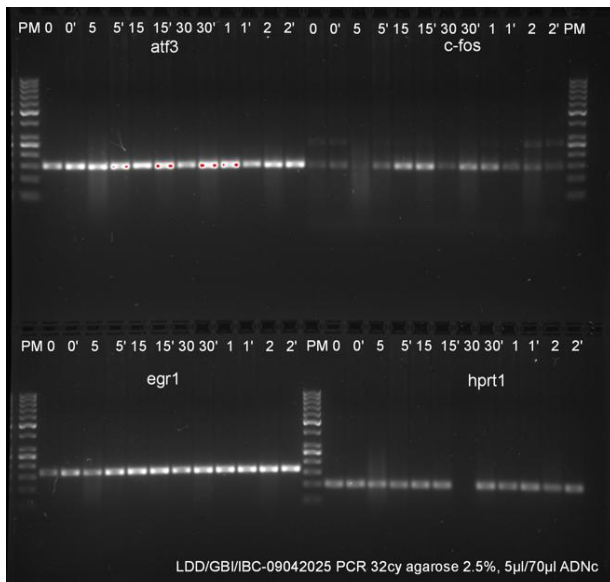
## Reverse-Transcriptase PCR

Nous avons alors réalisé deux RT-PCR, la première pendant 25 cycles et la seconde pendant 32 cycles sur chaque gène étudié, afin d'étudier la régulation transcriptionnelle de NF-1. Les gènes étudiés sont ATF3, C-FOS, EGR1, et HPRT1 (gène de contrôle).



**Figure 5A :** Electrophorèse de RT-PCR à 25 cycles

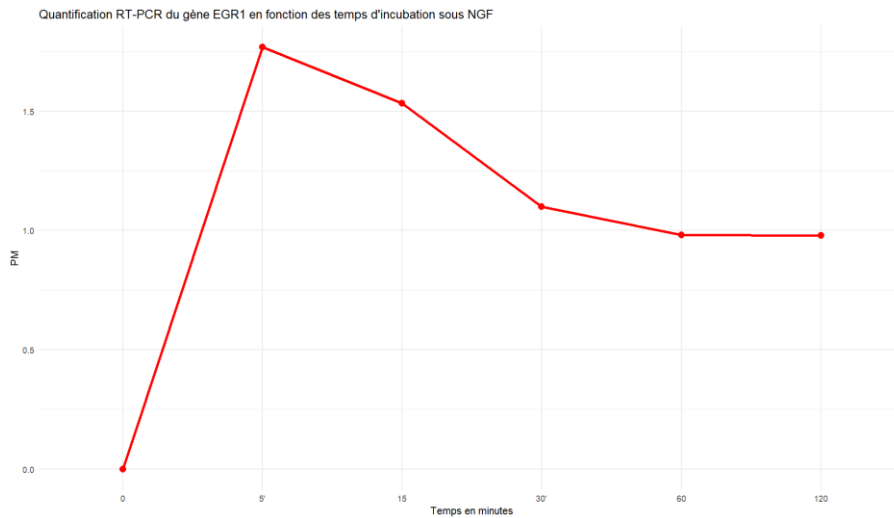
La taille attendue des produits amplifiés pour chaque gène est bien observée. Nous avons alors dressé des graphiques de cinétique des produits de RT- PCR pour chaque gène en fonction du temps d'incubation pour pouvoir les comparer. Le gène HPRT1 a été utilisé pour normaliser les résultats. Cependant, afin de gagner en précision sur les cinétiques, nous avons privilégié le profil (réplicat, non répliat) présentant des bandes plus visibles pour chaque temps d'incubation, cela est résumé dans la figure 5C.



**Figure 5B :** Electrophorèse de RT-PCR à 32 cycles

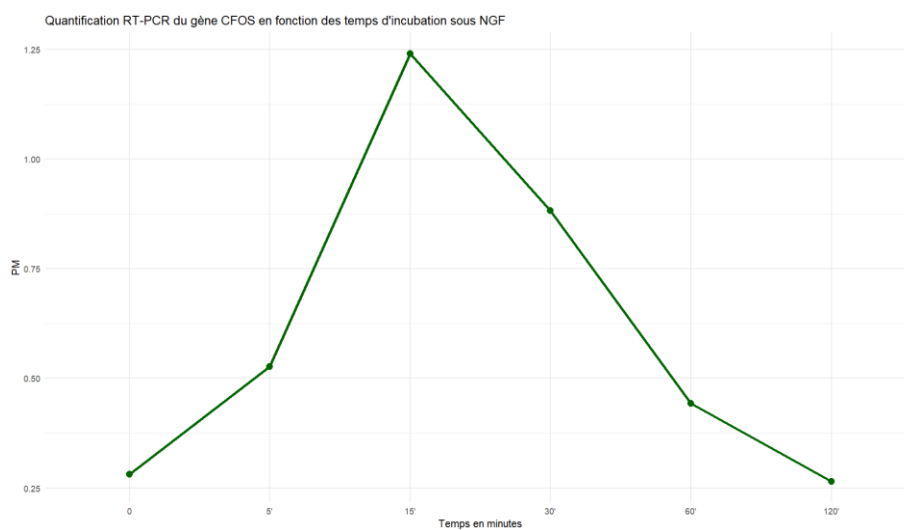
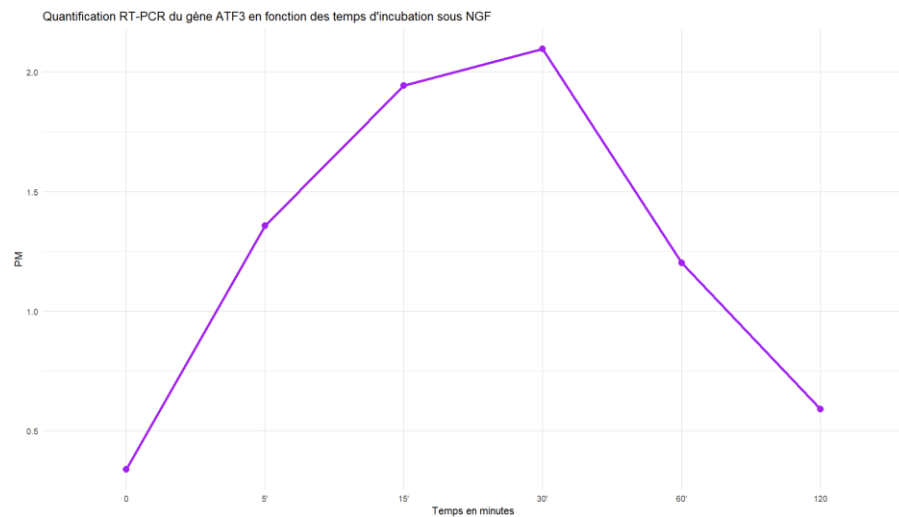
Temps	ATF3_PM	EGR1_PM	CFOS_PM
0	0.3397797	0.0000000	0.2815201
0'	NA	NA	NA
5	NA	NA	NA
5'	1.3576719	1.7685178	0.5270308
15	NA	1.5328212	NA
15'	1.9436866	NA	1.2404551
30'	2.0969075	1.0992131	0.8829722
60	NA	0.9810946	NA
60'	1.2014101	NA	0.4422018
120	0.5896147	0.9784994	NA
120'	NA	NA	0.2652898

**Figure 5C :** Poids moléculaire de chaque produit amplifié de nos gènes d'intérêts (tableau généré par un script R)



**Figure 6A:**  
Graphique représentant la cinétique de produit de RT-PCR du gène EGR1 en fonction des temps d'incubation avec le NGF.

**Figure 6B:** Graphique représentant la cinétique de produit de RT-PCR du gène ATF3 en fonction des temps d'incubation avec le NGF.



**Figure 6C:** Graphique représentant la cinétique de produit de RT-PCR du gène C-FOS en fonction des temps d'incubation avec le NGF.



## Discussion et Conclusion

Nos résultats confirment que la stimulation des cellules NS-1 par le NGF induit une différenciation neuronale, observable à la fois morphologiquement par l'extension des neurites et au niveau moléculaire par l'activation transcriptionnelle de gènes précoces comme *Egr1*, *Atf3* et *c-fos*.

Le comptage cellulaire montre une corrélation claire entre la concentration de NGF et le nombre de cellules différenciées, bien qu'à 0 minute d'incubation, nous devrions observer aucune cellule différenciée. Malgré ce défaut d'observation, cela reste cohérent avec les observations faites sur les lignées PC12 parentales dans les études de *Greene et Tischler* (1976), où une dose de 50-100 ng/mL de NGF est suffisante pour induire la différenciation de la majorité des cellules.

Au niveau transcriptionnel, nos données de RT-PCR montrent que les gènes *Atf3* (atteignant un pic d'expression dès 5 minutes), *Egr1* (atteignant un pic d'expression dès 30 minutes) et *c-fos* (atteignant un pic d'expression dès 15 minutes) répondent rapidement à la stimulation par le NGF, ce qui correspond à leur classification comme gènes précoces. Ces résultats sont en accord avec les travaux de *Thompson et al.* (2005), qui ont montré que *c-fos* et *Egr1* sont des gènes clés pour la transmission du signal de la différenciation neuronale.

Il est également intéressant de noter que la qualité des ARN extraits, sans dégradation (absence de smear), garantit la fiabilité de nos résultats PCR. L'utilisation du gène *HPRT1*

comme témoin pour normaliser les variations d'amplification suit les meilleures pratiques recommandées pour les études d'expression génique (*Bustin et al.*, 2009). En conclusion, ce travail pratique illustre efficacement les étapes clés de la régulation de l'expression des gènes précoces lors de la différenciation neuronale. Il valide le modèle des cellules NS-1 comme un moyen pertinent pour les étudier. Des tests supplémentaires, notamment en qPCR pour quantifier plus efficacement l'expression des gènes, ou en inhibant spécifiquement les voies MAPK, PI3K ou PLC, permettraient de mieux distinguer le rôle de chacune de ces voies dans l'activation des gènes observée.

## Références

*Greene, L. A., & Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. Proceedings of the National Academy of Sciences, 73(7), 2424–2428.*

*Thompson, M. A., et al. (2005). Immediate Early Genes in the Nervous System. The Neuroscientist, 11(2), 133–147.*

*Bustin, S. A., et al. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical Chemistry, 55(4), 611–622.*

*Quelques conseils pour la rédaction d'un rapport scientifique. Gaëlle Lelandais et Pierre Poulain.*  
<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.0/fr/>

*Les scripts derrière les figures 2, 5C, et 6.*  
<https://github.com/crakshay1/2025-NGF/>