

Euphrasie SERVANT  
euphrasie.servant@etu.upmc.fr  
étudiante à l'Université Pierre Et Marie Curie

# **Rapport de stage**

Stage effectué du 6/06/16 - 1/07/16  
à l'INSTITUT DE BIOLOGIE DE L'ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE

Professeur référent : Thanh Thuy NGUYEN TU

Etudiante à l'UPMC en biologie, j'ai effectué, entre ma 1<sup>ere</sup> et ma 2<sup>ème</sup> année, un stage d'observation à l'Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure (IBENS). Du 6 juin au 1er juillet 2016, j'ai ainsi suivi quatre groupes de chercheurs, chacun pendant une semaine.

Ce stage m'a donné l'occasion de découvrir les sujets de recherche sur lesquels travaillent ces quatre équipes.

Toutes quatre travaillent sur des sujets touchant les neurosciences : mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le biologie des cellules souches neurales (team Nathalie Spassky), division cellulaire et neurogénèse (team Xavier Morin), récepteurs du glutamate et synapses excitatrices (team Pierre Paoletti), neuroéthologie du poisson-zèbre (team Germán Sumbre). C'est donc à l'étude de "l'objet le plus complexe (et le plus fascinant) que l'on connaisse dans l'univers", le cerveau, que ces équipes contribuent. C'était une grande chance de pouvoir les côtoyer et les observer dans leur travail sur ce sujet passionnant.

Ce stage m'a permis d'en apprendre plus sur le fonctionnement d'un laboratoire de recherche, et sur les techniques de biologie cellulaire et moléculaire qui y sont utilisées.

J'expose dans ce rapport ce que j'ai vu et appris pendant la durée de ce stage.

## Organisation de ce rapport

J'ai donc suivi quatre équipes pendant une semaine chacune. J'ai donc naturellement organisé ce rapport en quatre parties : une par équipe.

J'ai d'abord suivi l'équipe de Nathalie Spassky. Marion Faucourt, ingénieur de recherche, m'a guidée pour cette découverte.

La deuxième semaine c'est l'équipe de Xavier Morin qui m'a accueillie.

Au cours de la semaine suivante, Pierre Paoletti m'a reçu dans son équipe, où Lætitia Mony s'est occupée de moi.

Enfin, l'équipe de Germán Sumbre m'a reçue, où Adrien Jouary et Véronique Candat m'ont prise en main.

Pour chaque équipe je présente rapidement leur thème de travail. Puis je parle du modèle utilisé, et du travail expérimental auquel j'ai assisté et parfois participé.

Un aspect particulièrement intéressant pour moi était de voir l'utilisation "au jour le jour" des techniques de biologie cellulaire et moléculaire dans le cadre des recherches menées : PCR, électrophorèse, clonage, électroporation,... etc. Il y en a beaucoup, sans

compter le désormais fameux “CRISPR-Cas9” (dont Xavier Morin m'a expliqué le principe).

Je dois reconnaître que tout n'a pas été toujours facile à suivre, en dépit de la bienveillance des gens à mon égard : mais je n'avais comme bagage que celui d'un élève en fin de L1 ! Un défi que j'ai essayé de relever a été de comprendre le pourquoi et le comment de l'utilisation de ces techniques. C'est pourquoi on trouvera au sein de la description du travail avec telle ou telle équipe, des paragraphes qui tentent d'éclairer ces aspects : par exemple, la question de l'obtention de “souris homozygotes KO” (c'est à dire avec un gène particulier “knock-out”) dans la partie consacrée à la semaine passée avec l'équipe Nathalie Spassky. Ou l'intégration d'un gène étranger dans les cellules du tube neural d'un embryon de poulet dans la partie au sujet de l'équipe Xavier Morin. Je l'ai dit, ça n'a pas toujours été facile, il y a probablement des choses à côté desquelles je suis passée, mais arriver à comprendre la logique complète de telle ou telle technique a été très satisfaisant.

Par ailleurs, des séminaires sont organisés à l'IBENS, où des chercheurs, généralement de l'extérieur, viennent présenter leurs travaux. Je liste les interventions auxquelles j'ai assistées.

## Remerciements

Je veux remercier ces équipes et tous leurs membres pour la disponibilité et la bienveillance dont ils ont fait preuve, et pour la richesse des explications qu'ils m'ont données.

Je tiens aussi à exprimer ma gratitude à Mme Danièle Murciano, directrice des affaires scientifiques de l'IBENS, qui m'a permis de suivre ce stage dans ce cadre prestigieux.

# Semaine 1 - Team Nathalie Spassky

L'équipe de Nathalie Spassky étudie les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sous-tendent la biologie des cellules souches neurales (CSN). Ces cellules souches ont leur potentiel de différenciation limité aux cellules neurales (neurones et cellules gliales). Leur découverte a été une révolution dans la mesure où l'on a longtemps pensé que le cerveau adulte ne pouvait renouveler ses neurones. Elle permet d'espérer une utilisation en thérapie cellulaire pour le traitement des maladies neuro-dégénératives.

L'équipe de Nathalie Spassky travaille en particulier sur le rôle du cil primaire au cours de la neuro-génèse.

Présentation sur le site de l'IBENS : <http://www.ibens.ens.fr/spip.php?rubrique6>

---

## Rôles des cils dans le développement et la pathologie du cerveau

Les cils sont une extension cytoplasmique de la cellule. Les cils peuvent avoir deux rôles : un rôle mécanique, ou un rôle sensoriel.

Ils peuvent contribuer au mouvement de la cellule, à faire circuler un fluide ou encore à agiter le milieu extérieur. Les cils permettent aussi de capter des signaux extérieurs pour réguler l'environnement de la cellule.

Dans son travail pour comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui régissent les cellules souches neurales, Nathalie Spassky et son équipe s'intéressent particulièrement aux rôles des cils des cellules épendymaires situées dans la partie ventriculaire du cerveau. Les cellules épendymaires sont un type de cellules gliales (c'est à dire qui forment l'environnement des neurones) du système nerveux central. Elles assurent l'interface entre le système nerveux et le liquide céphalo-rachidien. Leurs cils mobiles permettent la circulation de ce dernier. Ils sont indispensables au développement du cerveau et à la différenciation des cellules neurales.

Une malformation des cils entraîne des pathologies appelées ciliopathologies, qui peuvent être par exemple à l'origine d'une hydrocéphalie : le liquide céphalo-rachidien n'étant pas correctement drainé, il s'accumule dans le cerveau.

---

## Modèle

Le modèle utilisé par Nathalie Spassky et son équipe est celui de la souris. Pour observer l'effet de l'absence de cils au cours de la neurogenèse, ils utilisent des souris génétiquement modifiées ne produisant pas de cils (plus précisément, dont les cellules épendymaires sont dépourvues de cils), c'est à dire des souris dites knock-out (KO) pour un gène indispensable du développement des cils.

### **Obtention des souris homozygotes KO**

Une difficulté tient au fait que la mutation à l'état homozygote est létale. Il n'est donc pas possible d'obtenir des lignées de « souris sans cil » (parce qu'une telle souris ne peut pas atteindre l'âge de se reproduire).

Pour contourner ce problème et obtenir les souris KO désirées, on utilise la méthode Cre-Lox (« Cre-Lox recombination »), qui permet de procéder à des suppressions (ou insertions, translocations et inversions) à des endroits spécifiques dans l'ADN. Une paire de séquences Lox marque un site de reconnaissance de l'enzyme de restriction « Cre recombinase » : en présence de l'enzyme, la partie située entre deux séquences lox est supprimée (si les deux séquences lox sont dans le même sens). Le principe est donc d'encadrer le gène d'intérêt par deux séquences lox. Si, par ailleurs, l'ADN de la souris en question produit l'enzyme Cre, la recombinaison a lieu et on élimine ainsi le gène encadré par les lox.

Les lox sont issus d'un bactériophage : c'est une séquence qu'on ne rencontre pas chez les eucaryotes. La méthode ne risque donc pas d'endommager l'ADN de nos souris.

Un point important pour notre problématique est le fait que l'enzyme Cre est sous le contrôle d'un promoteur spécifique à un tissu : son expression est ainsi limitée au tissu qui nous intéresse (les cellules épendymaires)

À approfondir : comment fait-on pour cibler le gène d'intérêt (comment fait-on pour l'encadrer par les lox ?). La technique repose sur la recombinaison homologue.

À approfondir : Obtenir des lignées de souris transgéniques : modification de l'ADN de cellules souches, insertion de ces cellules dans un blastocyte pour obtenir une chimère, etc.

Pour obtenir des souris « sans cils » (homozygotes KO), on fait se reproduire une femelle lox/lox avec une souris KO/+ cre, c'est à dire une souris qui est à la fois capable de produire l'enzyme Cre et hétérozygote KO/+ (« + » désignant le gène « sauvage », c'est à dire non modifié). Ainsi, à l'issu de cet accouplement on pourra obtenir : des souris lox/+ et des souris lox/KO. Les souris lox/KO produisant la Cre deviendront les souris KO/KO que nous souhaitons obtenir.

En théorie, seules 25% des souris n'auront pas de cils. // QUESTION : POURQUOI ? (Selon moi on devrait obtenir 50% de souris KO/KO).

C'est l'animalerie de l'IBENS qui fournit les souris aux équipes après commande. Une fois que les souris issues de la portée commandée sont disponibles, il s'agit de voir lesquelles ont le génotype d'intérêt. On réalise alors une réaction en chaîne de l'ADN par polymérase (PCR), afin de permettre son séquençage pour connaître le génotype de la souris pour les gènes étudiés.

---

## Travail expérimental

Voici les travaux expérimentaux auxquels j'ai pris part.

## **PCR**

Une réaction en chaîne de l'ADN par polymérase (PCR) permet l'amplification rapide d'une séquence d'ADN ou d'ARN ("séquence cible", ou "target") à partir d'une faible quantité de la séquence en question. Un cycle de PCR se déroule en trois étapes, avec des transitions de températures :

- La première étape est celle de la dénaturation de l'ADN qui permet de séparer les deux brins complémentaires (95°C).
- La deuxième étape vise à hybrider des amorces spécifiques à la séquence d'ADN que l'on veut amplifier, qui vont initier la troisième étape qui est celle de l'elongation.(entre 40° et 50°C).
- L'elongation est l'étape durant laquelle les nucléotides complémentaires sont appariés aux brins dénaturés pendant la première étape (venant ainsi compléter la chaîne initiée par l'amorce). Cela est réalisé à 72°C, en présence de Taq polymérase. La Taq polymérase est une ADN polymérase thermophile. Cette enzyme permet l'appariement des nucléotides aux brins matrices de l'ADN.

Ainsi, à chaque cycle, on double la quantité de la séquence cible, et au bout de n cycles, on obtient donc  $2^n$  copies. Sachant qu'un cycle dure quelques minutes, on obtient donc très vite un nombre important de copies.

Pour amplifier une séquence d'ADN, il faudra donc l'ADN de l'échantillon, un couple d'amorce spécifique à la séquence d'intérêt, du dNTP (les desoxyribonucléotides qui sont l'élément de synthèse de l'ADN complémentaire), et de la Taq polymérase.

## **Électrophorèse**

On réalise une électrophorèse sur gel d'agarose avec le produit de la PCR, c'est à dire que l'on va faire migrer l'ADN dans un gel d'agarose sous la contrainte d'un courant électrique. L'ADN étant chargé négativement, va migrer vers le pôle positif du courant, plus ou moins vite selon son poids moléculaire.

À la fin de la migration, on photographie le gel à la lumière UV qui va permettre la révélation de l'ADN grâce à la présence de Bromure d'éthidium (BET). Le BET est un intercalant de l'ADN qui devient fluorescent lorsqu'il est exposé à la lumière UV. Cette dernière étape se passe dans une pièce spéciale, pour limiter les contacts avec le BET qui est un produit dangereux puisqu'il s'insère dans l'ADN.

## **Dissection**

Pour observer les cellules épendymaires, les chercheurs doivent disséquer le cerveau afin de récupérer les ventricules latéraux cérébraux où les cellules épendymaires sont présentes. Les ventricules sont des cavités dans le cerveau où le liquide céphalo-rachidien circule. Il y en a quatre : les ventricules latéraux (droit et gauche) et le troisième et le quatrième ventricule.

Les cellules des ventricules sont ensuite mises en culture afin d'analyser leur développement.

### **Mise en culture de cellules**

La culture de cellules permet d'observer et d'analyser le métabolisme de cellules *in vitro* dans un milieu artificiel. On peut par exemple étudier les mécanismes de différenciation cellulaire en mettant des cellules souches en culture.

La préparation des milieux de culture se fait sous une hotte afin de limiter les contaminations du milieu. Le milieu se compose d'une couche de poly-L-lysine au fond du support qui fixe les cellules au support par interactions ioniques. Voir annexe pour le protocole.

# Semaine 2 - Team Xavier Morin

L'équipe de Xavier Morin s'intéresse aux mécanismes contrôlant la division cellulaire des cellules neurales.

<http://www.ibens.ens.fr/?rubrique13>

---

## Division cellulaire et neurogénèse

Les cellules nerveuses des vertébrés proviennent de la division des CSN (cellules souches neurales) constituant le neuroépithélium.

Ces cellules souches, qui sont aussi appelées cellules progéniteurs, peuvent se diviser de deux manières différentes : symétriques ou asymétriques. Elles donnent ainsi naissance soit à deux cellules progéniteurs (modèle symétrique, mitose), soit à une cellule progéniteur et un neurone (modèle asymétrique).

Il est important d'essayer de mieux comprendre les mécanismes qui conduisent à l'une ou l'autre de ces divisions : c'est ce à quoi travaille cette équipe.

Xavier Morin s'intéresse particulièrement à la régulation spatio-temporelle des divisions asymétriques.

Samuel Tozer explore l'influence qu'exerce la voie Notch dans la régulation de ces divisions. Dans le processus de différenciation des neurones en effet, la voie Notch joue un rôle important. Samuel Tozer a remarqué que la répartition de l'enzyme Mib1, qui est une molécule régulatrice de la voie Notch, influence la différenciation des cellules. Lorsque la répartition de Mib1 est asymétrique dans les deux cellules filles issues d'une mitose, on obtient autour de 40% de divisions symétriques et 60% de divisions asymétriques. Quand la répartition de Mib1 est symétrique on obtient alors 100% de division donnant deux cellules progéniteurs. La présence de Mib1 dans les deux cellules impliquerait-elle un double feedback entraînant la non différenciation des cellules ? C'est la question à laquelle Samuel Tozer essaye de répondre.

---

## Modèle

L'équipe de Xavier Morin utilise comme modèle l'embryon de poulet : des œufs fécondés. L'embryon de poulet a été le premier modèle utilisé pour étudier l'embryologie dans les années 1960. Ce modèle est pratique parce qu'il est économique, et parce que l'embryon est facile d'accès (après avoir fait un trou dans la coquille).

L'équipe cible le tube neural, là où les cellules neurales sont générées chez l'embryon (le tube neural est l'état embryonnaire du système nerveux des chordées).

---

## Travail expérimental

Pour mieux comprendre les mécanismes de la neurogénèse, Xavier Morin et son équipe font exprimer, dans les cellules du tube neural des embryons de poulets, de nouveaux gènes, et ils analysent l'impact des protéines produites sur l'embryon.

J'ai suivi les travaux de Chooyoung Baek, PhD student de l'équipe, qui menait une telle expérience. Cela m'a permis d'en suivre le déroulement, et d'appréhender les modalités pratiques. Ca a été pour moi l'occasion d'essayer de comprendre le pourquoi et le comment des différentes techniques utilisées. C'est ce que je tente de restituer ici, en décrivant l'intégralité du processus tel que mis en œuvre par Chooyoung.

Le but est donc d'intégrer un gène étranger dans les cellules du tube neural d'un embryon de poulet. Il faut donc d'abord construire la séquence que l'on veut intégrer, la produire en quantité, et l'introduire dans les cellules cibles.

Conceptuellement, le processus comprend 3 phases principales:

- 1) intégration du gène d'intérêt dans un plasmide (qui va servir de vecteur)
- 2) intégration de ce vecteur dans des bactéries, qui sont mises en culture pour obtenir le plasmide modifié en grande quantité
- 3) insertion du plasmide modifié dans les cellules du tube neural par électroporation

### **“Clonage” : construction du plasmide contenant le gène d'intérêt**

Un plasmide est une molécule d'ADN bactérien (généralement), non chromosomique, souvent circulaire, et capable de réPLICATION autonome. Les plasmides sont de petites structures, non essentielles à la survie de la bactérie, mais dont les quelques gènes peuvent lui être utiles, par exemple dans des circonstances particulières. Les plasmides sont fréquemment utilisés comme vecteur pour le clonage moléculaire, et c'est le cas dans notre expérience.

Le premier objectif est donc d'intégrer à un plasmide le gène d'intérêt.

Notons qu'il nous faut d'ores et déjà penser à ce qui va se passer à l'étape suivante. En effet, nous devrons être capable de sélectionner les bactéries pour lesquelles l'intégration du vecteur aura réussi. Ceci passe par l'utilisation d'un gène de résistance à un antibiotique : on fait en sorte que les bactéries ayant intégré le vecteur résistent à un antibiotique donné. En d'autres termes, il faut que le vecteur soit porteur de cette résistance. Dans le cas présent, le plasmide source choisi contient déjà un gène de résistance à l'ampicilline.

Comment se passe l'intégration du gène d'intérêt au plasmide ?

Le principe pour intégrer le gène d'intérêt au plasmide, repose sur :

- le fait de couper le plasmide à un endroit ciblé via une enzyme de restriction
- la mise à profit de la “recombinaison homologue”

La “recombinaison homologue” est un mécanisme naturel de recombinaison génétique dans lequel des séquences de nucléotides sont échangées entre des molécules d’ADN similaires (ce mécanisme universel permet de réparer des cassures d’ADN. Chez les eucaryotes, il intervient aussi lors de la méiose, contribuant à la diversité génétique. Il se produit aussi chez les bactéries et les virus lors d’un “transfert de gène horizontal”).

En bref, l’idée est de couper le plasmide à un endroit ciblé, puis de mettre en présence une séquence d’ADN dont les extrémités sont homologues à ce qui se trouve dans le plasmide au niveau de la coupure, et comportant en plus notre gène d’intérêt (de façon à ce qu’une fois la “couture” faite aux deux bouts, il se trouve inclus au milieu)

Pour couper le plasmide, on utilise une enzyme de restriction (“restriction endonuclease”, ECO RV dans notre cas). Une telle enzyme coupe une séquence d’ADN au niveau d’un “site de restriction” constitué d’une séquence particulière de nucléotides.

Il faut donc produire une séquence comportant le gène d’intérêt et (à ses extrémités 5’ et 3’) la séquence homologue à une partie des bouts du plasmide (une vingtaine de paires de bases).

Il s’agit donc de mettre bout à bout des morceaux d’ADN (gène d’intérêt, séquence homologue). La technique utilisée est le “clonage Gibson”.

Le laboratoire s’adresse pour cela à une entreprise extérieure spécialisée, à laquelle on commande les “primers” (on écrit la séquence voulue - gène d’intérêt plus séquence homologue dans ses extrémités 5’ et 3’ - et l’entreprise la fournit)

On dispose maintenant de la séquence à intégrer dans les plasmides - en petite quantité. On effectue donc une PCR pour l’amplifier.

Avant de réaliser l’intégration de la séquence d’intérêt au plasmide (préalablement découpé via l’enzyme de restriction), il convient de purifier l’un et l’autre : faire migrer la séquence d’intérêt (c’est à dire le produit de PCR) d’une part, et le plasmide coupé d’autre part, sur gel, couper les bandes, et purifier avec un kit (centrifugation puis bain de wash solution, centrifugation, puis bain, etc..).

(Dans le protocole tel que mis en œuvre par Chooyoung, où on a coupé le plasmide par enzyme de restriction, puis où on a purifié le plasmide sur gel, cela est suffisant. Si par contre on avait amplifié le plasmide vecteur par PCR, sans purifier sur gel, il aurait aussi fallu procéder à l’élimination du plasmide parent, en ajoutant du DpN1, qui est une endonucléase qui digère l’ADN parent).

On peut enfin procéder à l’intégration de la séquence d’intérêt au plasmide (mise en œuvre effective de ce qui a été dit sur la recombinaison homologue) : on mélange

plasmides coupés et séquences d'intérêt, dans un tampon adéquat contenant des dNTPs (c'est à dire les 4 base G, A, T, C), une polymérase, exonucléase, ligase.

Tout ceci reste à incuber pendant 1 heure à 50°C.

### **Intégration du vecteur dans une bactérie et mise en culture**

Le but est d'obtenir le vecteur (le plasmide modifié) en grande quantité, via la mise en culture de bactéries dans lesquelles on a introduit cette plasmide.

L'intégration du vecteur dans la bactérie peut utiliser deux méthodes différentes, toutes deux mises en œuvre dans le laboratoire (le choix dépend de la bactérie) :

- choc électrique
- choc thermique

On étale les bactéries dans des boîtes de Petri, avec un milieu de culture LB (lysogeny broth, ou "Luria-Bertani) et l'antibiotique (l'ampicilline dans notre cas).

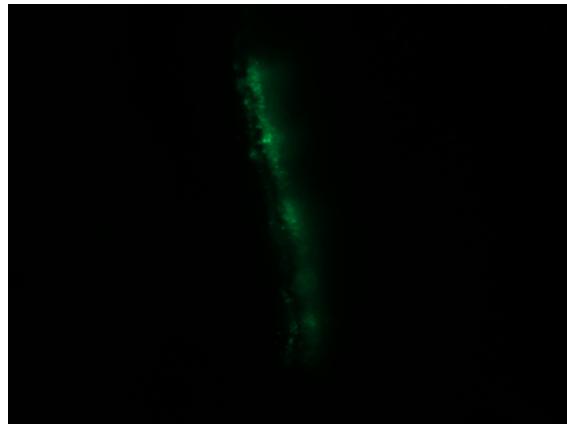
On pique ensuite avec un code de pipette une colonie de bactéries sur boîte, et on transfère le cône dans un erlenmeyer qui contient du milieu LB et de l'ampicilline.

Le lendemain, après l'incubation des bactéries, on récupère quelques colonies pour effectuer une mini/midi ou maxi prep (midi prep dans notre cas, compte tenu de la taille de notre préparation). Il s'agit d'une méthode permettant de récupérer de l'ADN plasmidien à partir des bactéries qui les contiennent. Le protocole permet sa récupération et sa purification par le biais de centrifugation et de lavage répétés. A titre de vérification du bon déroulé de cette expérience, on mesure la concentration des échantillons d'ADN obtenus par spectrophotométrie à 280nm (longueur d'onde où l'ADN absorbe).

### **Électroporation**

L'électroporation est une technique permettant de transférer de l'ADN dans une cellule, grâce à un courant électrique. L'ADN étant chargé négativement, il migre du côté de l'électrode positive.

Pour injecter l'ADN d'intérêt dans le tube neural des embryons de poulet, on va d'abord injecter un liquide coloré en bleu dans le tube neural avec un capillaire et un tube relié à la bouche dans lequel on va souffler pour expulser du liquide. Ensuite, on électropore avec deux électrodes : on envoie un courant électrique de part et d'autre du tube. Ainsi l'ADN pénètre dans les cellules du tube neural, l'ADN migrant vers le pôle positif.



Tube neural d'un embryon de poulet après électroporation,  
observé au microscope à fluorescence



Tube neural d'un embryon de poulet

### Dissection et coupe au cryostat

Les embryons de poulet sont disséqués quelques jours plus tard pour récupérer le tube neural.

On fixe le tube neural de l'embryon récupéré dans un gel d'agarose que l'on congèle. On utilise un cryostat, c'est à dire un dispositif cryogénique, muni d'un microtome, qui permet de réaliser des coupes très fines ( $14 \mu\text{m}$ ) dans un environnement très froid ( $-20^\circ$ ). Les coupes réalisées doivent être conservées à cette température de  $-20^\circ$ .

### Immuno-détection (ou western blot)

Une immuno-détection permet de révéler la présence de protéines d'intérêt grâce aux propriétés de liaisons spécifiques des anticorps.

Pour procéder au western blot, on commence par saturer tous les sites non spécifiques de notre échantillon, avec une solution de BSA (albumine de sérum bovin). On incube ensuite

l'échantillon dans une solution d'anticorps primaires qui vont se lier spécifiquement à la protéine d'intérêt. On rince pour enlever les anticorps primaires non liés. On expose ensuite l'échantillon à un autre anticorps dit secondaire qui va se lier à l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire est couplé à une enzyme fluorescente qui permettra l'identification visuelle de la protéine.

---

## Séminaires

- Ehud Isacoff : "Lighting appearance GPRs : circuit to molecular mechanism"
- Tobias Bonhoeffer : "How experiences changes synapses in the mammalian brain"

# Semaine 3 - Team Pierre Paoletti

---

## Récepteurs du glutamate et synapses excitatrices

Le glutamate est le médiateur de la plupart des transmissions nerveuses excitatrices chez le vertébré (la majorité des canaux ioniques présents sur les récepteurs post-synaptiques fonctionnent grâce à des récepteurs du glutamate). Les récepteurs NMDA ("N-methyl-D-aspartate") sont une famille de récepteurs canaux du glutamate. Ils jouent un rôle dans la plasticité synaptique liée à l'apprentissage et la mémoire. Par ailleurs, des dysfonctionnements de ces récepteurs canaux du glutamate peuvent entraîner des pathologies tel que AVC, douleurs chroniques, schizophrénie...

L'équipe de Pierre Paoletti étudie l'organisation, l'architecture moléculaire, le fonctionnement et la diversité de ces récepteurs, un des buts étant de mieux comprendre leur implication dans certaines pathologies.

Ces récepteurs sont des tétramères organisés en dimères de dimères, composés de deux sous-unités GluN1 liant la glycine et deux autres sous-unités GluN2 liant le glutamate (dans la plupart des cas). Ces deux agonistes (molécule interagissant avec un récepteur, en l'occurrence le récepteur NMDA) sont nécessaires pour ouvrir le canal ionique des NMDARs. Leur fixation à des sous-unités du récepteur entraîne l'activation du canal.

C'est l'équipe Paoletti qui, par exemple, a déterminé l'arrangement spatial des sous-unités GluN1 et GluN2 autour du canal ionique.

<http://www.ibens.ens.fr/spip.php?rubrique24>

## Références

NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease (Pierre Paoletti, Camilla Bellone & Qiang Zhou)

<http://www.nature.com/nrn/journal/v14/n6/full/nrn3504.html>

---

## Influence de l'azospermine (AzoSp) sur les récepteurs NMDARs.

Cette semaine avec Lætitia Mony, nous avons testé l'influence de l'azospermine (AzoSp) sur les récepteurs NMDARs. L'AzoSp a un effet différent selon sa concentration : potentiation à faible concentration ( $0,1\text{-}1\mu\text{M}$ ), inhibition à plus forte concentration ( $3\text{-}10\mu\text{M}$ ). Par ailleurs, l'AzoSp se présente sous deux formes configurationnelles différentes *cis* et *trans*. La forme *cis* de l'AzoSp est obtenue par illumination : à  $365\text{nm}$  (UV) l'AzoSp préfère l'état *cis*, après illumination à  $440\text{nm}$  (lumière bleue) elle se re-conforme en *trans*. L'AzoSp *cis* et *trans* ont des effets différents sur l'activation des récepteurs NMDARs.

---

## Modèle

Le modèle utilisé par Lætitia Mony est l'ovocyte de xénope (un genre d'amphibien). L'ovocyte (cellule sexuelle femelle) de xénope est une grosse cellule puisqu'elle mesure à peu près 1mm de diamètre, ce qui permet d'y injecter facilement de l'ADN. Autre avantage, les xénopes produisent énormément d'oeufs. Ceux-ci sont recueillis par intervention chirurgicale : une entaille dans l'abdomen permet de récupérer les sacs ovocytaires. On peut réopérer le xénope après quelques mois pour récupérer de nouveau ses ovocytes.

Ce modèle est économique car les xénopes ne nécessitent pas beaucoup d'entretien, ils sont très résistants et leurs oeufs, qui n'ont pas besoin d'être manipulés en milieu stérile, aussi.

---

## Travail expérimental

### **Récolte des sacs d'ovocytes d'un xénope**

On fait une incision dans l'abdomen du xénope, préalablement anesthésié, et on récupère les sacs avec une pince.

On referme l'animal en suturant en premier le muscle, puis la peau. On l'isole des autres xénopes pendant une semaine, le temps de la cicatrisation, pour éviter les complications. À l'issue de cette opération, il faut trier les ovocytes récoltés pour se débarrasser des ovocytes morts. Les ovocytes morts présentent des tâches blanches sur leur pôle animal. On incube ensuite les oeufs dans de la collagenase qui va digérer les tissus restants provenants des sacs.

### **Génétique**

Comme dans tous les laboratoires de recherche que j'ai pu visiter, Lætitia Mony fait énormément de génétique : clonages, mises en culture de bactéries, PCR, séquençages, etc. Les modes opératoires varient en fonction des laboratoires et des buts des chercheurs.

J'ai déjà parlé de PCR dans la partie consacrée à la semaine 1, et j'ai fait une description assez précise d'une technique de clonage dans la partie 2. Je vais donc ici me contenter de parler de séquençage. (On trouve aussi dans les parties sus-mentionnées la définition des termes utilisés ci-après).

On utilise fréquemment le séquençage afin de vérifier la séquence de l'ADN d'intérêt qu'on a recueillie suite à une PCR, ou qu'on a mis en culture dans des bactéries (auxquelles on l'a insérée par exemple via un plasmide utilisé comme vecteur, cf. semaine 2) : correspond-il bien à ce qu'on attend ?

Le séquençage n'est pas réalisé sur place : on envoie le produit des mini/midi ou maxi prep à un laboratoire (qui se trouve en Allemagne). Les résultats sont reçus dès le lendemain par e-mail.

Il faut ensuite analyser ces résultats.

Pour Lætitia Mony, il s'agit de comparer les séquences obtenues avec la séquence "sauvage" qui code les récepteurs du glutamate NMDA.

On trouve la séquence protéique "sauvage" sur <http://www.uniprot.org>.

Il faut donc comparer notre séquence, telle que reçue du laboratoire (une suite de nucléotides), avec cette suite d'acides aminés.

Pour cela, on traduit notre séquence de nucléotides en séquence protéique grâce au site web [web.expASY.org](http://web.expasy.org). Ce site permet de traduire notre séquence d'ADN en prenant comme point de départ différents emplacements dans la séquence qui peuvent correspondre à une phase de lecture ouverte. Ensuite on procède à l'alignement des séquences pour les comparer à la séquence protéique "sauvage" sur le site [www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/). (exemple en annexe)

### **Transformation d'ADN (injection d'ADN dans les ovocytes de xénope)**

On injecte l'ADN d'intérêt dans les ovocytes de xénope à l'aide d'un capillaire contrôlé. On implante le capillaire dans le pôle animal car c'est là que se trouve le noyau.

### **Clampage de l'ovocyte**

Il s'agit d'observer la réponse de l'ovocyte génétiquement modifié à différents stimulus. Nous observerons l'effet de l'AzoSP cis et trans.

La transformation de l'ovocyte a marché si on observe une réponse électrique à la libération d'agonistes dans le milieu de l'ovocyte. Cette libération alimente les sous unités GluN1 et GluN2b et donc ouvre les canaux ioniques, entraînant un afflux d'anions modifiant le potentiel électrique de la membrane (le potentiel électrique de la cellule est mesuré par deux électrodes plantées à la surface de la cellule).

Résultats : voir annexe

# Semaine 4 - Team Germán SUMBRE

---

## Neuroéthologie du poisson-zèbre

L'équipe de Germán Sumbre étudie la neuroéthologie du poisson-zèbre, c'est à dire comment le système nerveux contrôle le comportement du poisson-zèbre.

<http://www.ibens.ens.fr/spip.php?rubrique23>

---

## Modèle

Le poisson-zèbre est un modèle très utilisé en neurologie. C'est un petit poisson ne dépassant pas 5cm à l'âge adulte que l'on rencontre dans les eaux douces d'Inde. Facile à élever, il pond très abondamment toute l'année. Il présente la particularité d'être transparent pendant le début de son développement ce qui permet de pouvoir observer facilement *in vivo* ses mécanismes physiologiques en utilisant des méthodes de fluorescence. Il est capable de régénération. Par exemple, pour obtenir le génotype de d'un poisson-zèbre que l'on a essayé de modifier, on peut lui couper un morceau de queue, et celle-ci repoussera.

---

## Travail expérimental

Comme dans les semaines précédentes, la génétique est largement utilisée pour l'étude du poisson-zèbre. Mais, à la différence des autres équipes visitées, on met aussi en œuvre des techniques d'analyse comportementale : quels sont les résultats des manipulations faites sur le comportement de l'animal ?

### Croisement des poissons-zèbres

L'équipe de Germán Sumbre réalise elle-même ses croisements. Le croisement des poissons zèbre s'effectue à l'animalerie. On place mâles et femelles issus des lignées que l'on veut croiser dans un même aquarium, mais en les séparant par une grille. On les laisse ainsi séparés toute la nuit : c'est une façon de les exciter afin d'optimiser l'accouplement. Ainsi, lorsque l'on allume la lumière le matin et que l'on retire la barrière, les poissons s'accouplent rapidement et immédiatement après, les femelles pondent leurs oeufs.

## **Transformation d'ADN dans les oeufs de poissons-zèbres**

Deux chercheuses du Collège de France sont venues durant ma semaine de stage pour réaliser une transformation d'ADN dans les œufs des poissons-zèbres.

La technique est la même que celle utilisée par Lætitia Mony sur les ovocytes de Xénope. On ne peut transformer l'œuf que lorsqu'il n'est composé que d'une seule cellule, c'est à dire entre 0 et 20min après la ponte.

L'opération est donc plus délicate avec les poissons zèbre qu'avec les xénopes, car les cellules sont plus petites et il y a une contrainte de temps.

## **Destruction ciblée de neurones grâce à l'utilisation d'un microscope bi-photonique**

Cette semaine, Adrien Jouary commençait un travail de recherche sur l'influence de quelques neurones du poisson-zèbre sur son déplacement. Dans ce cadre, il souhaite procéder à l'ablation de ces neurones afin d'étudier l'impact sur le déplacement du poisson-zèbre. Il utilise pour cela un microscope bi-photonique.

Le microscope bi-photonique a marqué une avancée importante pour l'observation cellulaire *in vivo*, permettant une imagerie en profondeur des tissus vivants.

Le laser permet de brûler les cellules sur lesquels on se focalise : on peut ainsi détruire des neurones de façon unitaire.

Pour cela, il faut immobiliser le poisson-zèbre. On l'immobilise dans une goutte d'agarose concentré à 2%, et on l'entoure d'agarose à 4%, pour être sûr qu'il ne s'échappe pas.



poisson-zèbre immobilisé dans l'agarose, vu au microscope optique

Une fois l'opération faite, on libère le poisson de l'agarose pour observer ses mouvements. Une caméra, reliée à un ordinateur, est placée juste au dessus du bassin. Un programme permet de soustraire l'image de départ aux images prises lors de l'enregistrement (ce qui permet ensuite de calculer la vitesse et les mouvements du poisson).

## **Fin clip**

Le fin clip consiste à couper un petit bout de la queue des poissons pour pouvoir ensuite procéder au séquençage de son ADN, et voir si il possède ou pas les mutations souhaitées. Pour cela il faut endormir les poissons. On les sort de l'eau, et on coupe un morceau de leur queue, puis on les rince dans deux bains différents et on les met dans un nouvel aquarium. On les sépare des poissons n'ayant pas subi d'ablation pour qu'ils ne se trouvent pas désavantagés, pour se nourrir par exemple.

---

Séminaires

Buzaki - Emergence of cognition from action

# Annexes

## Annexe semaine 1

### Protocole pour la préparation du milieu de culture

N SPASSKY Lab

## SOLUTIONS AND REAGENTS

### Poly-L-Lysine (SIGMA Poly-L-Lysine Hidrobromide P1524):

Stock 50X (keep at -20C): eppendorfs 1ml, 2mg/ml in sterile water. Filter the solution with a 0.22 µm filter.

Working solution (keep at 4C): dilute 1ml of PLL 50X in 49 ml of sterile MilliQ water.

### Protocol for cleaning the coverslides:

Heat 100ml of 68% nitric acid in a beaker under the hood. Put the coverslides (one by one) inside the solution once it is hot and keep the coverslide there during 1 hour (under vigilance) or during 18-36 hours at room temperature.

Rinse several times with distilled water.

Transfer the coverslides one by one with forceps to a Petri dish filled with fresh distilled water (x3).

Dry the coverslides under the hood in a filter paper of at 70C in the oven.

Once dried, sterilize the coverslides (220C during 7 hours, in a glass Petri dish covered by foil).

### Hank's solution (4C):

50ml Hanks balanced salt solution 10X (GIBCO, RT)

5 ml HEPES 1M (GIBCO, 15630-056, RT)

5 ml sodium bicarbonate (7,5%; GIBCO, 25080, RT)

5 ml Peni/Strepto (10000 Units; GIBCO 15140, -20C or 4C)

435 ml sterile water

Filter the solution and keep at 4C.

### DMEM 10% FBS 1% P/S

450 ml DMEM Glutamax-I (GIBCO 31966, RT or 4C)

50 ml decomplemented FBS (GIBCO 10270, -20C. To decomplement the FBS, once defrosted, heat it in the water bath at 56C during 30 min. Once decomplemented, keep it frozen at -20C.

5 ml Peni/Strepto (10000 Units; GIBCO 15140, -20C or 4C)

### DMEM 0% FBS 1% P/S

500 ml DMEM Glutamax-I (GIBCO 31966, RT or 4C)

5 ml Peni/Strepto (10000 Units; GIBCO 15140, -20C or 4C)

**L15:** Liebovitz's L-15 medium (GIBCO 11415, 4C)

**Enzymatic digestion solution** (make fresh when needed)

3 ml DMEM ~~10%~~ FBS 1% P/S (emulsion 1 ml/centrifuge)

90 µl Papain (Worthington 3126; 100 mg, 4C)

45 µl DNase I (1%; 100 mg in 10 ml water. Worthington 2139, 100mg)

72 µl Cysteine (12mg/ml in water; L-Cysteine Sigma C7352)

Filter the solution

① *faire de l'émulsion avec DNase I.*  
② *filtrer et compléter à 6 ml avec DNase I.*

**Stop Solution** (make fresh when needed)

9 ml L15

*stock ref : 10 109 878 001. 1 litre boîte papier*

1 ml trypsin inhibitor (Worthington 3126; 100 µg, 4C). Stock 10mg/ml trypsin inhibitor + 500 µg/ml BSA in PBS or L15°

200 µl DNase I (1%; 100 mg in 10 ml water. Worthington 2139, 100mg)

Filter the solution

**Trypsin-EDTA 0,5% (GIBCO 25300)**

DNATI F12 + NL + BG + 2% FBS      P/S → 500 µl  
milieu utilisé pour faire la  
pluripotence des cellules induites  
à la culture, neurosphère, oligo-  
DNATI F12 9/10 50 ml  
milieu utilisée pour faire la  
pluripotence des cellules induites  
à la culture, neurosphère, oligo-  
DNATI F12 9/10 50 ml

FGF 20 µg/ml → 10 µl  
EGF " " " "  
P/S → 50 µl  
NL 100 µl → 1X  
DNATI F12 9/10 50 ml

neurosphère : enlever milieu  
ajouter Hanks + EDTA  
laisser 40' à 37°C  
désinfecter avec pipette

Plaque : diluer 1/10 de PBS  
mélanger 10 sec  
compter 2 lignes

# Protocole pour la mise en culture des cellules épendymaires

7/06/2016

N SPASSKY Lab

## EPENDYMAL CELL CULTURE

sox : 1ml + 9ml H2O

- Coat with **Poly-L-Lysine (PLL ; 40µg/ml)** one  $25\text{ cm}^2$  flask per newborn mice :

- Add 1ml of sterile PLL per flask.
- Incubate at 37°C during 1 hour
- Rinse x3 with sterile MilliQ water
- Let the flasks dry under the hood, at least for 1 hour.



- Prepare the **enzymatic digestion solution** (see the solutions protocol). Prepare approximately 1 ml per telencephalon. (par cerveau)
- Dissect the P0-P10 mice telencephala (remove the hippocampus, the choroid plexus, the olfactory bulb and meninges) in Hank's or PBS-Glucose solution (keep it on ice once dissected). sur boîte <sup>ou glace</sup> pliée.
- Cut the dissected telencephala into little pieces with the help of a scalpel. Transfer it into a 15 ml tube.
- Centrifuge 5-7 min at 100G
- Remove the supernatant and add 1ml of enzymatic digestion solution per mice. (filtree)
- Incubate 45 min at 37°C (30 - 1h30).
- Prepare the **stop solution** (see the solutions protocol) (filtree)
- Centrifuge 5-7 min at 100G. → aspirer avec pipetman
- Remove the supernatant and add 1ml of stop solution per mice. (10ml)
- Centrifuge 5-7 min at 100G (au 1000 rpm) → aspirer avec pipetman
- Remove the supernatant and add 15ml of L15 media.
- Centrifuge 5-7 min at 100G = ny
- Remove the supernatant, add 1ml of L15 media and dissociate carefully the cells mechanically, with a P1000 (do not pipet the cells more than 10 times). Add L15 to 15 ml 5ml (beurin si st lèpre de, au bout de 5 min, on peut voir des cellules dans le flacon)
- Centrifuge 5-7 min at 100G (important faire 5') (mieux donner 10min)
- Remove the supernatant, add 1ml of 15 and redissociate mechanically the cells. Add L15 to 15 ml 5ml
- Centrifuge 5-7 min at 100G )  
During the centrifugation, add 5ml of DMEM 10%FBS 1%P/S per  $25\text{ cm}^2$  flask.
- Remove the supernatant and add DMEM 10%FBS 1%P/S (1ml per mice) => Pas bonne digestion ADN  
Add 1ml of cell solution per flask. et remettre en suspension
- Change the media the following day (no need to rinse)

Aspirer au pipetman  
cellules virgines  
retirer milieu  
au pipetman le  
plus possible  
(il reste L15 sans  
peut-être).

- (à 5 jours)
22. When cells are confluent, cover the top of the flask with parafilm and shake the flasks at 250rpm over night at room temperature.
23. Coat round pre-cleaned sterile coverslides with PLL (the same as flask coating protocol) Rinse 3x in  $\text{H}_2\text{O}$  - Dry  $\rightarrow$  1h. (à 5 jours, couvrir le dessus de la plaque de 12 lamelles / flacon)
24. Remove the media of the flasks and rinse with sterile Ca/Mg free PBS three times.
25. Add 1ml of Trypsin-EDTA solution per flask and incubate for 5 min at 37°C. (2-5 min).
26. Look the cells at the microscope to see if they are free floating.
27. Transfer the cells to a 15ml tube and add 1ml of decomplemented FBS per ml of cell solution.  $\Rightarrow$  count the cells (20  $\mu\text{l}$ )  $\rightarrow$  1ml Trypsin + 1ml SVF  $\downarrow$  / ml.
28. Centrifuge 5-7 min at 100G
29. Remove the supernatant and add 1ml of DMEM 10%FBS 1%P/S per flask.
30. Count the cells (10  $\mu\text{l}$  of trypan blue + 10  $\mu\text{l}$  of cell solution)
31. Centrifuge 5-7 min at 100G ]
32. Resuspend the cells in the correct amount of DMEM 10%FBS 1%P/S, to make as many drops of 20  $\mu\text{l}$  with  $1.5 \times 10^5$ - $2 \times 10^5$  cells as needed.  $2 \cdot 10^5$  cells per 20  $\mu\text{l}$  per  $\downarrow$  paral
33. Put the drops of 20  $\mu\text{l}$  carefully in the coated coverslides, incubate for 1 hour at 37°C (30min minimum).
34. After 1 hour, add 500  $\mu\text{l}$  per well (24 well dish) of DMEM 10%FBS 1%P/S
35. The following day (Day 0):  
 (Rinse the cells x3 (DMEM 1%P/S without FBS))  
 Add 500  $\mu\text{l}$  per well (24 well plaque) of DMEM 1%P/S

Schéma 1<sup>e</sup> : Day 1 : DMEM P/S 02 SVF

NB : à 5 jours de confluence sur une plaque de 12 lamelles / flacon pour mettre les gouttes.  
 Si + de 5 jours de confluence au si 4 flacons confluents, faire + de lamelle.

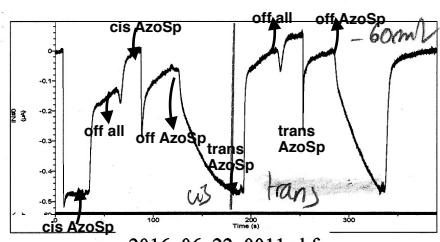
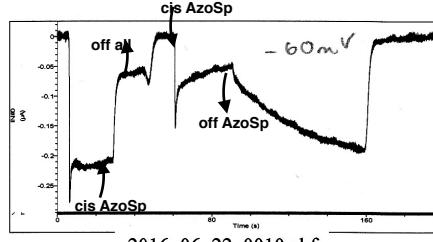
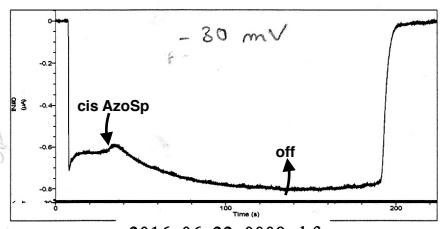
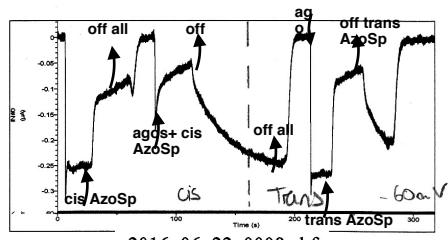
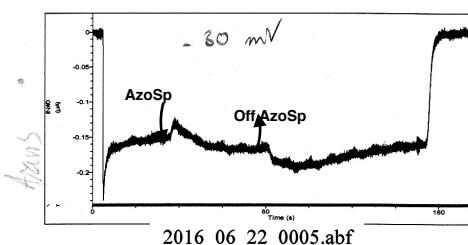
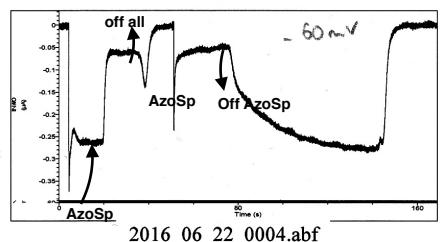
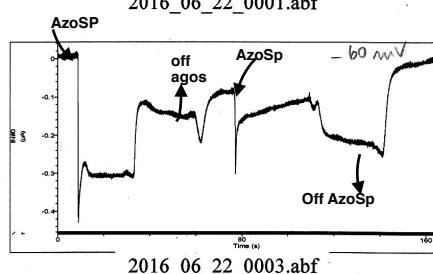
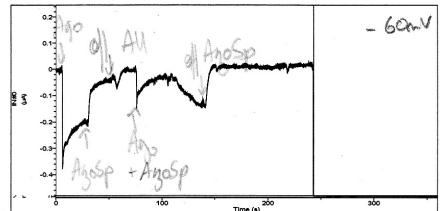
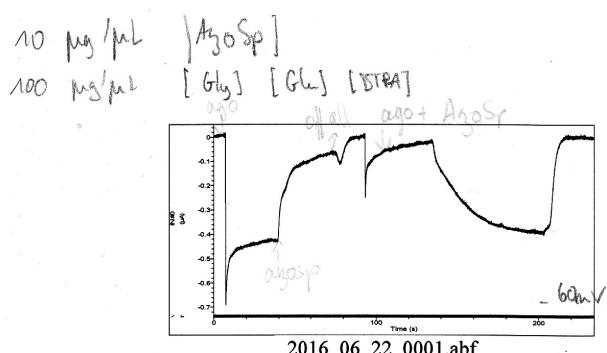
## Annexe semaine 3

### Résultats de l'électrophysiologie sur les ovocytes de xénope

électrophysiologie sur ovocyte de xénope - 22/06/16

1µg/µL AzoSp - 100µg/µL agonistes (Glu, Gly, DNTA)				
-60 mV	courant sans AzoSp (-µA)	courant avec AzoSp (-µA)	courant résiduel (µA)	
	<b>Trans</b>			
1	0,44	0,06	0,13636363636363	
2	0,194	0,0384	0,19793814432989	
3	0,31623	0,0804	0,25424532776776	
4	0,26	0,06537	0,25142307692307	
8	0,27	0,07	0,25925925925925	
11	0,03	0,01	0,33333333333333	
<b>moyenne</b>			<b>0,23876046299616</b>	
	<b>Cis</b>			
6	0,2451	0,0848	0,34598123215014	<u>test de student</u>
8	0,26	0,09	0,34615384615384	
10	0,20488	0,05350	0,26112846544318	
11	0,4705	0,1307	0,27778958554729	
<b>moyenne</b>			<b>0,30776328232361</b>	
-30 mV				
	<b>Cis</b>			
5	0,15142	0,165	1,08968432175406	
	<b>Trans</b>			
9	0,6228	0,7853	1,26091843288375	

<b>10µg/µL AzoSp - 100µg/µL agonistes (Glu, Gly, DNTA)</b>			
-30 mV	<b>courant sans AzoSp (-µA)</b>	<b>courant avec AzoSp (-µA)</b>	<b>courant résiduel (µA)</b>
	<b><u>cis</u></b>		
1	0,28	0,09	0,321428571428571
3	0,14	0,08	0,571428571428571
<b>moyenne</b>			<b>0,446428571428571</b>
	<b><u>trans</u></b>		
2	0,27	0,11	0,407407407407407
6	0,6	0,409	0,681666666666667
4	0,17	0,08	0,470588235294118
<b>moyenne</b>			<b>0,519887436456064</b>
<b>5 (mutant ΔNTD)</b>	0,07486	0,02963	0,395805503606733
	<b>courant avec AzoSp (-µA) (trans)</b>	<b>courant avec UV(345nm) (cis)</b>	<b>courant résiduel (µA) (trans=&gt;cis)</b>
4	0,08	0,07	0,875
<b>4 après rayonnement UV</b>	<b>courant avant nv rayon UV</b>	<b>courant à la fin</b>	
	0,139	0,04	0,287769784172662
	<b>courant avec AzoSp (-µA)</b>	<b>courant avec bleu (440 nm) (trans)</b>	
	0,059	0,15	2,54237288135593
	<b>courant avant nv rayon bleu</b>	<b>courant à la fin</b>	
<b>4 après rayonnement bleu</b>	0,105	0,155	1,47619047619048



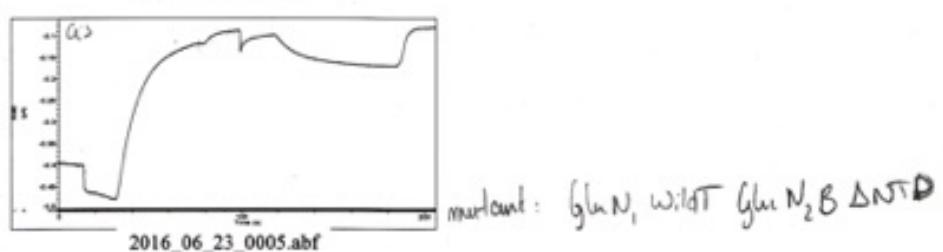
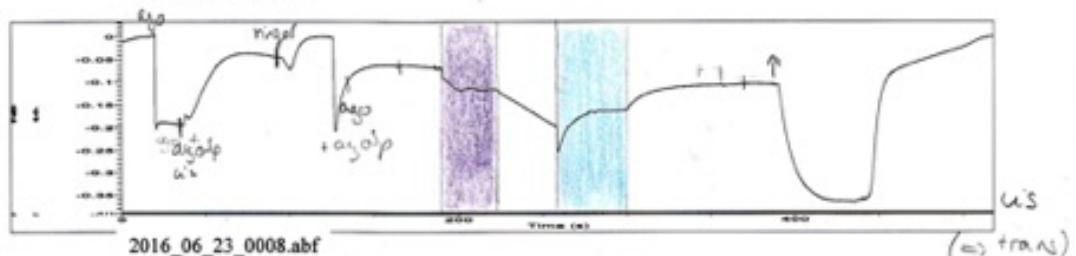
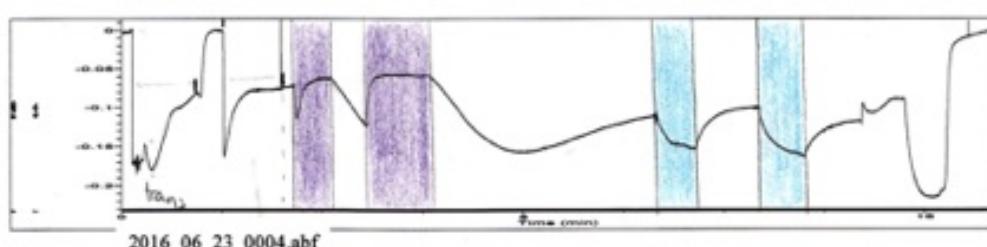
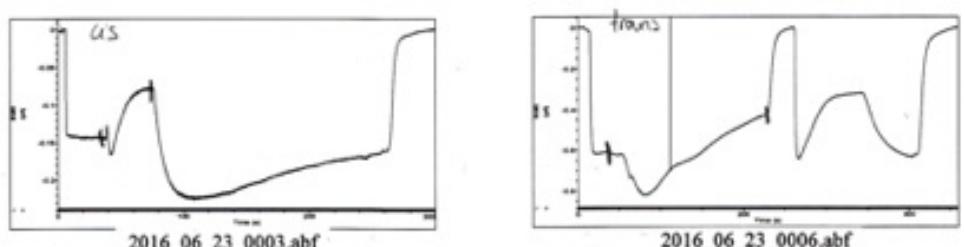
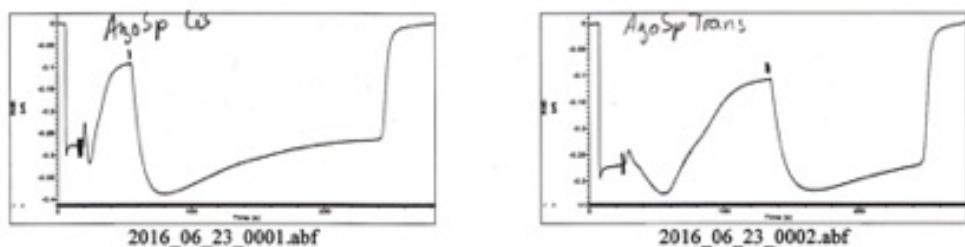
électrophysiologie sur orocyte de xénophage

22/06/16

vendredi 24 juin 2016, 13:58:13

Name: \_\_\_\_\_

GluN<sub>1</sub> WT  
GluN<sub>2</sub> WT



- 30mV

vendredi 24 juin 2016, 15:39:47

Name: \_\_\_\_\_

## Traitements d'un séquençage de trois séquences (séquence 2.1, 2.2 et 2.4) qui sont des mutants de la séquence codante pour GLUN2B

### séquence 2.1

```
XHWXIFSRXTYFPGYQDFVNKIRSTIENSFGWELEEVLLDMSLDDGDSKIQNQLKKL  
QSPPIILLYCTKEEATYIFEVANSVGLTGYGYTWIVPSLVAGDTDTVSEFPGLISVSYD  
EWYGLPARVRDGIAITTAASDMLSEHSFYPEPKSSCYNTHEKRIYQSNMLNRYLINVT  
FEGRNLSFSEDGYQMHPKLVIILLNKERKWERVGKWKDKSLQMKYYVWPRMCPETEEQED  
DHLSIVTLEEAPFVIVESVDPLSGTCMRNTVPCQKRIISENKXDEEPGYIKXCCKGFCID  
ILKKISKSVKFTYDLYLVTNGKHGKINGTWNGMIXEVVMKRAYMXVGSLTINEERPEVV  
DFXXPFXXTGISXM
```

### séquence 2.2

```
FXIVXPPTSPATRTS-TRSAALLRTALCAGSSRKSSC-TCL-TMATLRFRIS-RSCRAPS  
SSTAQRKKYDXVXLLHRXTYFPGYQDFVNKIRSTIENSFGCELEEVLLDMSLDDGDSK  
IQNQLKKLQSPPIILLYCTKEEATYIFEVANSVGLTGYGYTWIVPSLVAGDTDTVSEFP  
GLISVSYDEWDYGLPARVRDGIAITTAASDMLSEHSFYPEPKSSCYNTHEKRIYQSNML  
NRYLINVTFEGRNLSFSEDGYQMHPKLVIILLNKERKWERVGKWKDKSLQMKYYVWPRM  
CETEEQEDDHLSIVTLEEAPFVIVESVDPLSGTCMRNTVPCQKRIISENKXDEEPGYIKX  
CCKGFCIDILKKISKSVKFTYDLYLVTNGKHGXKINGTWNGMIGEVVMKRAYMAVGS  
LTINEERX
```

séquences protéiques de quatre échantillons envoyés à séquencer. La partie soulignée en rose correspond aux séquences de lectures ouvertes

### séquence 2.4

```
LVXLHHRXTYFPGYQDFVNKIRSTIENSFGWELEEVLLDMSLDDGDSKIQNQLKKLQS  
PIILLYCTKEEATYIFEVANSVGLTGYGYTWIVPSLVAGDTDTVSEFPGLISVSYDEW  
DYGLPARVRDGIAITTAASDMLSEHSFYPEPKSSCYNTHEKRIYQSNMLNRYLINVT  
FEGRNLSFSEDGYQMHPKLVIILLNKERKWERVGKWKDKSLQMKYYVWPRMCPETEEQED  
LSIVTLEEAPFVIVESVDPLSGTCMRNTVPCQKRIISENKTDEEPGYIKXCCKGFCID  
KKISKSVKFTYDLYLVTNGKHGKINGTWNGMIGEVVMKRAYMAVGS  
LTINEERXXP  
SXPFXXTGIXXMVXRSGNTXXP
```

2.2

2.4

**GLUN2B**

2.1

il s'agit de la séquence sauvage à laquelle on compare les séquences séquencées

2.2

2.4

GLUN2B

2.1

QDFVNKIRSTIENSFGCELEEVLLDMSLDDGDSKIQNQLKKLQSPPIILLYCTKEEATY

QDFVNKIRSTIENSFGWELEEVLLDMSLDDGDSKIQNQLKKLQSPPIILLYCTKEEATY

QDFVNKIRSTIENSFGWELEEVLLDMSLDDGDSKIQNQLKKLQSPPIILLYCTKEEATY

\*\*\*\*\*

IFEVANSVGLTGYGYTWIVPSLVAGDTDTVSEFPGLISVSYDEWDYGLPARVRDGIAI

IFEVANSVGLTGYGYTWIVPSLVAGDTDTVSEFPGLISVSYDEWDYGLPARVRDGIAI

IFEVANSVGLTGYGYTWIVPSLVAGDTDTVSEFPGLISVSYDEWDYGLPARVRDGIAI

IFEVANSVGLTGYGYTWIVPSLVAGDTDTVSEFPGLISVSYDEWDYGLPARVRDGIAI

\*\*\*\*\*

2.2

2.4

GLUN2B

2.1

ITTAASDMLSEHSFYPEPKSSCYNTHEKRIYQSNMLNRYLINVTFEGRNLSFSEDGYQMH

ITTAASDMLSEHSFYPEPKSSCYNTHEKRIYQSNMLNRYLINVTFEGRNLSFSEDGYQMH

ITTAASDMLSEHSFYPEPKSSCYNTHEKRIYQSNMLNRYLINVTFEGRNLSFSEDGYQMH

ITTAASDMLSEHSFYPEPKSSCYNTHEKRIYQSNMLNRYLINVTFEGRNLSFSEDGYQMH

\*\*\*\*\*

2.2

2.4

GLUN2B

2.1

PKLVIILLNKERKWERVGKWKDKSLQMKYYVWPRMCPETEEQEDDHLSIVTLEEAPFVIV

PKLVIILLNKERKWERVGKWKDKSLQMKYYVWPRMCPETEEQEDDHLSIVTLEEAPFVIV

PKLVIILLNKERKWERVGKWKDKSLQMKYYVWPRMCPETEEQEDDHLSIVTLEEAPFVIV

PKLVIILLNKERKWERVGKWKDKSLQMKYYVWPRMCPETEEQEDDHLSIVTLEEAPFVIV

\*\*\*\*\*

2.2           ESVDPLSGTCMRNTVPCQKRIISENKXDEEPGYIKXCCKGFCIDILKKISKSVKFTYDLY  
2.4           ESVDPLSGTCMRNTVPCQKRIISENKTDEEPGYIKXCCKGFCIDILKKISKSVKFTYDLY  
GLUN2B       ESVDPLSGTCMRNTVPCQKRIISENKTDEEPGYIKKCCKGFCIDILKKISKSVKFTYDLY  
2.1           ESVDPLSGTCMRNTVPCQKRIISENKXDEEPGYIKXCCKGFCIDILKKISKSVKFTYDLY  
\*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\*

2.2           LVTNGKHGXKINGTWNGMIGEVVMKRAYMAVGLTINEERX-----  
2.4           LVTNGKHGKKINGTWNGMIGEVVMKRAYMAVGLTINEERSEXXDFSPFXXTGIXXMVX  
GLUN2B       LVTNGKHGKKINGTWNGMIGEVVMKRAYMAVGLTINEERSEVVDFSVPFIETGISVMVS  
2.1           LVTNGKHGKKINGTWNGMIXEVVMKRAYMXVGLTINEERPEVVDFXXPFXXTGISXM--  
\*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\*  
\*\*\*\*\*

Les trous  
correspondent à  
une différence dans  
les séquences