

Formulaire de stage (sur une page maximum)
Parcours M2 GGBS 2022-23

Laboratoire : RMeS,UMR 1229

Intitulé/N° d'équipe : Regos

Nom-Prénom de l'encadrant : **Geoffroy Valérie/Jehan Frédéric**

Courriel de l'encadrant : valerie.geoffroy@univ-nantes.fr/frederic.jehan@univ-nantes.fr

Titre du stage : **Validation de cibles du microARN 199a2 identifiées par transcriptomique dans le tissu osseux**

Résumé du projet proposé :

La perte osseuse liée au vieillissement est un problème médical et socio-économique majeur dans le monde. Les microARNs peuvent avoir un potentiel clinique important en tant qu'agents thérapeutiques pour atténuer ou inverser le vieillissement du tissu osseux. Nous avons montré qu'un niveau d'expression élevé du miR-199a2 dans le tissu osseux chez l'Homme est associé à une masse osseuse plus élevée. Nous avons également étudié la surexpression du miR-199a2 dans les ostéoblastes sous contrôle du promoteur du collagène de type 1 in vivo (souris transgéniques Col1a1-miR-199). La conséquence est une augmentation tout à fait exceptionnelle de la masse osseuse chez les souris transgéniques avec des propriétés mécaniques fortement améliorées. Dans les os de ces souris, nous venons d'identifier par RNA-seq des gènes dont l'expression est significativement diminuée par la surexpression du transgène et qui pourraient constituer les principales cibles moléculaires du miR-199a2 in vivo. Afin de différencier les gènes directement régulés par le miR-199a2 de ceux dont l'expression est indirectement modifiée par l'expression du transgène, la liste de gènes différentiellement exprimés va être comparée à celle des gènes possédant un site de liaison potentiel ou plus pour le miR-199a2. La validation des cibles potentielles du miR-199a2 obtenues par cette analyse in silico des résultats RNA-seq aura préalablement été effectuée sur les mêmes préparations d'ARNs analysés par séquençage du transcriptome et sur des réplicats d'ARN (ARN extraits d'os d'autres animaux) par RT-qPCR.

Le but du stage est de valider les cibles du miR-199a2 dans le tissu osseux qui auront été identifiées in silico.

Concernant les gènes pour lesquels au moins un site de liaison pour le miR-199a2 a été identifié et ayant passé le test de RT-qPCR, nous utiliserons une approche de validation par transfection suivie d'une analyse par Western Blot. L'extrémité 3'UTR des gènes sélectionnés sera cloné dans un plasmide rapporteur (pMIRreport ou équivalent). Les plasmides obtenus seront co-transfectés dans des cellules ostéoblastiques avec des quantités croissantes de miR-199a2. La quantification de l'expression du gène rapporteur (luciférase) nous permettra de déterminer l'efficacité d'inhibition du gène sélectionné par le miR-199a2. Le niveau d'expression protéique du gène sélectionné sera également mesuré par Western-blot dans des extraits d'ostéoblastes primaires issus des souris transgéniques ou dans des cellules de lignées ostéoblastiques murines (MC3T3-E1...) transfectées par le miR-199a2. Enfin, pour les gènes les plus prometteurs, l'effet de leur invalidation par utilisation de sh-ARN en transfection transitoire sur la différenciation et l'activité ostéoblastique sera évaluée.