

AVERTISSEMENT

Au fil de l'ouvrage, les termes ou les notions importantes développés dans le livre de cours *Bases cellulaires et moléculaires du développement* (Ellipses, 2007), sont notés ⁽¹⁾ ou ^(1, p.X).

Dans la partie «Exercices», certaines techniques spécifiques, définies dans la première partie du livre, sont marquées d'un astérisque *.

Dans les exercices, les stades du développement du xénope font référence à la table du développement embryonnaire de *Xenopus laevis* (Daudin) de Nieuwkoop et Faber (1967), que vous pouvez consulter sur le site web : <http://www-cbd.ups-tlse.fr/organismes/nieuwkoop/nieuwkoop.html>

AVANT PROPOS

Analyser et résoudre un problème de biologie du développement nécessite tout d'abord, une bonne maîtrise des concepts généraux de l'embryologie et des mécanismes cellulaires et moléculaires conduisant à la construction progressive de l'organisme pluricellulaire. C'est pour permettre aux étudiants d'acquérir et d'approfondir ces notions que j'ai écrit, dans un premier temps, un livre de cours intitulé *Bases cellulaires et moléculaires du développement* qui a été publié en 2007 chez Ellipses.

Il faut aussi bien connaître les méthodes de l'embryologie moléculaire et savoir les utiliser.

Pour cette raison, la première partie du présent ouvrage fait le point sur les techniques de biologie cellulaire et moléculaire couramment utilisées en embryologie moléculaire mais également les méthodes propres à cette discipline.

Dans une deuxième partie, une série de problèmes, portant sur des expérimentations tirées de la littérature scientifique moderne, est proposée. Ils couvrent des domaines variés de la biologie du développement, allant de l'implication des déterminants cytoplasmiques dans la mise en place des plans d'organisation au cours de la segmentation, aux mécanismes de l'induction dans la construction de l'embryon tridermique, jusqu'aux phénomènes de l'organogenèse.

Ils sont construits de manière à mettre l'étudiant dans une situation proche de celle de l'examen : après chaque question, l'espace destiné à la réponse est restreint, comme c'est le cas dans les cahiers-réponses utilisés dans de nombreux concours et examens, de manière à obliger l'étudiant à fournir une réponse précise et rigoureuse.

Ces problèmes sont ensuite tous corrigés et commentés pour permettre à l'étudiant de bien appréhender le raisonnement et la démarche scientifique nécessaires à la résolution de l'exercice.

L'objectif de cet ouvrage est de fournir à l'étudiant un outil lui permettant, en s'appuyant sur une démarche à la fois expérimentale et méthodologique, de vérifier l'acquisition et l'assimilation de ses connaissances en biologie du développement et de pouvoir ainsi aborder l'examen de façon plus sereine.

CC

Méthodes et techniques

de la biologie du développement

1. Etude de l'expression des gènes : Détecter les transcrits et les protéines au cours de l'ontogenèse – L'outil anticorps

1.1. La RT-PCR

La réaction de polymérase en chaîne ou PCR (pour « Polymerase Chain Reaction ») est une méthode qui permet d'amplifier de manière spécifique une petite quantité d'ADN de départ, comme l'ADN extrait d'une seule cellule par exemple, pour en donner une quantité importante. La PCR peut en effet reproduire une seule molécule d'ADN plusieurs millions de fois en quelques heures, et ceci dans un tube à essai, cad *in vitro*. L'outil qui rend possible la PCR est une ADN polymérase thermostable qui survit et peut même être active à des températures très élevées qui dénatureraient la plupart des autres enzymes. Les ADN polymérases thermostables sont isolées de bactéries telles que *Thermus aquaticus* ou *Thermococcus littoralis*, qui vivent dans des sources chaudes ou dans des sources thermales sous-marines où la température peut atteindre les 90°C.

Cette technique est utilisée pour cloner un gène donné, ou pour analyser le niveau de transcription d'un gène donné dans un organe particulier ou dans un type de cellules particulier, au cours du développement, par exemple. Elle est très utile pour détecter des ARNm présents en faible quantité. Comme la PCR ne s'effectue que sur des molécules d'ADN, les ARNm sont purifiés et de l'ADNc doit être synthétisé à l'aide d'une transcriptase inverse puis converti en ADN bicaténaire par une ADN polymérase. La PCR peut alors commencer : on parle ici de RT-PCR (Reverse Transcription-PCR).

La réaction de PCR utilise une ADN polymérase thermostable et deux courtes séquences oligonucléotidiques d'ADN que l'on nomme « amorces ». Chaque amorce est complémentaire d'une courte séquence de l'un des deux brins de l'ADN à amplifier. Un cycle de PCR est composé de trois étapes successives qui multiplient par deux le nombre de matrices d'ADN de départ. Dans la

première étape de dénaturation, l'ADN double brin est chauffé à 90°C pour séparer les deux brins. Au cours de la deuxième étape, le mélange est refroidi à une température allant de 50°C à 65°C pour permettre aux amorces de s'apparier avec leurs séquences complémentaires par l'intermédiaire de liaisons hydrogène. Dans un troisième temps, les amorces dirigent l'ADN polymérase thermostable pour copier chacun des brins matrice. Cette troisième étape s'effectue à une température qui correspond à la température optimale de l'ADN polymérase utilisée, en général 72°C. Les cycles de dénaturation des matrices, de liaison des amorces et de synthèse de l'ADN sont répétés de nombreuses fois pour donner des milliers de copies de la séquence d'ADN initiale (Fig. 1).

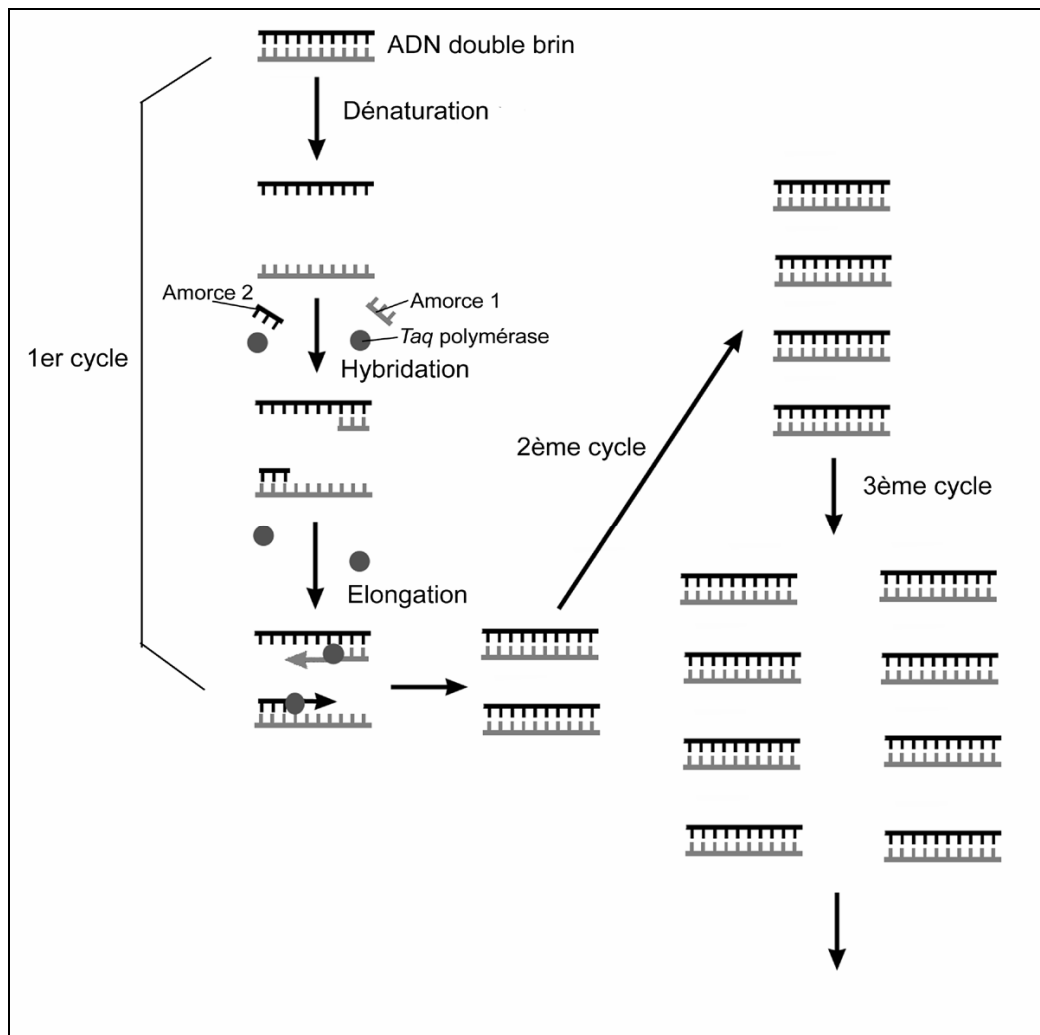


Figure 1. La technique de RT-PCR.

1.2. Les microarrays et les macroarrays

Les microarrays ou puces à ADN sont des fines lames de verre sur lesquelles sont fixés des ADN clonés. Dans les puces les plus performantes, il peut y avoir jusqu'à 10000 clones différents fixés par lame. Le principe de cette technologie est d'isoler les ARNm d'un tissu donné, et par une étape de transcription inverse, de les convertir en ADNc marqués avec un composé fluorescent. Ces ADNc fluorescents sont mis en contact avec le microarray : les ADN auxquels ils s'hybrident peuvent alors être détectés grâce au marquage fluorescent. Dans un deuxième temps, l'excès d'ADNc marqué est éliminé et les zones fluorescentes sont identifiées en utilisant un scanner spécial et un microscope. Les schémas d'hybridation mis en évidence pour un microarray particulier sont ensuite analysés grâce à des algorithmes informatiques. Cette technologie est extrêmement puissante pour identifier les gènes exprimés dans un état cellulaire donné. On peut l'utiliser pour comparer deux états cellulaires distincts : pour comparer les gènes exprimés à deux stades distincts, par exemple, ou pour analyser les gènes exprimés dans deux régions différentes d'un même embryon. Pour cela, les ARNm d'un groupe de cellules A et ceux d'un groupe de cellules B sont extraits et soumis à une transcription inverse de manière à obtenir des ADNc des cellules A marqués par un fluorochrome vert, la fluorescéine, et ceux des cellules B marqués par un fluorochrome rouge, la rhodamine. Ces ADNc sont mélangés en quantités égales, déposés sur la puce à ADN et hybridés (*Fig. 2*). Un logiciel interprète l'intensité de fluorescence de chaque point de la lame contenant un ADN monocaténaire fixé et en déduit une mesure numérique de l'expression de chaque gène. Les gènes exprimés fortement dans les cellules A présentent une fluorescence verte importante (il y a beaucoup d'ADNc marqués) et ceux fortement exprimés dans les cellules B, une fluorescence rouge. Les gènes fortement exprimés dans les cellules A comme dans les cellules B apparaissent en jaune et ceux peu exprimés ne sont pas fluorescents.

Le macroarray est une technique plus simple d'utilisation que les puces à ADN, puisqu'elle ne nécessite pas d'analyse au microscope, mais qui entraîne une analyse moins exhaustive de l'expression génique. Ici, un nombre plus

limité de clones d'ADN (environ 2500) est fixé sur une membrane de nylon classique : les ADNc mis en contact avec le macroarray sont marqués par un isotope radioactif. L'hybridation est ensuite mise en évidence par une autoradiographie classique.

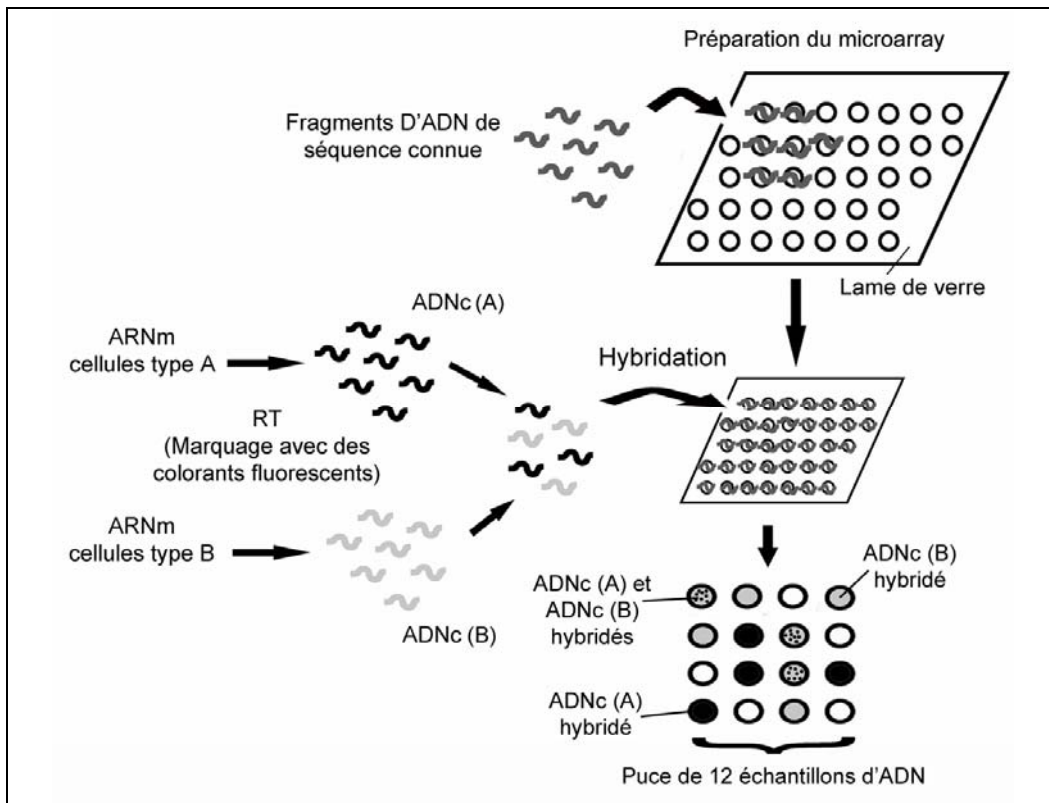


Figure 2. La technique de microarray. Voir le texte.

1.3. Le transfert Northern (Northern blot)

Cette technique permet de déterminer la taille d'un ARNm et d'étudier son profil d'expression. Les ARNm sont extraits à partir d'embryons à différents stades du développement avant d'être dénaturés par chauffage, pour éliminer toutes les régions double brin, et soumis, côte à côte, à une électrophorèse en gel d'agarose dénaturant.

Les ARNm séparés sont ensuite transférés par capillarité à une membrane de nylon (ou de nitrocellulose). La membrane est alors incubée avec une sonde ADNc simple brin ou avec une sonde ARN antisens radioactive. L'hybridation se fait entre la sonde marquée et l'ARNm qui lui est complémentaire.

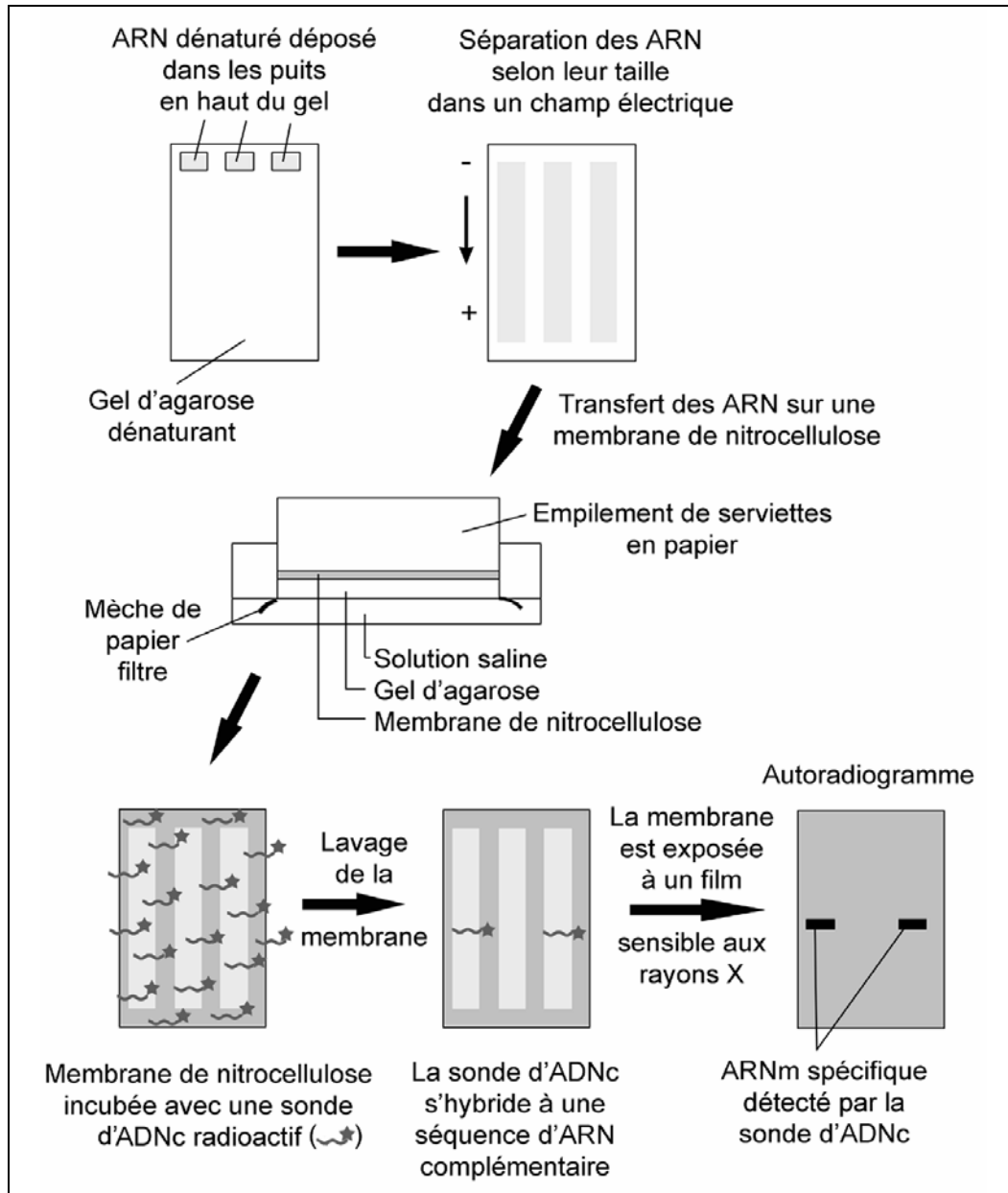


Figure 3. La technique de Northern blot.

La sonde en excès est ensuite éliminée par des lavages successifs et la membrane de nylon exposée à un film sensible aux rayons X. Comme l'ARNm est hybridé à la sonde radioactive, il peut être visualisé par autoradiographie. Par analogie avec le transfert Southern (baptisée du nom de son inventeur, le biologiste britannique Edwin Southern), utilisé pour détecter des fragments

d'ADN spécifiques, cette technique est appelée transfert Northern (Northern blot) (*Fig. 3*).

1.4. L'hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* est une technique qui permet d'étudier la localisation spatiale et temporelle d'un ARNm spécifique au cours du développement. Cette technique peut être réalisée sur une coupe histologique ou sur l'embryon entier, ce qui peut alors fournir des informations sur la localisation du transcrit dans l'embryon sans avoir à réaliser de coupes histologiques.

Il faut synthétiser un ARN antisens, c'est-à-dire un ARN dont la séquence est complémentaire de celle de l'ARNm que l'on veut détecter. Pour ceci, on utilise un ADNc cloné dans un vecteur d'expression qui contient des séquences promotrices auxquelles une ARN polymérase peut se fixer pour copier le brin approprié de l'ADNc en ARN antisens ou en ARN sens (*Fig. 4*). Ce dernier sera utilisé comme témoin négatif puisqu'il ne peut pas s'hybrider avec l'ARNm. L'ARN synthétisé est marqué grâce à un nucléotide radioactif, généralement de l'uridine-S35, ou grâce à un nucléotide modifié qui, par la suite, sera détecté en utilisant un anticorps et une réaction colorée.

L'ARN antisens est alors déposé sur une coupe histologique préparée pour la microscopie photonique et fixée à une lame de verre. L'ARN antisens s'hybridera avec son ARNm complémentaire. L'excès d'ARN antisens est ensuite éliminé par des lavages successifs de la lame histologique, de manière à ne laisser que la sonde hybridée.

Si la sonde était marquée par un isotope radioactif, la lame histologique est recouverte d'une émulsion photographique transparente après développement, permettant l'autoradiographie. Les grains d'argent sensibilisés par les électrons se trouvent au dessus des endroits où l'ARN antisens s'est hybridé : Ils apparaissent noirs en lumière normale ou blancs par illumination en fond noir. On peut ainsi visualiser des cellules, ou même, des régions cellulaires, qui expriment un ARNm particulier. La figure 5 montre le résultat de l'hybridation *in situ* obtenu en utilisant un ARN antisens préparé à partir d'un ADNc spécifique des cellules musculaires adultes de xénope.

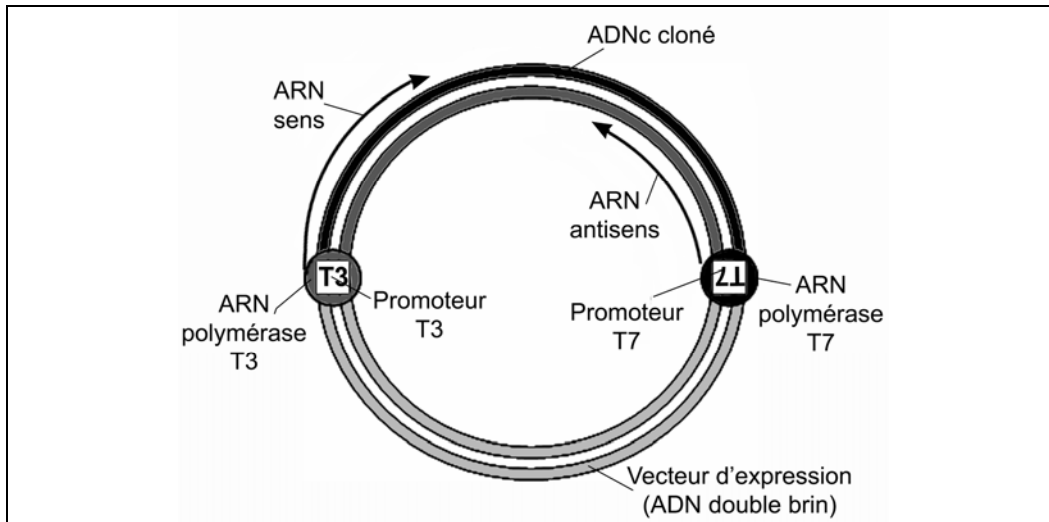


Figure 4. Exemple de vecteur d'expression. L'ADNc d'intérêt est cloné dans ce vecteur ADN double brin qui contient des séquences promotrices (ici, T3 et T7) auxquelles une ARN polymérase spécifique (ici, T3 ou T7) peut se fixer pour copier le brin approprié de l'ADNc en ARN antisens ou en ARN sens. La synthèse du brin sens ou antisens dépend du sens de clonage de l'ADNc dans le vecteur d'expression. Dans l'exemple présenté, l'ARN sens, est synthétisé à partir du promoteur T3 alors que l'ARN antisens est synthétisé par l'ARN polymérase T7.

Au stade larvaire analysé, l'ARN antisens (et donc, l'ARNm) se localise uniquement dans une petite population de fibres musculaires située dans la région dorsale (Fig. 5).

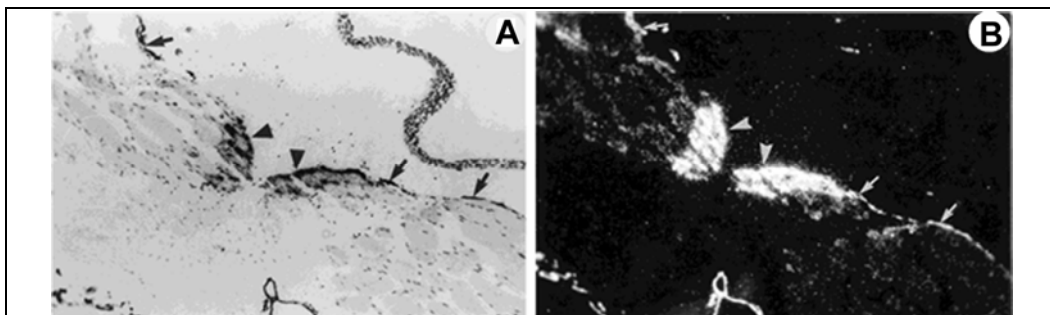


Figure 5. Coupe transversale de larve de xénope (au niveau de la région dorsale) analysée par hybridation *in situ* pour l'expression d'une chaîne lourde de la myosine adulte. (A) : fond clair. (B) : fond noir. Les pointes de flèches indiquent le marquage. Les flèches montrent un marquage parasite, non spécifique.

Dans le cas d'une hybridation *in situ* sur embryon entier, on préfère utiliser une réaction colorée à l'emploi d'isotope radioactif. L'ARN antisens est marqué en utilisant un nucléotide modifié : on utilise souvent de l'uridine

conjuguée à la digoxigénine. La digoxigénine est un composé synthétisé par certaines plantes, qui n'est pas retrouvé dans les cellules animales. L'ARN antisens marqué à la digoxigénine est incubé avec l'embryon pendant plusieurs heures puis l'excès de sonde marquée est ensuite éliminé par des lavages successifs de manière à ne laisser que la sonde hybridée avec l'ARNm. L'embryon est ensuite incubé avec un anticorps dirigé contre la digoxigénine. Cet anticorps est associé de manière covalente à un enzyme, comme la phosphatase alcaline, par exemple.

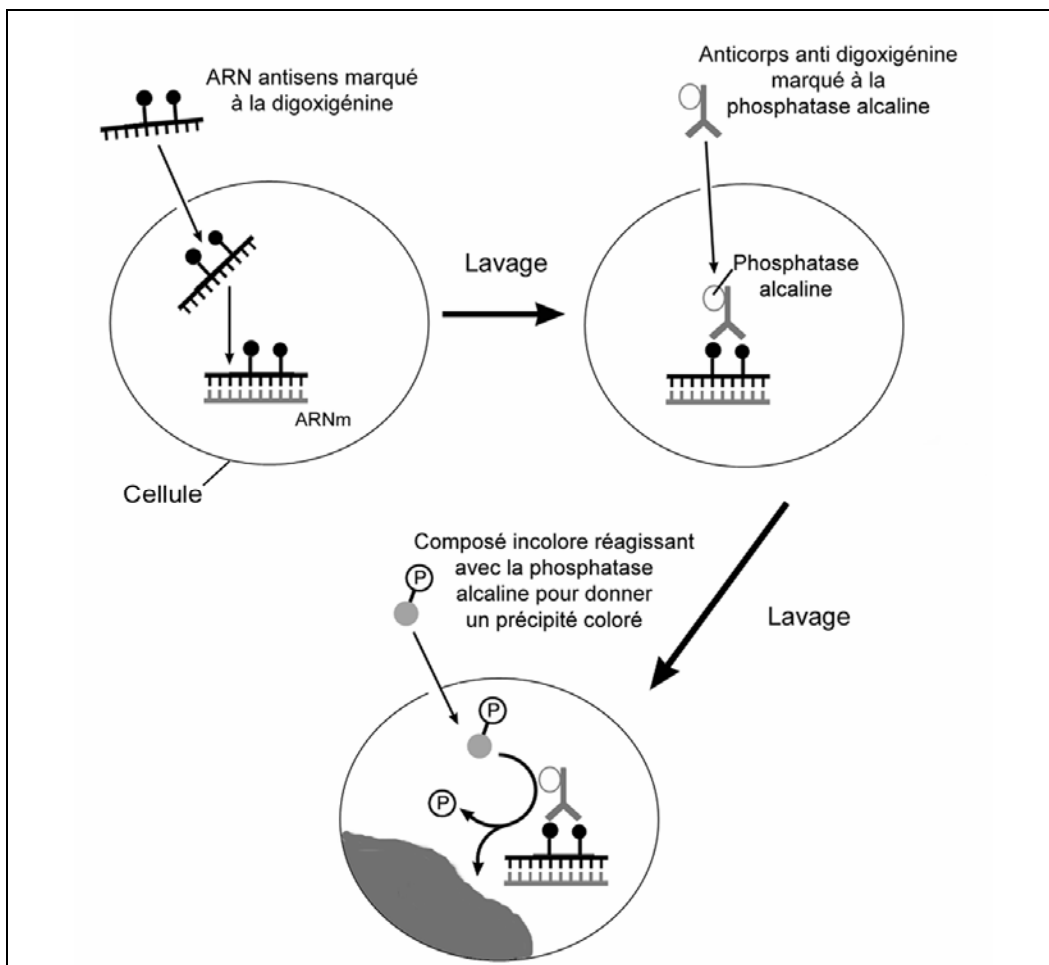


Figure 6. Hybridation *in situ* sur embryon entier : l'ARN antisens est marqué en utilisant de l'uridine conjuguée à la digoxigénine.

Après plusieurs lavages dont le but est d'éliminer l'excès d'anticorps qui ne s'est pas lié à la digoxigénine, l'embryon est incubé dans une solution qui va

réagir avec la phosphatase alcaline pour donner un précipité coloré (*Fig. 6*). Dans la figure 7, le marquage foncé dû à l'action de la phosphatase alcaline met en évidence la présence d'un ARNm spécifique codant pour un facteur de transcription spécifique du muscle.

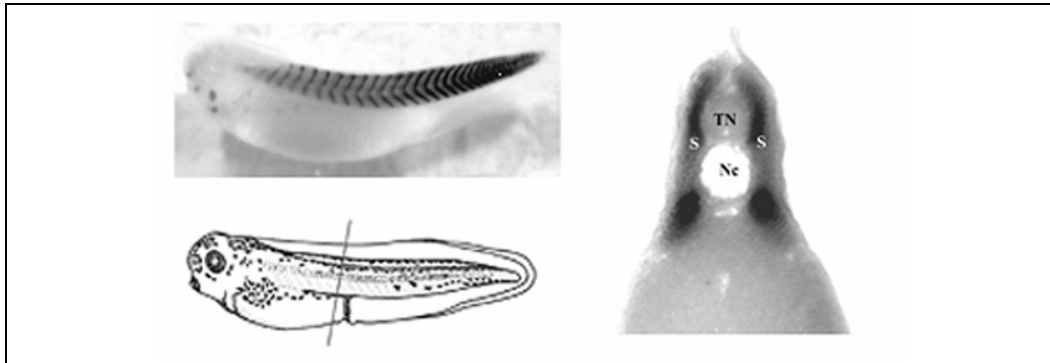


Figure 7. Hybridation *in situ* sur embryon entier montrant la localisation d'un ARNm codant un facteur de transcription musculaire. La coupe histologique de l'embryon (droite) confirme bien le marquage somitique. (TN) : tube neural, (Nc) : notochorde, (S) : somite.

1.5. Le transfert Western (Western blot) et l'immunohistochimie

Il permet de détecter une protéine spécifique dans un mélange complexe comme un homogénat tissulaire et d'analyser son niveau d'accumulation dans différents tissus ou au cours du développement. Les protéines, préalablement dénaturées, sont séparées en fonction de leur masse sur un gel de polyacrylamide puis transférées du gel sur une membrane, classiquement de nitrocellulose. La membrane est ensuite incubée avec un anticorps primaire spécifique de la protéine recherchée après avoir bloqué les sites d'interactions non spécifiques entre les protéines de l'échantillon fixées à la membrane et les anticorps. Cette étape est réalisée en plongeant, pendant une heure environ, la membrane dans une solution diluée de protéines, généralement de l'albumine de sérum bovin (BSA) ou du lait sans matière grasse. Après rinçage de la membrane pour enlever les anticorps primaires non liés à la protéine d'intérêt, celle-ci est incubée avec un autre anticorps dirigé contre l'anticorps primaire. Cet anticorps « anti-anticorps », communément appelé anticorps secondaire, est généralement lié à la biotine ou à une enzyme, comme la phosphatase alcaline ou la peroxydase de raifort, qui permet la

détection des complexes antigène-anticorps. Comme plusieurs anticorps secondaires se lient à un même anticorps primaire, le signal est renforcé.

L'outil anticorps peut également être utilisé pour détecter *in situ*, sur coupe histologique ou sur embryon entier, une protéine d'intérêt. On parle d'immunohistologie si l'étude est menée au niveau du tissu, ou d'immunocytologie si elle est menée au niveau de la cellule. Comme précédemment, on incube, cette fois, une coupe histologique avec un anticorps primaire qui reconnaît spécifiquement la protéine (l'antigène) d'intérêt. Dans un deuxième temps, le complexe antigène-anticorps est détecté grâce à un anticorps secondaire lié à une enzyme ou à un fluorochrome (fluorescéine ou rhodamine) et dirigé contre l'anticorps primaire. Dans ce dernier cas, on parle de la technique d'immunofluorescence indirecte (Fig. 8). C'est une technique complémentaire de l'hybridation *in situ*, qui permet de visualiser l'accumulation spatiale et temporelle du produit final de l'expression d'un gène : la protéine au cours de l'ontogenèse.

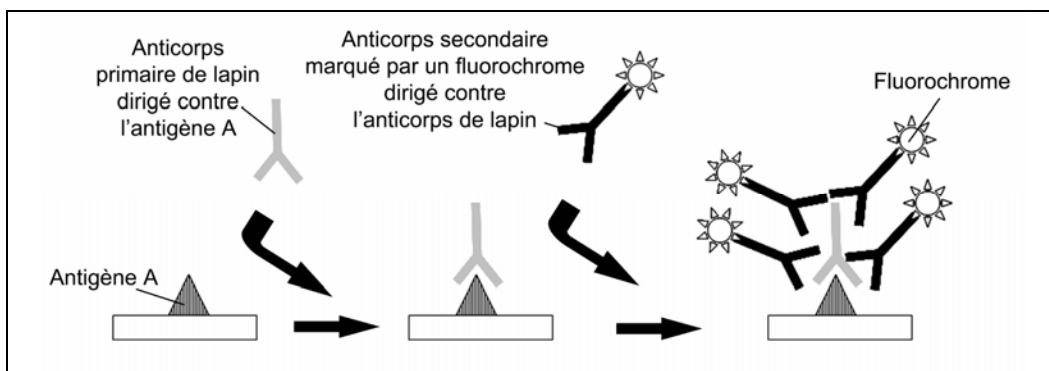


Figure 8. La technique d'immunofluorescence indirecte.

1.6. L'immunoprécipitation

L'immunoprécipitation permet d'extraire une protéine d'une solution en utilisant un anticorps spécifique de cette protéine, qui entraînera sa précipitation (Fig. 9). Dans la pratique, on ajoute à une solution contenant un mélange de protéines, un anticorps qui reconnaît spécifiquement la protéine d'intérêt : le complexe antigène (la protéine d'intérêt)-anticorps est ensuite précipité, par ajout dans la solution, de protéines se fixant aux anticorps,

comme la protéine A ou la protéine G, associées à des billes d'agarose. Après centrifugation, un culot contenant le complexe immunoprécipité peut être récupéré et la protéine d'intérêt analysée par électrophorèse et Western blot.

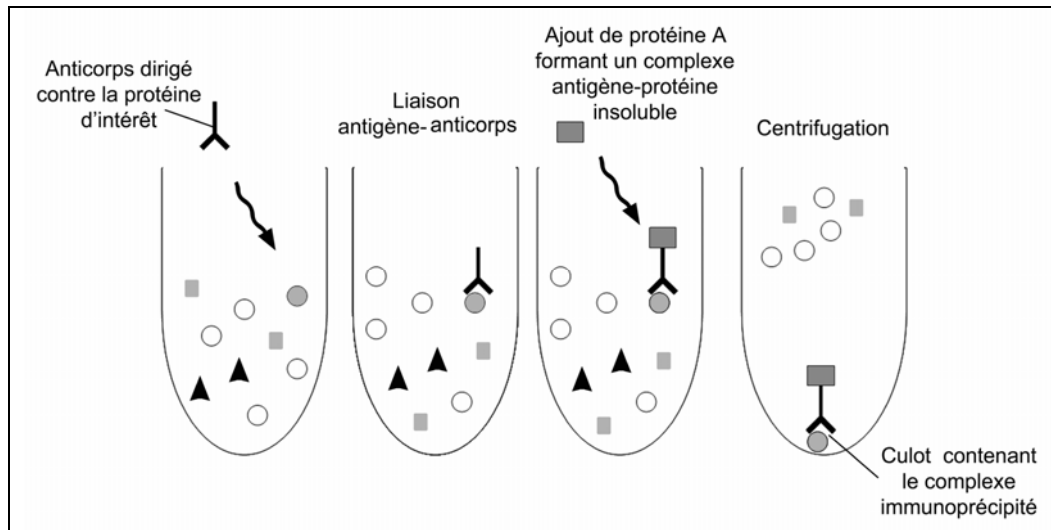


Figure 9. La technique d'immunoprécipitation.

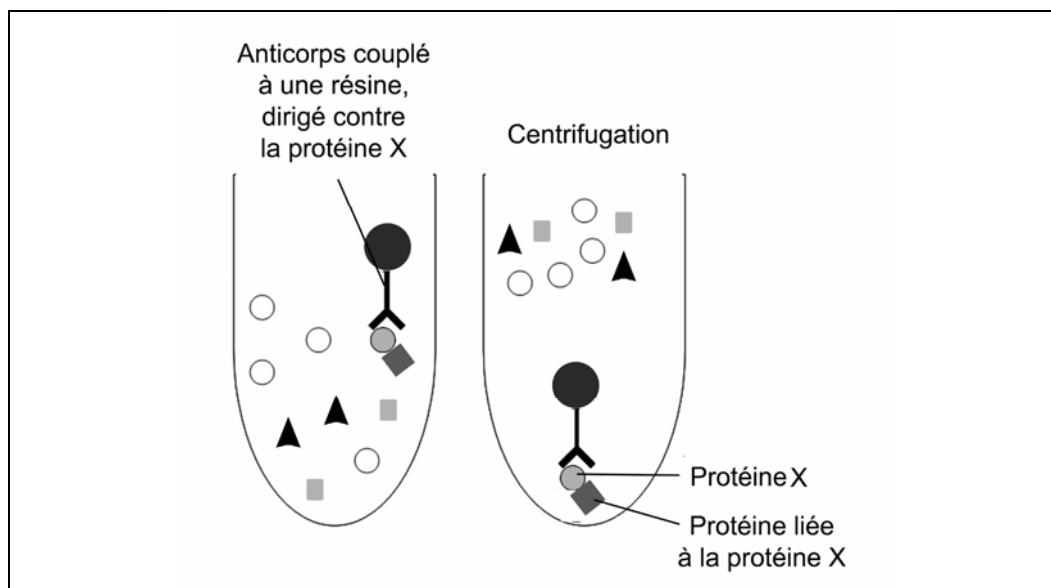


Figure 10. La technique de co-immunoprécipitation.

La co-immunoprécipitation (également nommée « pull down ») est une méthode classique pour étudier les interactions protéine-protéine : le principe repose sur le fait que lors de l'immunoprécipitation d'une protéine d'intérêt avec un anticorps spécifique, les protéines qui sont associées à la protéine

d'intérêt par des interactions protéine-protéine sont également précipitées (Fig. 10). Le complexe immunoprécipité est ensuite soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide et les protéines partenaires de notre protéine d'intérêt peuvent alors être identifiées par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques.

1.7. L'immunoprécipitation de la chromatine

L'immunoprécipitation de la chromatine, appelée également « ChIP » (pour « Chromatin ImmunoPrecipitation ») est une technique qui permet d'identifier les sites de liaison d'un facteur de transcription sur l'ADN *in situ*.

Le ChIP consiste à purifier des complexes ADN-protéines liés après un traitement par du formaldéhyde (Fig. 11).

Après fixation de la chromatine (de l'ADN et des protéines qui lui sont associées) par un traitement au formaldéhyde, l'ADN est clivé en fragments de 500 à 1000 paires de bases par sonication. La protéine d'intérêt, un facteur de transcription par exemple, est ensuite immunoprécipitée et l'ADN auquel elle était liée est récupéré, purifié et amplifié par PCR avec des amorces choisies, complémentaires des régions promotrices d'intérêt.

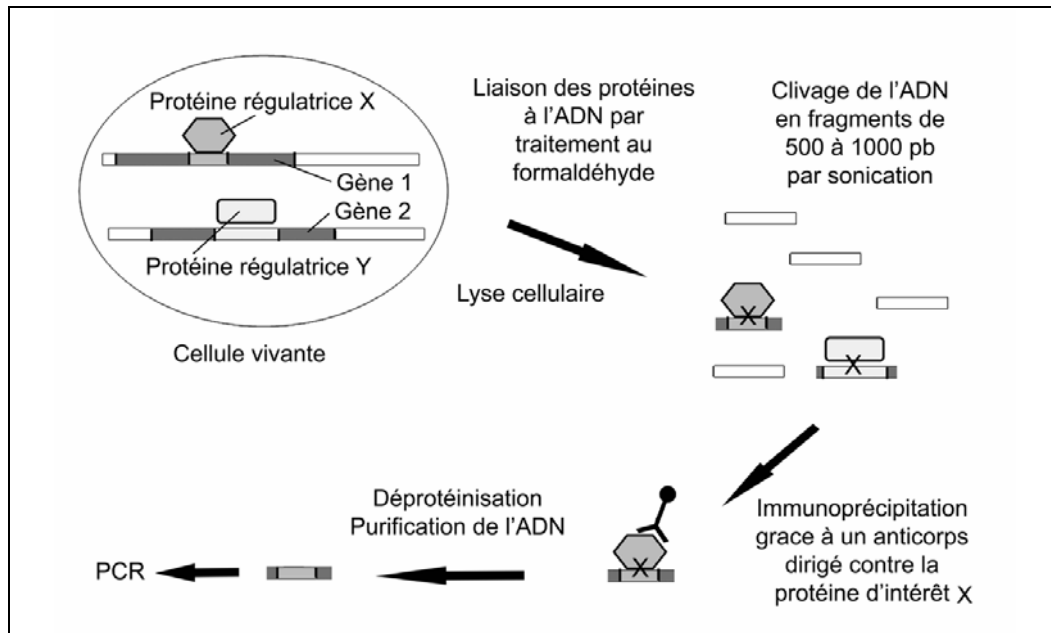


Figure 11. L'immunoprécipitation de la chromatine.

Par cette méthode, on peut identifier et purifier les séquences régulatrices de la molécule d'ADN sur lesquelles est lié un facteur de transcription donné (ou les co-régulateurs qui leur sont associés). Après la purification des complexes ADN-protéines, les séquences nucléotidiques peuvent être clonées, séquencées et analysées. Avec cette technique, il est donc possible de déterminer les séquences nucléotidiques consensus susceptibles de recruter un facteur de transcription donné.

2. Etude de la fonction des gènes au cours du développement : Les techniques de perte et de gain de fonction

2.1. Les souris transgéniques

Un animal transgénique est un animal comportant un (ou des) gène(s) stable(s) provenant d'autres individus. Plusieurs méthodes existent pour engendrer ces animaux transgéniques. Ils peuvent être produits par introduction d'un gène étranger cloné, le transgène, par microinjection, dans le noyau d'un œuf fécondé. La taille importante des pronuclei haploïdes du spermatozoïde et de l'œuf favorise cette méthode directe. L'œuf est ensuite implanté dans une mère porteuse pseudogestante et la descendance est testée pour déterminer si elle contient le gène étranger. Une deuxième technique fait appel aux cellules souches embryonnaires (*Fig. 12*). Le blastocyste de souris est composé de deux formations cellulaires distinctes. Des cellules externes constituent le trophoblaste qui donnera la partie fœtale du placenta, et des cellules internes qui donneront le bouton embryonnaire à l'origine de l'embryon lui-même. Ces cellules internes sont appelées cellules souches embryonnaires car chacune d'entre elles peut donner naissance à toutes les cellules de l'embryon : elles sont totipotentes. Ces cellules peuvent être isolées à partir de blastocyste de souris et mises en culture avant que leur soit incorporé un gène cloné par électroporation par exemple. Les cellules souches qui ont incorporé le transgène sont ensuite implantées dans un autre blastocyste de souris dans lequel elles vont s'intégrer.