

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 litoralis*, 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).

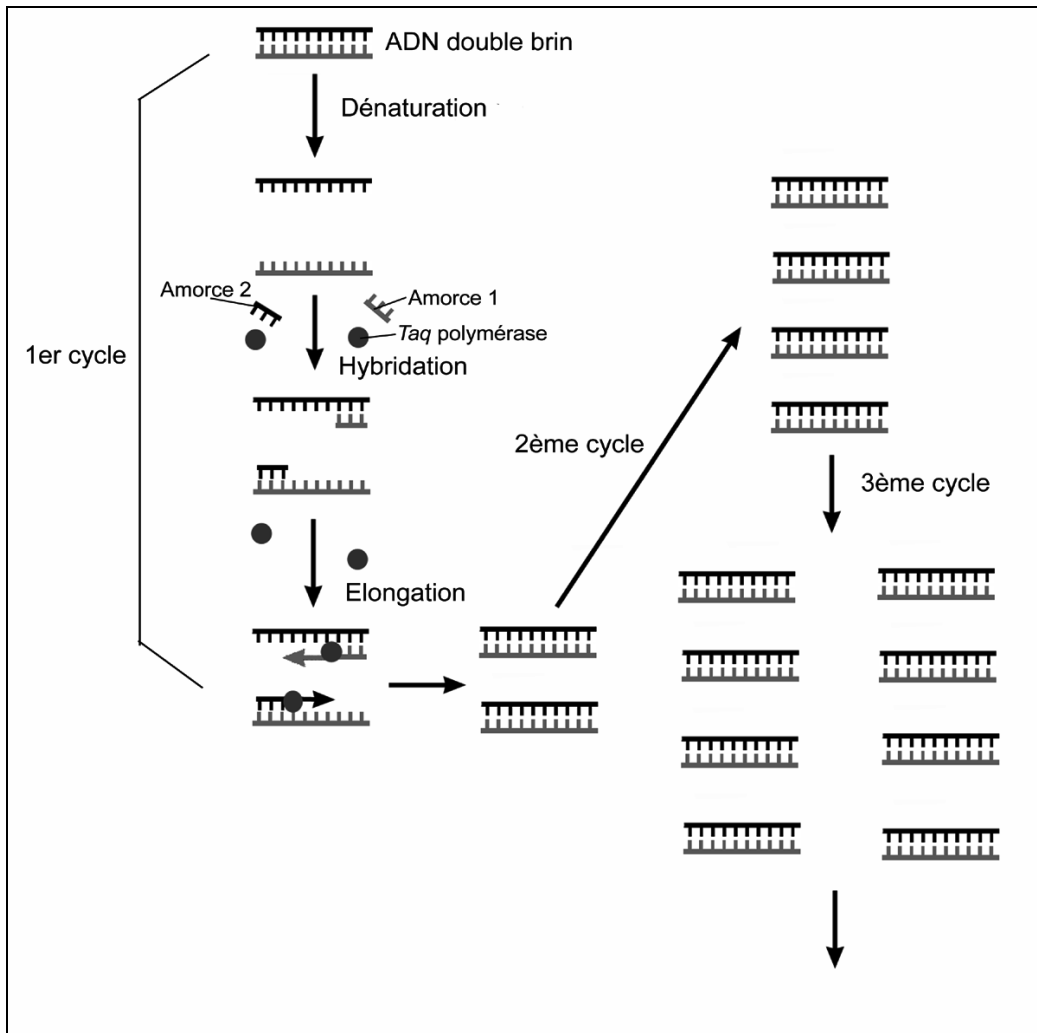


Figure 1. La technique de RT-PCR.

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) sont fixés 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.

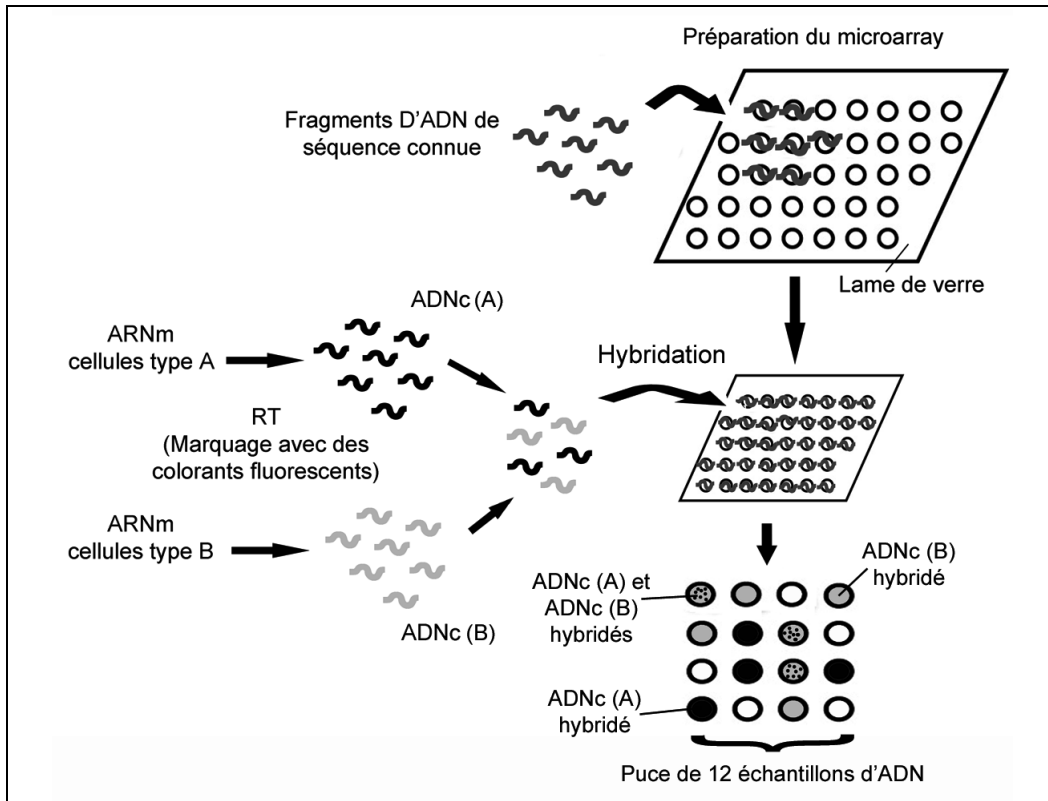


Figure 2. La technique de microarray. Voir le texte.

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.

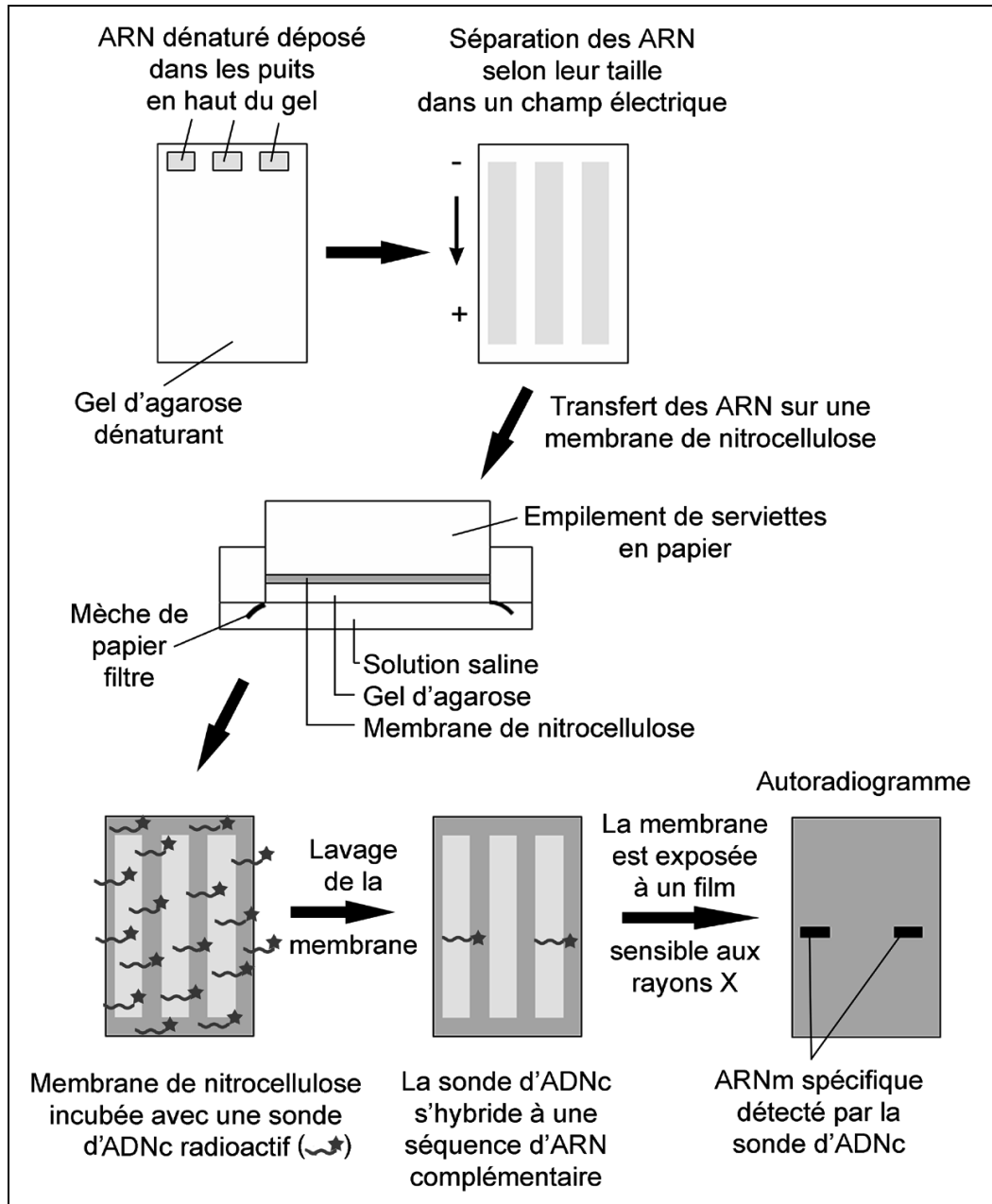


Figure 3. La technique de Northern blot.

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.

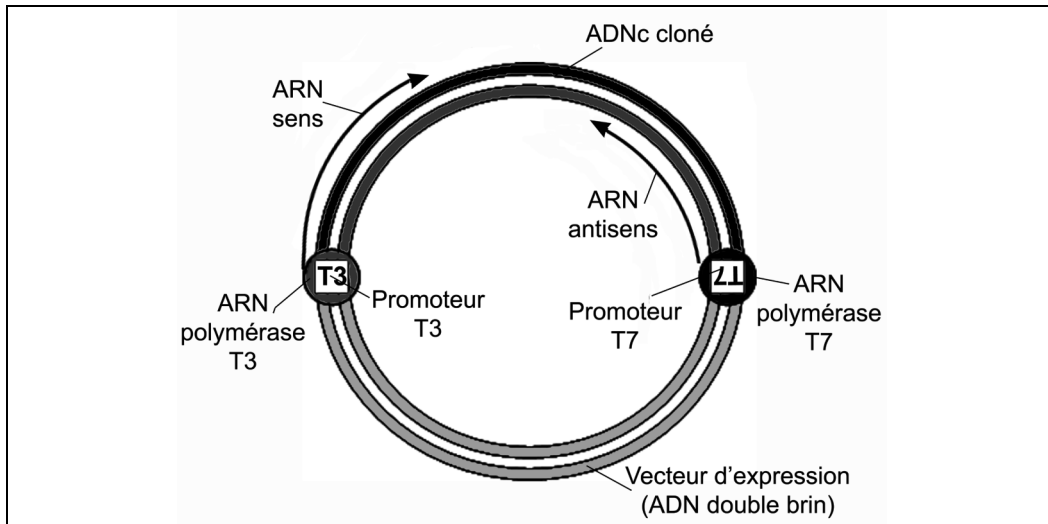


Figure 4. Exemple de vecteur d'expression. L'ADNc d'intérêt est cloné dans ce vecteur ADN double brin qui contient des séquences promotrices (ici, T3 et T7) auxquelles une ARN polymérase spécifique (ici, T3 ou T7) peut se fixer pour copier le brin approprié de l'ADNc en ARN antisens ou en ARN sens. La 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.

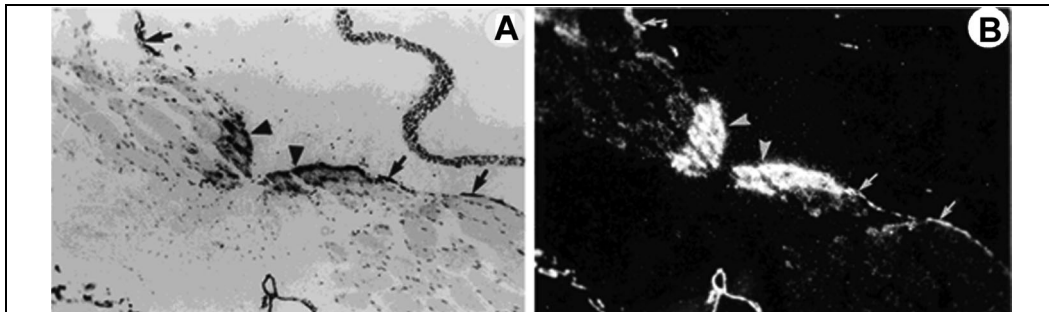


Figure 5. Coupe transversale de larve de xénope (au niveau de la région dorsale) analysée par hybridation *in situ* pour l'expression d'une chaîne lourde de la myosine adulte. (A) : fond clair. (B) : fond noir. Les pointes de flèches indiquent le marquage. Les pointes de flèches montrent un marquage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

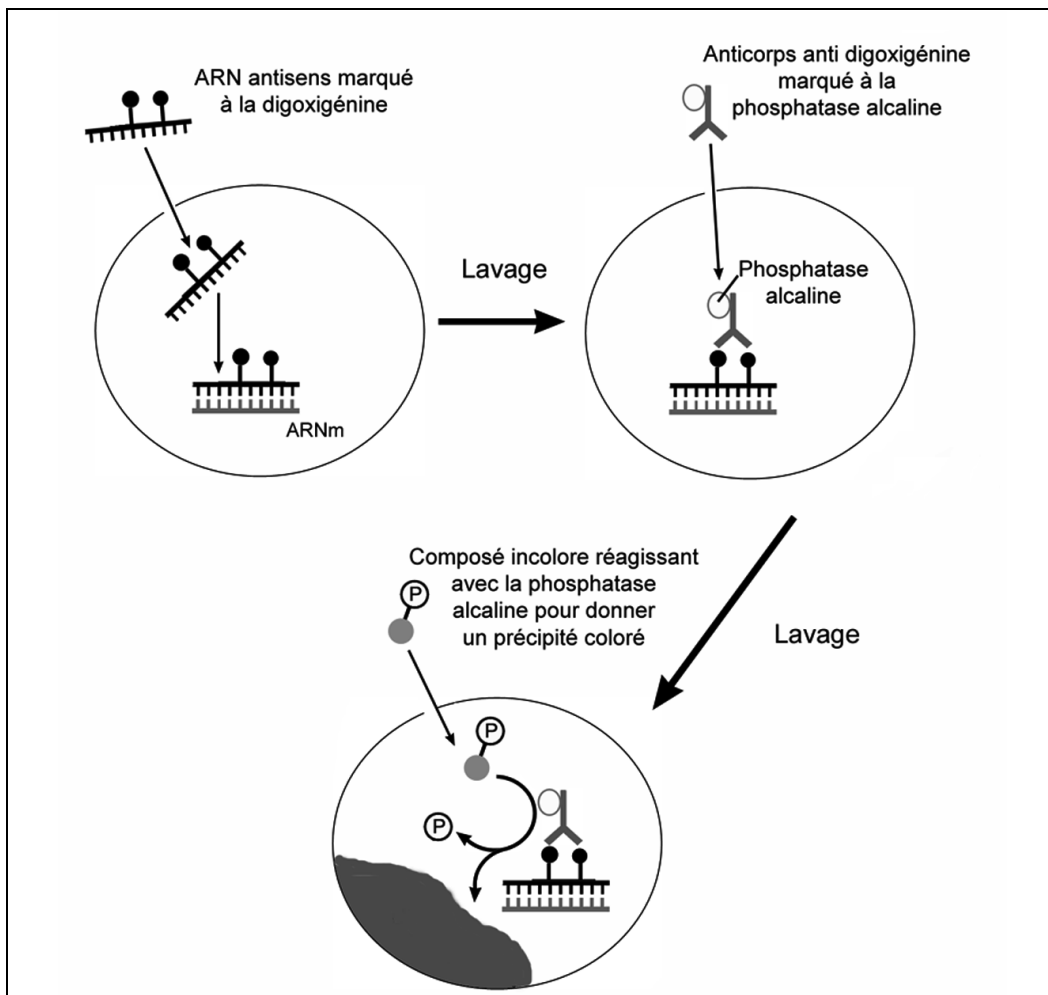


Figure 6. Hybridation *in situ* sur embryon entier : l'ARN antisens est marqué en utilisant de l'uridine conjuguée à la digoxigénine.

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