

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 de PACES, comme aux étudiants en 1^{er} et 2^{ème} cycle de sciences de la vie, 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 », publié en 2007 chez Ellipses et dont une troisième édition revue et augmentée, vous est maintenant proposée.

J'ai ensuite écrit, en 2009, un livre d'exercices intitulé « Bases cellulaires et moléculaires du développement - Méthodes et exercices », dont une quatrième édition, revue et augmentée vous est proposée ici.

Il faut, en effet, 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 cellulaire et moléculaire mais également sur les méthodes propres à cette discipline.

Dans la deuxième partie de cette quatrième édition, une série de problèmes, dont beaucoup sont originaux, 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.

La mise en place de la première année commune aux études de santé (PACES) avait déjà justifié un tel ouvrage puisqu'elle entraînait, dans les

universités où le PCEM1 avait une forte dominante scientifique, une réduction du nombre d'heures de cours et de travaux dirigés dans les matières scientifiques, amenant au final, à une baisse du niveau de formation scientifique initiale. La nouvelle réforme des études de santé qui se met en place, avec, maintenant, une réduction drastique des heures d'enseignements scientifiques ne peut que conforter la nécessité de cet ouvrage dont l'objectif est de former les étudiants à une démarche scientifique et expérimentale.

Les exercices sont construits de manière à mettre l'étudiant dans une situation proche de celle de l'examen : Ils sont présentés sous forme de QCM, comme se présente le concours de PASS/LAS, et sous forme de questions à caractère rédactionnel, encore utilisées dans de nombreux examens des filières scientifiques. Pour un «entraînement» efficace, j'encourage l'étudiant en PACES à résoudre, dans un premier temps, l'exercice en répondant aux questions à caractère rédactionnel et seulement dans un deuxième temps, à répondre aux QCM.

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.

De plus, au fil du texte, des QCM « Bonus » sont l'occasion d'effectuer de petits rappels de cours.

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. Les techniques de microscopie

Le microscope est un outil couramment utilisé par le biologiste du développement. Le microscope optique (photonique) est utilisé en routine pour analyser : l'organisation générale des tissus embryonnaires, l'accumulation spatio-temporelle d'une protéine sur une coupe histologique en utilisant des techniques d'immunofluorescence ou l'accumulation d'un transcrit par hybridation *in situ*. Le microscope électronique qui permet d'obtenir des grossissements beaucoup plus importants que le microscope optique, est utilisé pour analyser l'ultrastructure de la cellule embryonnaire.

1.1. La microscopie photonique

Le microscope photonique utilise une source lumineuse (S) qui envoie des rayons lumineux sur une première lentille (L1) appelée condenseur, qui concentre les rayons lumineux sur l'objet (O). Une seconde lentille (L2), l'objectif, donne de l'objet (O) une image agrandie (I1). Une troisième lentille (L3), l'oculaire, reprend une fraction de l'image (I1) et l'agrandit une nouvelle fois en une image (I2), qui est l'image reçue par l'observateur (*Fig. 1*).

Les meilleurs microscopes photoniques sont limités à un grossissement de 2000 à 2500 fois. Le grossissement dépend du pouvoir séparateur de l'instrument qui est fonction de la source lumineuse utilisée. Celle-ci émet des « grains » de lumière, les photons, associés à des longueurs d'onde dont la longueur varie pour la lumière naturelle de 0,0004 mm (violet) à 0,0008 mm (rouge). Avec les meilleurs dispositifs optiques, le pouvoir séparateur, c'est-à-dire la plus petite distance qui sépare deux points très voisins d'un objet dont les images sont distinctement séparables est de 0,2 μm . La taille moyenne d'une cellule de mammifère étant de 0,01 mm (et le pouvoir séparateur de l'œil humain étant de 0,2 mm), le microscope photonique est l'instrument incontournable de l'histologie, qui étudie l'organisation générale des tissus et des cellules.

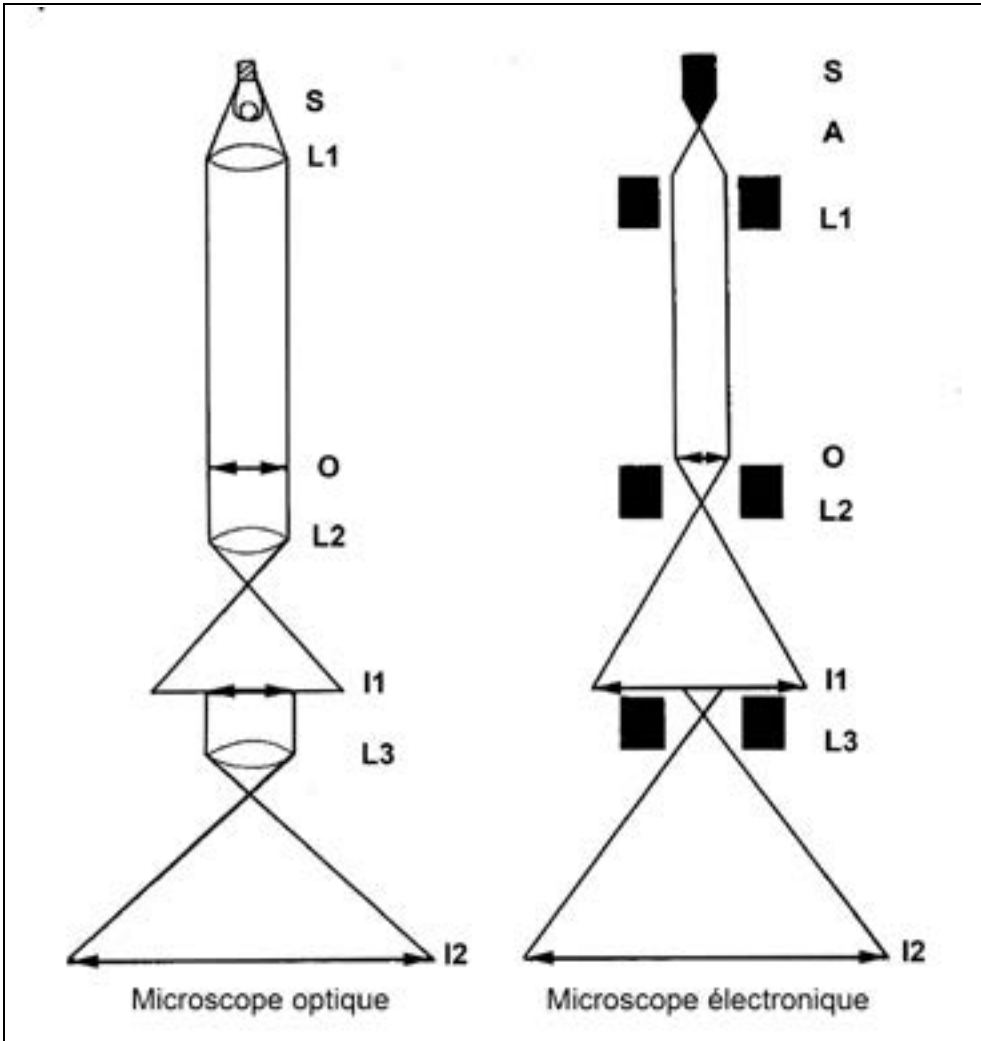


Figure 1. Principe du microscope optique et du microscope électronique (cf. texte).

Différents type de microscopes photoniques peuvent être utilisés :

- Le microscope à fond clair : c'est l'appareil le plus courant. Il est utilisé pour observer des objets transparents, colorés ou non, soit en lumière naturelle, soit en lumière ultraviolette.
- Le microscope à fond noir : il peut être utilisé pour l'étude morphologique de la cellule vivante ou l'analyse de coupes d'hybridation *in situ* utilisant une sonde marquée par un isotope radioactif (S^{35} ou P^{33}). Il permet de

mettre en évidence les structures cellulaires/particules qui diffractent la lumière, se révélant ainsi par une scintillation lumineuse sur le fond noir.

- Le microscope à fluorescence : l'objet est examiné en lumière ultraviolette. Cet instrument permet de localiser certains composés fluorescents qui émettent une lumière dont la longueur d'onde est plus grande que la longueur d'onde de la lumière qui les éclaire. Cette technique permet de suivre le devenir/ la localisation dans la cellule de corps d'origine exogène (des anticorps, par exemple), rendus fluorescents et associés à des constituants cellulaires.
- Le microscope à contraste de phase : il est très utilisé pour l'observation de cellules vivantes non colorées. Ce microscope permet, grâce à l'emploi d'artifices physiques, de percevoir au sein de l'objet transparent, de faibles différences d'épaisseur ou d'indice de réfraction, qu'il amplifie.
- Le microscope confocal : c'est un microscope optique qui a la propriété de réaliser des images de très faible profondeur de champ (environ 400 nm) appelées « sections optiques ». En positionnant le plan focal de l'objectif à différents niveaux de profondeur dans l'échantillon, il est possible de réaliser des séries d'images à partir desquelles on peut obtenir une représentation tridimensionnelle de l'objet. L'objet n'est pas directement observé par l'utilisateur qui analyse une image recomposée par ordinateur. Le microscope confocal fonctionne en lumière réfléchie ou en fluorescence. La plupart du temps, on utilise un laser comme source de lumière. On parle alors de microscope confocal à balayage laser

1.1.1. Préparation et analyse des échantillons

En microscopie photonique, il est possible d'observer des cellules vivantes, qu'il s'agisse de cellules isolées ou de couches minces de cellules (frottis, cultures). Les cellules sont le plus souvent placées entre lame et lamelle, dans une goutte de liquide physiologique, ou encore en chambres humides. Pour les cellules en culture, elles peuvent être directement observées dans la boîte de culture en utilisant un microscope inversé. Ces cellules peuvent être

colorées par des colorants vitaux pour mieux visualiser les structures cellulaires.

Le plus souvent, on examine des cellules qui ont été au préalable tuées et colorées. Il peut s'agir de cellules isolées ou encore de coupes minces réalisées dans un tissu. La première étape de la préparation, préalable à l'observation d'une coupe histologique en microscopie photonique est une fixation de l'échantillon de tissu qui fera l'objet de l'étude. Les agents fixateurs sont des solutions alcooliques ou formolées, qui dénaturent en particulier les protéines et les acides nucléiques.

Le formol, par exemple, permet la réalisation de pontage (liaisons covalentes) entre les groupes aminés de molécules voisines. Ces pontages stabilisent les interactions protéines-protéines, formant des complexes insolubles dans l'eau ou les solvants organiques.

Après fixation, l'échantillon subit une déshydratation obtenue par immersions successives dans des solutions alcooliques de concentration croissante jusqu'à ce que toute l'eau qu'il renferme soit remplacée par de l'alcool. Ce dernier est ensuite remplacé par du toluène ou du xylène, des solvants organiques, miscible à la fois avec l'alcool et avec la paraffine. L'échantillon est alors plongé dans la paraffine fondue, qui l'imprègne et remplace le toluène : c'est l'inclusion. Elle a pour but de durcir le matériel dans lequel on veut réaliser des coupes. Une fois durci, le bloc d'inclusion est placé sur un microtome, appareil dont le rasoir peut débiter des tranches fines dont l'épaisseur varie généralement de 5 à 10 μm . Ces coupes sont récupérées et collées sur une lame de verre, déparaffinée par immersions dans des bains de toluène (ou de xylène) puis réhydratées grâce à des passages dans des solutions alcooliques de concentration décroissantes jusqu'à l'eau avant d'être colorées par des colorants aqueux. Il faut ensuite procéder à une déshydratation, opération inverse à la précédente avant de pouvoir faire un montage dans une résine. A la sortie du solvant, une goutte de résine de montage (Eukit, par exemple) est déposée sur la coupe et une lamelle est appliquée de façon à ce que la résine recouvre l'ensemble de la coupe. Après polymérisation de la résine, la coupe histologique est prête pour l'observation.

Dans des cas particuliers, lorsque l'on souhaite mettre en évidence une activité enzymatique ou utiliser un anticorps ne fonctionnant pas sur coupe paraffinée, par exemple, il est nécessaire d'utiliser une autre technique : l'échantillon de tissu est alors durci par congélation (par immersion dans de l'isopentane refroidit dans l'azote liquide (-196°C)) avant d'être coupé grâce à un cryomicrotome permettant de réaliser des coupes histologiques d'une épaisseur moyenne de 7 μm .

1.2. Le microscope électronique

Le microscope électronique est l'outil du cytologiste qui étudie l'ultrastructure cellulaire et l'organisation des organites cellulaires. Son pouvoir séparateur est voisin de 4 \AA et il permet des grossissements utiles allant jusqu'à 100 000 mais qui peuvent atteindre un million ou plus pour certains appareils.

Le microscope électronique utilise une source électronique. Les électrons sont des particules élémentaires chargées négativement associées à des ondes qui peuvent être jusqu'à 100 000 fois plus petites que celles de la lumière. On peut orienter leur trajectoire en les soumettant à un champ électrique ou magnétique.

Le principe de fonctionnement du microscope électronique est tout à fait comparable à celui du microscope photonique. La source (S) est une cathode qui émet un flux d'électrons. Ceux-ci sont accélérés par l'application d'une différence de potentiel entre la cathode (S) et l'anode (A). L'anode (A) est percée en son centre et les électrons la traversent. Leur flux est concentré sur l'objet (O) par une première lentille magnétique (L1) qui sert de condensateur. Les électrons traversent l'objet (O). Une deuxième lentille magnétique (L2) joue le rôle d'objectif et donne de l'objet (O) une image agrandie (I1). Une fraction de cette image (I1) est agrandie une nouvelle fois. L'image finale (I2) est projetée sur un écran rendu fluorescent par le bombardement atomique. Cette image (I2) peut directement être analysée sur l'écran ou bien encore photographiée (*Fig. 1*).

1.2.1. Préparation et analyse des échantillons

En microscopie électronique, l'objet examiné est placé sous un vide très élevé, nécessaire au déplacement des électrons.

L'échantillon est tué avec des fixateurs non coagulants qui stabilisent les structures cellulaires en préservant leur aspect le mieux possible. Les fixateurs les plus couramment utilisés sont le tétr oxyde d'osmium, le formaldéhyde, le glutaraldéhyde ou encore le permanganate de potassium. Après fixation, l'échantillon est déshydraté, puis inclus dans une résine synthétique transparente aux électrons (Epon, araldite), qui durcit fortement. Des coupes très fines sont réalisées dans le bloc d'inclusion, en utilisant un ultramicrotome, appareil semi-automatique utilisant un rasoir de verre ou un diamant (*Fig. 2A*). L'épaisseur retenue pour les coupes varie de 0,03 μm à 0,5 μm . Ce matériel représente donc en moyenne un à deux centièmes de l'épaisseur d'une cellule eucaryote (Les coupes doivent être fines, car les électrons ont un pouvoir de pénétration qui est limité). Les coupes sont ensuite déposées sur une petite grille de cuivre porte-objet (environ 3 mm de diamètre pour 30 μm d'épaisseur), dont le rôle est comparable à celui de la lame porte-objet du microscope photonique (*Figs. 2B-C*). Les coupes sont ensuite éventuellement contrastées par exposition à des sels de métaux lourds (par exemple double imprégnation par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb). Le contraste dépend du nombre atomique des atomes qui se sont associés au matériel que l'on veut étudier; plus le nombre atomique est élevé, plus les électrons sont dispersés et plus fort est le contraste. On procède alors à l'observation des coupes au microscope électronique à transmission : les grilles supportant les coupes sont introduites dans le microscope. Il n'est pas nécessaire d'enlever la résine d'inclusion pour l'observation mais seules les régions des coupes situées entre les barreaux des grilles support pourront être observées. On doit garder présent à l'esprit, en interprétant les images obtenues, le fait que le tissu étudié a été fixé et déshydraté, donc que les cellules qui le constituent ont été tuées et que leurs structures peuvent avoir été modifiées par les traitements subis.

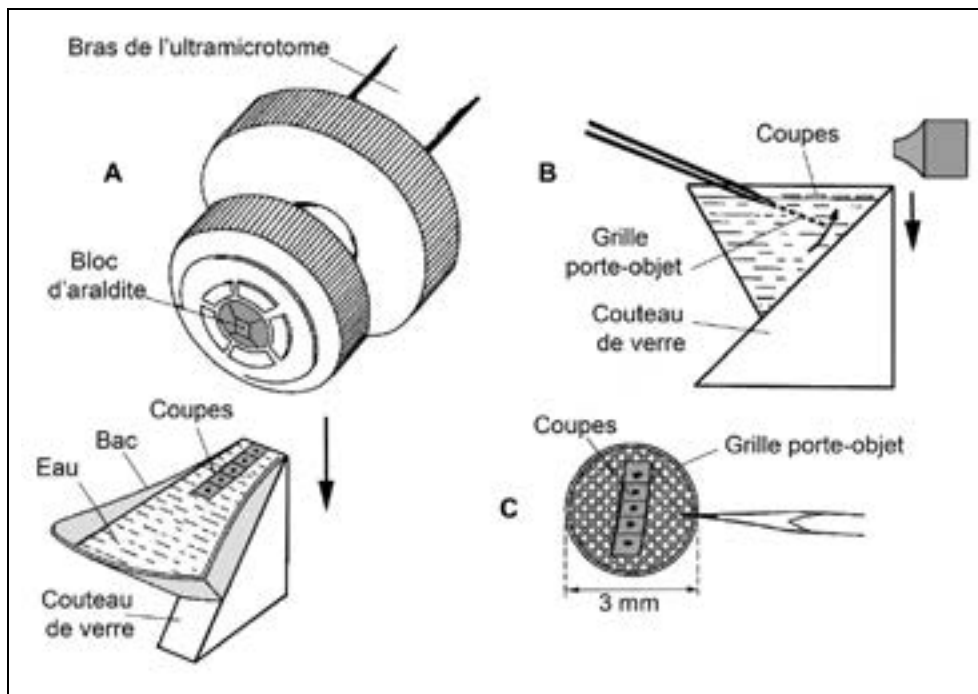


Figure 2. Préparation des coupes en microscopie électronique. (A) : Les coupes très fines réalisées dans le bloc d'inclusion, grâce à un ultramicrotome utilisant un couteau de verre, sont récupérées à la surface de l'eau. (B) : Les coupes sont ensuite déposées sur une petite grille de cuivre porte-objet. (C) : Schéma d'une grille porte-objet associée à une série de coupes.

1.2.2. Cryofracture et cryodécapage

Ces deux méthodes sont utilisées en particulier pour étudier l'organisation des membranes biologiques. L'échantillon de tissu à étudier est congelé brutalement dans du fréon liquide (-100°C), lui-même refroidi par l'azote liquide (-192°C), en présence d'un cryoprotecteur qui prévient la formation de cristaux de glace. L'échantillon congelé est ensuite fracturé sous vide par un choc latéral (Fig. 3A); la fracture suit en général un plan membranaire (membrane plasmique à la surface des cellules, lorsque celles-ci sont restées intactes, membranes des organites cellulaires là où les cellules ont été elles-mêmes fracturées et "ouvertes" sous l'impact), et par endroits un plan intramembranaire.

Dans certains cas il peut être utile de décaper la surface de fracture par cryodessiccation : c'est le cryodécapage. Cette méthode, dans laquelle on

n'utilise pas de cryoprotecteurs, implique que le matériel soit refroidi très rapidement (20°C par milliseconde) : la congélation s'effectue par contact de l'échantillon avec un bloc de cuivre refroidi à -269° par l'hélium liquide. La glace est ensuite sublimée sous vide (lyophilisation).

On procède ensuite à un ombrage de la surface de fracture, en projetant sur l'échantillon un métal lourd (platine) sous un angle de 45°, puis en vaporisant sous une incidence perpendiculaire à la surface une fine pellicule de carbone pur. On obtient ainsi un moulage rigide, ou réplique, de la surface de fracture, dont certaines zones correspondant aux reliefs mis en évidence par le dépôt hétérogène de platine, seront plus épaisses.

Le matériel organique est alors détruit par un acide minéral, et seule la réplique métallique, déposée sur une grille porte-objet sera observée en microscopie électronique à transmission (*Fig. 3B*).

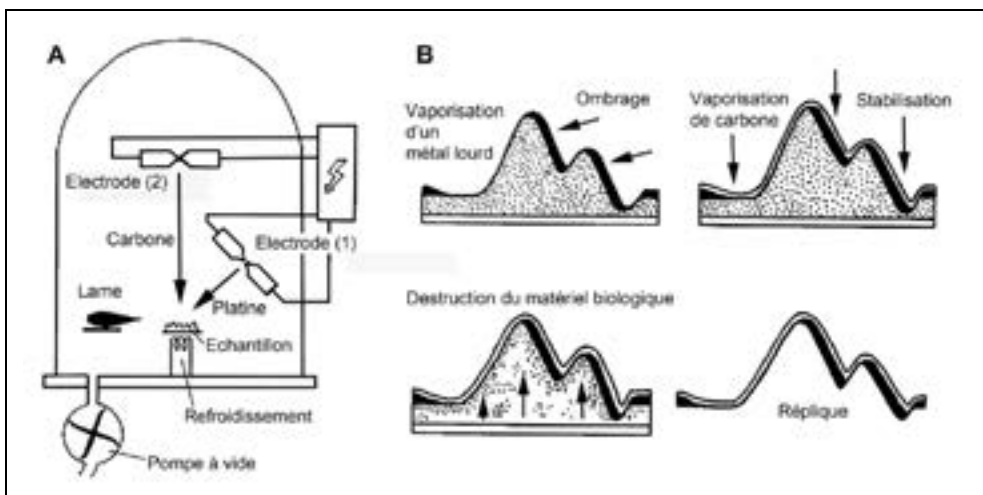


Figure 3. La technique de cryofracture (Voir texte).

1.2.3. Microscope à balayage

Le microscope électronique à balayage permet d'obtenir des images tridimensionnelles de l'objet étudié. Tout comme dans un microscope électronique à transmission, l'échantillon observé par microscopie électronique à balayage est placé dans une enceinte où règne un vide poussé. L'échantillon est balayé par un faisceau d'électrons, mais seuls sont

utilisés pour la formation de l'image des électrons secondaires, réémis par la surface de l'échantillon, qui sont captés et convertis en image sur un écran. Ce type d'appareil présente un grossissement utile de 20 000 et un pouvoir séparateur de 100 Å. A la différence du microscope électronique à transmission, le microscope électronique à balayage permet d'étudier des échantillons massifs, dont seule la surface est observée.

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

2.1. 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).