

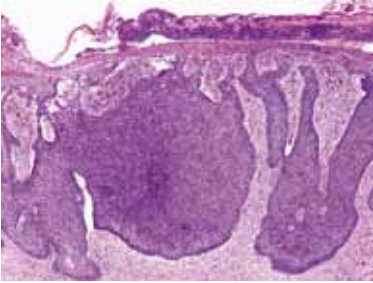


Hybridation in situ

Importance de l'eau ultrapure pour les technologies d'ARN

Dr Frauke Nitzki : Médecine universitaire Georg-August-Universität, Goettingen, Allemagne
 Institut de génétique humaine Groupe de travail Génétique des tumeurs
 Email : fnitzki@gwdg.de - www.humangenetik.gwdg.de/HG/1/index.php?i=Pe&s=PersonalH

Dr Elmar Herbig : Sartorius Weighing Technology GmbH Goettingen, Allemagne
 Email : elmar.herbig@sartorius.com



Histopathologie d'un carcinome basocellulaire humain après ablation chirurgicale (coloration à l'hématoxyline et à l'éosine)
 © KGH. Source



Carcinome de cellule basale
 © Klaus D. Peter

détecter les brins transcrits, on utilise des fragments spécifiques d'acide nucléique (sondes) qui sont complémentaires de la séquence recherchée. Ces sondes peuvent se composer d'ADN mais aussi d'ARN. Actuellement, on utilise souvent des sondes d'ARN. La molécule Digoxigénine (Dig), qui est normalement présente dans la digitale pourpre (*Digitalis purpurea*), est souvent liée aux sondes. A l'aide de ce marquage, les sondes liées spécifiquement sont visibles dans la coupe de tissu grâce à des anticorps anti-Dig conjugués à une enzyme. A cet effet, le substrat correspondant est appliqué sur la coupe de tissu après l'incubation avec l'anticorps et l'enzyme le transforme en un colorant (ill. 1). Cette méthode permet d'analyser l'activité de différents gènes dans le cadre de projets de recherche ou de procédés de diagnostic. L'article synoptique de Wilcox [2] contient d'autres informations pratiques.

Dans cet article, nous présentons les résultats d'une HIS réalisée dans le cadre de la recherche sur le cancer.

Les échantillons analysés ont été prélevés sur des souris génétiquement

Une hybridation in situ (HIS) en vue de la localisation d'hybrides d'ADN/ARN dans des préparations cytologiques a été décrite pour la première fois en 1969 par Gall et Pardue [1]. Cette méthode permet de détecter des brins transcrits d'ARN messager (mARN) dans des coupes de tissus. A la différence des analyses d'expression par des méthodes qui reposent sur une réaction en chaîne par polymérase (PCR), il est

possible de localiser précisément les brins transcrits recherchés dans le tissu.

Principe de l'hybridation in situ

Les HIS constituent une alternative aux analyses immunohistochimiques si aucun anticorps adéquat n'est disponible et elles sont utilisées dans les secteurs de recherche les plus variés. Pour

Production d'eau ultrapure

Le système arium® pro VF (ill. 3) permet de produire de l'eau ultrapure à partir d'eau potable prétraitée et d'éliminer les impuretés encore présentes dans cette eau.

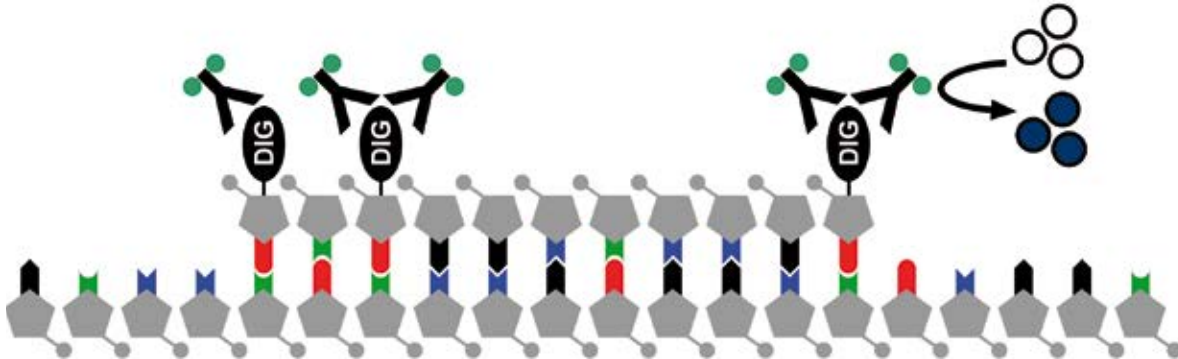
La production d'eau ultrapure exige une recirculation continue et un débit d'eau constant, ce qui est obtenu par un système de pompe avec régulation de la pression. La conductivité est mesurée à l'arrivée de l'eau d'alimentation et directement à la sortie de l'eau produite.

Le système arium® pro VF (modèle précédent ayant les mêmes caractéristiques techniques que le système représenté avec un nouveau design) utilisé au cours des analyses présentées ici, fonctionne avec deux cartouches de purification différentes. Ces cartouches sont remplies de charbon actif adsorbant spécial et de résines échangeuses d'ions à lits mélangés afin de fournir de l'eau d'une très grande pureté avec un faible taux de COT (carbone organique total). De plus, le système est également équipé d'une lampe UV qui a un effet germicide et oxydant aux longueurs d'onde de 185 nm et 254 nm.

Ce système comprend également un module d'ultrafiltration fonctionnant par balayage tangentiel. La membrane d'ultrafiltration utilisée retient les colloïdes, les microorganismes, les endotoxines, l'ARN et l'ADN et élimine les RNases, ce qui est essentiel pour l'HIS.

Un filtre final de 0,2 µm absolu est installé à la sortie de l'eau pour éliminer les particules et les bactéries lors du soutirage de l'eau ultrapure produite. Le procédé de purification d'eau spécifique à cet appareil est représenté sur l'illustration 2 (diagramme de flux).

modifiées. La modification ciblée (knock-out homozygote) du gène suppresseur de tumeurs Patched entraîne l'apparition de carcinomes basocellulaires chez ces animaux [3]. Ces tumeurs de la peau sont les tumeurs les plus fréquentes chez l'homme. Elles présentent souvent une activité accrue de la voie de signalisation Patched. La voie de signalisation est pathologiquement activée par l'inactivation de ces composants importants dans ce modèle de souris. Cela entraîne une expression accrue du gène cible Gli1 (codé pour un facteur de transcription qui active différents autres gènes) dans les cellules cancéreuses et peut être détecté à l'aide d'une HIS. ▶▶▶



Ill. 1 : Déroulement schématique de l'HIS. Le mARN (brin inférieur) est détecté par une sonde complémentaire (brin supérieur) qui se lie spécifiquement au mARN.

Les molécules Dig (DIG) qui sont couplées à la sonde sont reconnues par un anticorps anti-Dig (Y). L'enzyme phosphatase alcaline (points verts) est lié à l'anticorps et transforme un substrat incolore (cercles blancs) en un produit bleu insoluble dans l'eau (cercles bleus).

VENEZ LA DECOUVRIR SUR NOTRE STAND FORUM LABO HALL 3, STAND I 57

Sorbonne à recirculation : gamme **C-PURE**

Ads laminaire, fabricant français depuis 1968, leader sur le marché

C-PURE

des hottes à filtration vous présente sa toute nouvelle

C- pure

Equipée en série d'un plan de travail avec bac de rétention en polypropylène (PPH) et d'un éclairage.

La **C pure** est proposée avec filtration charbon actif ou filtration HEPA H14 selon EN 1822

(opérations de pesées).

Double protection
Opérateur et environnement

Norme NFX15211 :2009

Certifiée par un laboratoire indépendant.



Ads laminaire - Solutions Ultra Propre

35 rue Baudin

93310 Le Pré Saint Gervais

Tél : 01 48 44 74 69

Fax : 01 48 44 14 64

Email : info@adslaminaire.com





Importance de l'eau ultrapure

Pour cette méthode très sensible, il est extrêmement important d'utiliser de l'eau purifiée ne contenant pas de RNase, de produits chimiques et autres contaminants afin d'éviter toute dégradation de la sonde d'ARN. Par conséquent, l'eau ultrapure utilisée aux cours de ces analyses doit entre autres satisfaire à des exigences élevées comme l'absence de RNase.

Dans le travail présenté ici, l'utilisation du système de production d'eau ultrapure arium® pro (Sartorius) a permis de répondre à ces exigences très élevées en matière de pureté de l'eau.

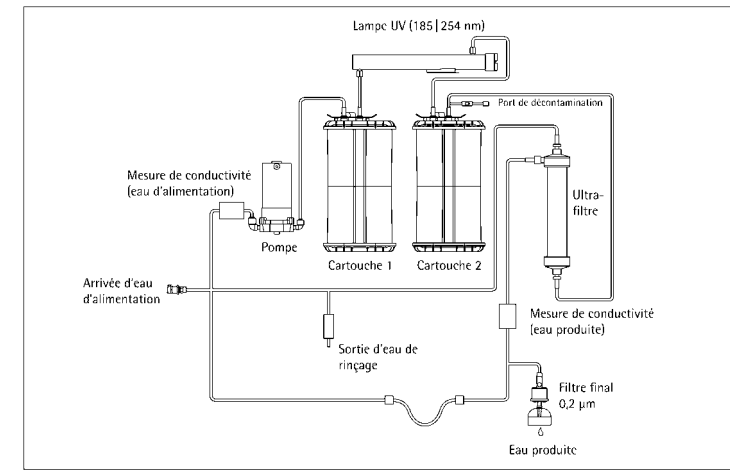
L'eau ultrapure produite de la manière représentée ci-dessus est entre autres utilisée pour des problématiques extrêmement sensibles dans des laboratoires de génétique humaine dans le cadre de l'HIS.

Les résultats obtenus au cours de ces recherches sont décrits ci-dessous.

Matériels et méthodes

Habituellement, les tampons et solutions nécessaires sont mélangés avec du Pyrocarbonate d'éthyle (DEPC) pour inactiver les RNases, ce qui équivaut à éviter à l'extrême ou au maximum (overkill) des contaminations secondaires par exemple dans des matières ou des produits chimiques impurs. Ce traitement entraîne des coûts supplémentaires, prend du temps, présente un danger pour la santé et ne fonctionne pas pour toutes les solutions (par exemple pas dans des solutions contenant du Tris).

A chaque fois qu'il est possible, il faut donc éviter l'emploi du DEPC et utiliser de l'eau



III. 2 : Représentation schématique du diagramme de flux d'un système d'eau ultrapure.
Pour plus de clarté, les vannes et leur dispositif de commande ne sont pas représentés.

ultrapure exempte de contaminants. Comme le montre l'expérience, tous les réactifs ainsi que l'eau utilisés pour les expériences HIS doivent avoir une qualité constante, c'est-à-dire qu'ils ne doivent pas contenir de contaminations biologiques telles que germes, DNases, RNases, endotoxines, etc.

Mais cela n'est pas toujours le cas pour l'eau du robinet, qui selon son origine (par exemple en fonction de la qualité de l'eau des nappes phréatiques locales) peut contenir des contaminants biologiques fluctuants et des résidus chimiques. Pour obtenir plus de détails sur la qualité de l'eau des nappes phréatiques et de l'eau

potable en Allemagne, consultez [4 et 5]. D'entrée, il faut donc exclure de réaliser une HIS avec de l'eau du robinet non traitée, car cela entraînerait une perte de temps inutile et augmenterait les coûts.

Des échantillons de tissu ont été prélevés sur la peau cancéreuse des souris et après inclusion dans la paraffine, des coupes de paraffines ont été produites à l'aide d'un microtome.

Les coupes de paraffine ont ensuite été déparaffinées, réhydratées et le tissu a été perméabilisé avec de la protéinase K. Pour éviter des liaisons non spécifiques en raison de différences de charge, on



III. 3 : Système d'eau ultrapure arium® pro VF (photo : Sartorius)

a procédé à une incubation avec de l'anhydride acétique.

La sonde d'ARN spécifique à Gli1 et marquée à la Dig a été incubée à 59 °C sur des coupes de tissu pendant une nuit entière. Pour éliminer les sondes liées de manière non spécifique, un protocole de lavage rigoureux a eu lieu. Les coupes de tissu ont été lavées plusieurs fois à 63 °C dans une solution contenant du formamide et les sondes non liées ont été éliminées par l'incubation avec de la RNase A. Un anticorps spécifique Dig (Roche) a été utilisé pour la détection de la sonde marquée à la Dig. Les coupes ont d'abord été traitées avec I-Block (Tropix) pour bloquer des sites de fixation d'anticorps non spécifiques.

Ensuite, l'anticorps anti-Dig a été ajouté et les coupes ont été mises à incuber à

Suite p 22 ►►►

Des découvertes incroyables avec Fine Science Tools



FINE SURGICAL INSTRUMENTS FOR RESEARCH™

LIVRAISON DANS LE MONDE ENTIER DEPUIS 1974

Demandez le catalogue sur finescience.de ou en appelant le +49 (0) 62 21 – 90 50 50.

F · S · T®
FINE SCIENCE TOOLS