



**HAL**  
open science

# Détection de micro-ARNs in situ : utilisation de sondes LNA

Candice Babarit

► **To cite this version:**

Candice Babarit. Détection de micro-ARNs in situ : utilisation de sondes LNA. XXXème congrès de l'AFH: les nouveaux mondes de l'histologie, Association Française d'Histotechnologie (AFH). FRA., Jun 2017, Nantes, France. hal-01547549

**HAL Id: hal-01547549**

**<https://hal.science/hal-01547549>**

Submitted on 5 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Distributed under a Creative Commons Attribution - ShareAlike 4.0 International License



École Nationale  
Vétérinaire, Agroalimentaire et de l'Alimentation  
*Santé et alimentation au cœur de la vie*



# Détection de micro-ARNs *in situ* : utilisation de sondes LNA

Candice BABARIT  
UMR703 PAnTher



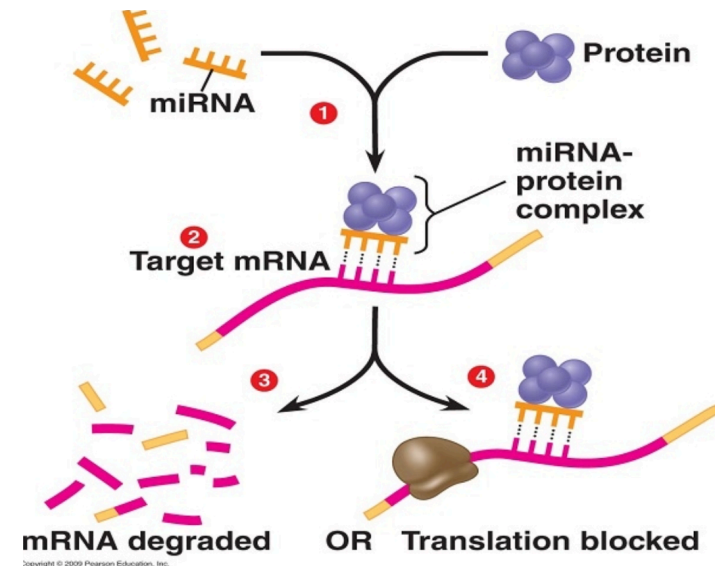
# Les micro-ARNs

- ARNs de petite taille : 20-25 nucléotides
- Synthétisés à partir de l'ADN génomique
- non traduits en protéine
- Acteurs clés de la régulation post-transcriptionnelle



# Les micro-ARNs

- ARNs de petite taille : 20-25 nucléotides
- Synthétisés à partir de l'ADN génomique
- non traduits en protéine
- Acteurs clés de la régulation post-transcriptionnelle



# Pourquoi s'intéresse t-on aux micro-ARNs ?

- ✓ Rôle physiologique : apoptose, différenciation cellulaire, développement ...

# Pourquoi s'intéresse t-on aux micro-ARNs ?

- ✓ Rôle physiologique : apoptose, différenciation cellulaire, développement ...

[Oncotarget](#). 2015 Apr 20; 6(11): 8474–8490.

Published online 2015 Apr 2. doi: [10.18632/oncotarget.3523](https://doi.org/10.18632/oncotarget.3523)

## MicroRNAs in apoptosis, autophagy and necroptosis

[Zhenyi Su](#),<sup>#1,2</sup> [Zuozhang Yang](#),<sup>#3,4</sup> [Yongqing Xu](#),<sup>#4</sup> [Yongbin Chen](#),<sup>#5</sup> and [Qiang Yu](#)<sup>#6</sup>

[Adv Drug Deliv Rev](#). 2015 Jul 1; 88: 3–15.

Published online 2015 Apr 14. doi: [10.1016/j.addr.2015.04.004](https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.04.004)

## MicroRNA-mediated Regulation of Differentiation and Trans-differentiation in Stem Cells

[Sang-Ging Ong](#),<sup>1,2</sup> [Won Hee Lee](#),<sup>1,2</sup> [Kazuki Kodo](#),<sup>1,2</sup> and [Joseph C. Wu](#)<sup>1,2,3,4</sup>

[Genes Dev](#). 2007 Mar 1; 21(5): 578–589.

doi: [10.1101/gad.1522907](https://doi.org/10.1101/gad.1522907)

## Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development

[Joel R. Neilson](#),<sup>1</sup> [Grace X.Y. Zheng](#),<sup>1,2</sup> [Christopher B. Burge](#),<sup>2,3</sup> and [Phillip A. Sharp](#)<sup>1,3,4</sup>

# Pourquoi s'intéresse t-on aux micro-ARNs ?

- ✓ Rôle physiologique : apoptose, différenciation cellulaire, développement ...
- Implication dans les processus physiopathologiques :

# Pourquoi s'intéresse t-on aux micro-ARNs ?

- ✓ Rôle physiologique : apoptose, différenciation cellulaire, développement ...
- Implication dans les processus physiopathologiques :

[Oncotarget](#). 2015 Sep 8;6(26):21802-15.

## **MicroRNA-224 is implicated in lung cancer pathogenesis through targeting caspase-3 and caspase-7.**

[Cui R](#)<sup>1,2</sup>, [Kim T](#)<sup>3</sup>, [Fassan M](#)<sup>1,4</sup>, [Meng W](#)<sup>5</sup>, [Sun HL](#)<sup>1</sup>, [Jeon YJ](#)<sup>1</sup>, [Vicentini C](#)<sup>6</sup>, [Tili E](#)<sup>1,7</sup>, [Peng Y](#)<sup>8</sup>, [Scarpa A](#)<sup>9</sup>, [Liang G](#)<sup>10</sup>, [Zhang YK](#)<sup>11</sup>, [Chakravarti A](#)<sup>5</sup>, [Croce CM](#)<sup>1</sup>.

[Biochem Soc Trans](#). 2010 Dec;38(6):1565-70. doi: 10.1042/BST0381565.

## **The involvement of microRNAs in Type 2 diabetes.**

[Ferland-McCollough D](#)<sup>1</sup>, [Ozanne SE](#), [Siddle K](#), [Willis AE](#), [Bushell M](#).

[Front Physiol](#). 2015; 6: 40.

Published online 2015 Feb 12. doi: [10.3389/fphys.2015.00040](#)

## **The emerging role of microRNAs in Alzheimer's disease**

[Grazia D. Femminella](#)<sup>1</sup>, [Nicola Ferrara](#)<sup>1</sup> and [Giuseppe Rengo](#)<sup>2,\*</sup>

[FASEB J](#). 2009 Oct;23(10):3335-46. doi: 10.1096/fj.08-128579. Epub 2009 Jun 15.

## **Common micro-RNA signature in skeletal muscle damage and regeneration induced by Duchenne muscular dystrophy and acute ischemia.**

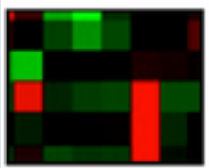


# Pourquoi s'intéresse t-on aux micro-ARNs ?

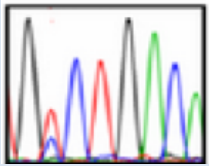
- ✓ Rôle physiologique : apoptose, différenciation cellulaire, développement ...
  
- Implication dans les processus physiopathologiques :
  - Compréhension des processus pathologiques
  - Biomarqueurs diagnostiques
  - Biomarqueurs d'efficacité de la réponse aux traitements
  - Cibles thérapeutiques (Gougelet A *et al*, 2015)

# Techniques d'analyse des micro-ARNs

## Approches globales



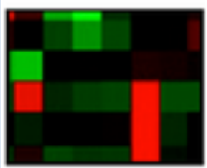
- Microarray



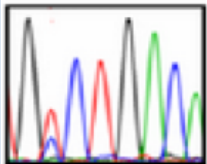
- Séquençage haut débit

# Techniques d'analyse des micro-ARNs

## Approches globales

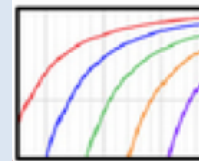


- Microarray

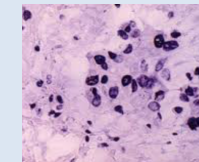


- Séquençage haut débit

## Approches ciblées



- RT-qPCR

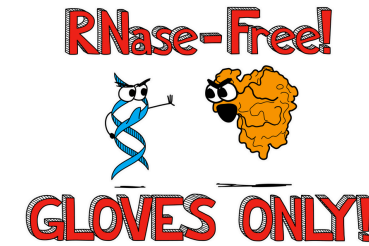


- Hybridation *in situ*

# La détection des micro-ARNs par hybridation *in situ*: un véritable challenge

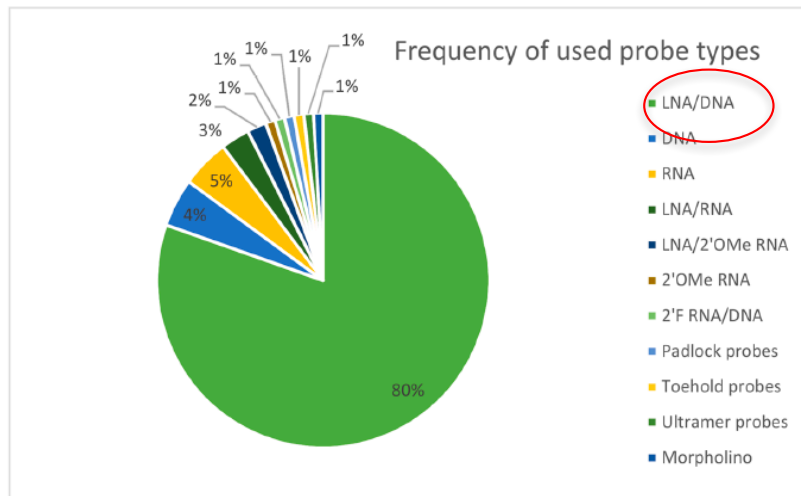


- Nature instable des ARNs (travailler en condition RNase free)
- Petite taille des micro-ARNs
- Séquences très proches entre certains micro-ARNs

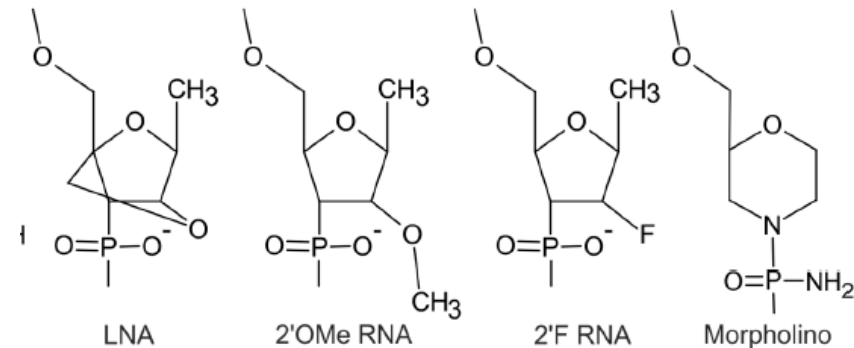


# Les sondes LNA : Gold standard pour la détection des micro-ARNs

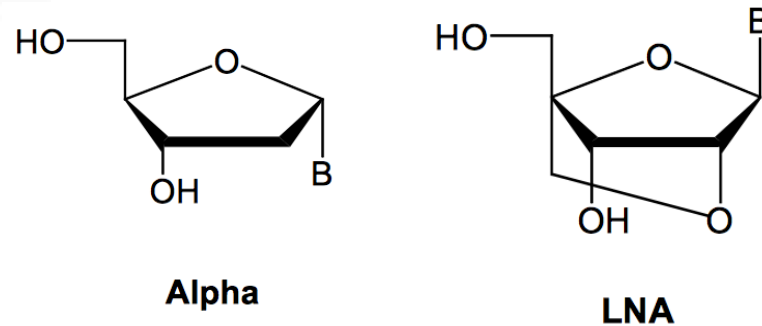
- Développement de sondes oligonucléotidiques avec incorporation d'acides nucléiques modifiés



Urbanek *et al*, 2015



# Les sondes LNA : Gold standard pour la détection des micro-ARNs



- Sondes LNA: sonde ADN avec incorporation d'acides nucléiques « verrouillés » (30% de LNA)
- Les acides nucléiques LNA:
  - augmentent l'affinité de liaison avec le nucléotide complémentaire
  - augmentent la spécificité de l'hybridation

# Détection des micro-ARNs par hybridation *in situ*



## FIXATION

- PFA 4%
- Ethyl diéthylaminopropyl carbodiimide (EDC)

# Détection des micro-ARNs par hybridation *in situ*



FIXATION

PERMÉABILISATION

- PFA 4%
- EDC
- Optionnelle
- Triton X-100
- Proteinase K



# Détection des micro-ARNs par hybridation *in situ*



- PFA 4%
- EDC
- Optionnelle
- Triton X-100
- Proteinase K
- Sonde LNA
- Marquage en 3' ou 5' ou 3'/5'
- Haptène ou fluorophore
- Contrôle négatif : scramble-miR

# Détection des micro-ARNs par hybridation *in situ*

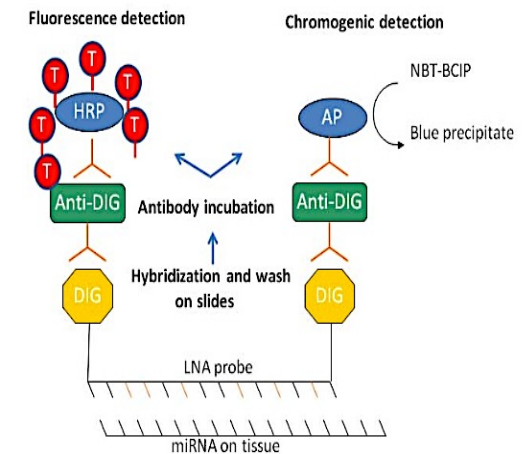
FIXATION

PERMÉABILISATION

HYBRIDATION

DETECTION

- PFA 4%
- EDC
- Optionnelle
- Triton X-100
- Proteinase K
- Sonde LNA
- Marquage en 3' ou 5' ou 3'/5'
- Haptène ou fluorophore
- scramble-miR
- Chromogénique
- Fluorescence



# La myopathie de Duchenne

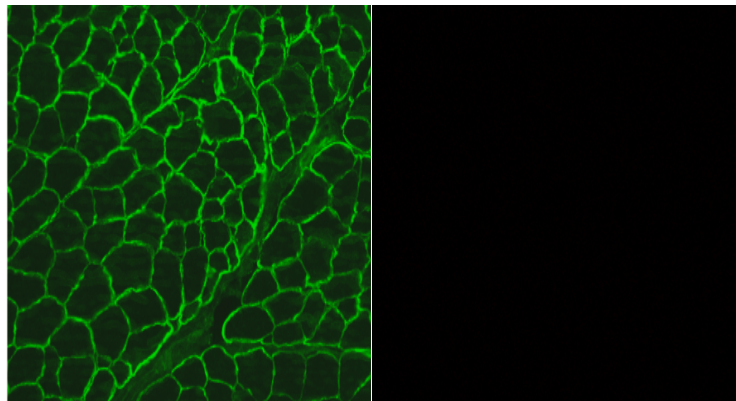
- Maladie génétique provoquant une perte progressive de la masse musculaire
- Touche 1 garçon / 5000
- Mutation du gène DMD codant la dystrophine



Muscle sain

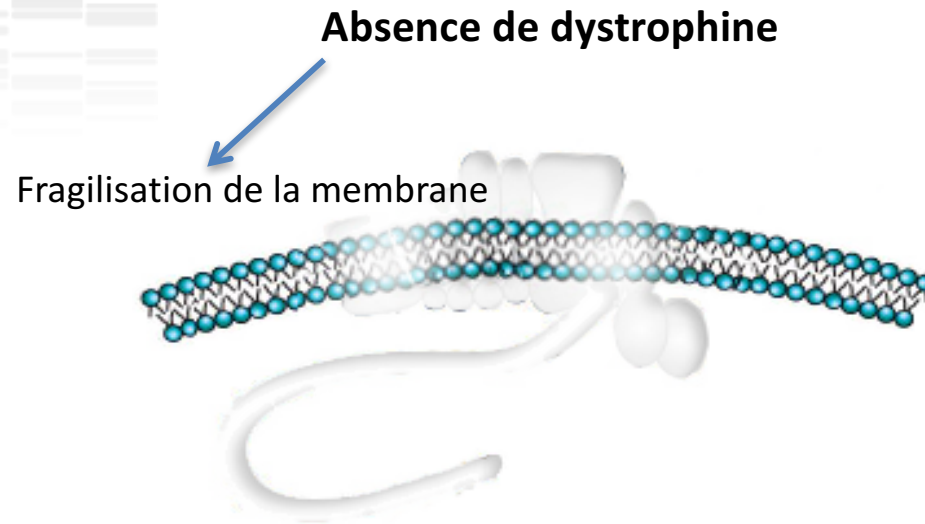
Muscle myopathe

dystrophine

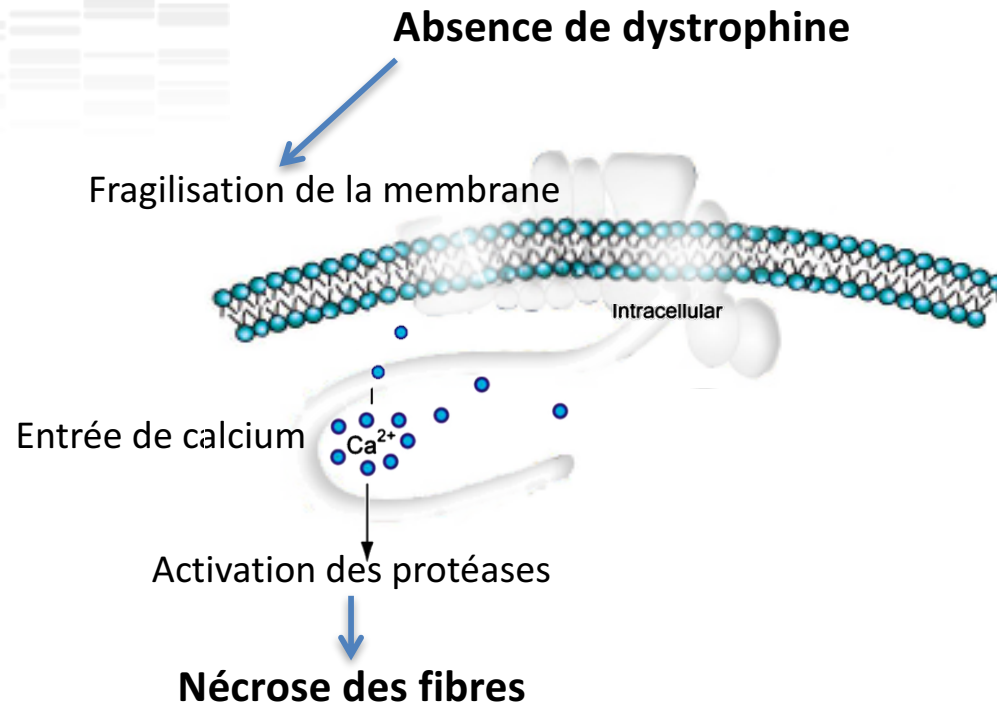


Absence de dystrophine

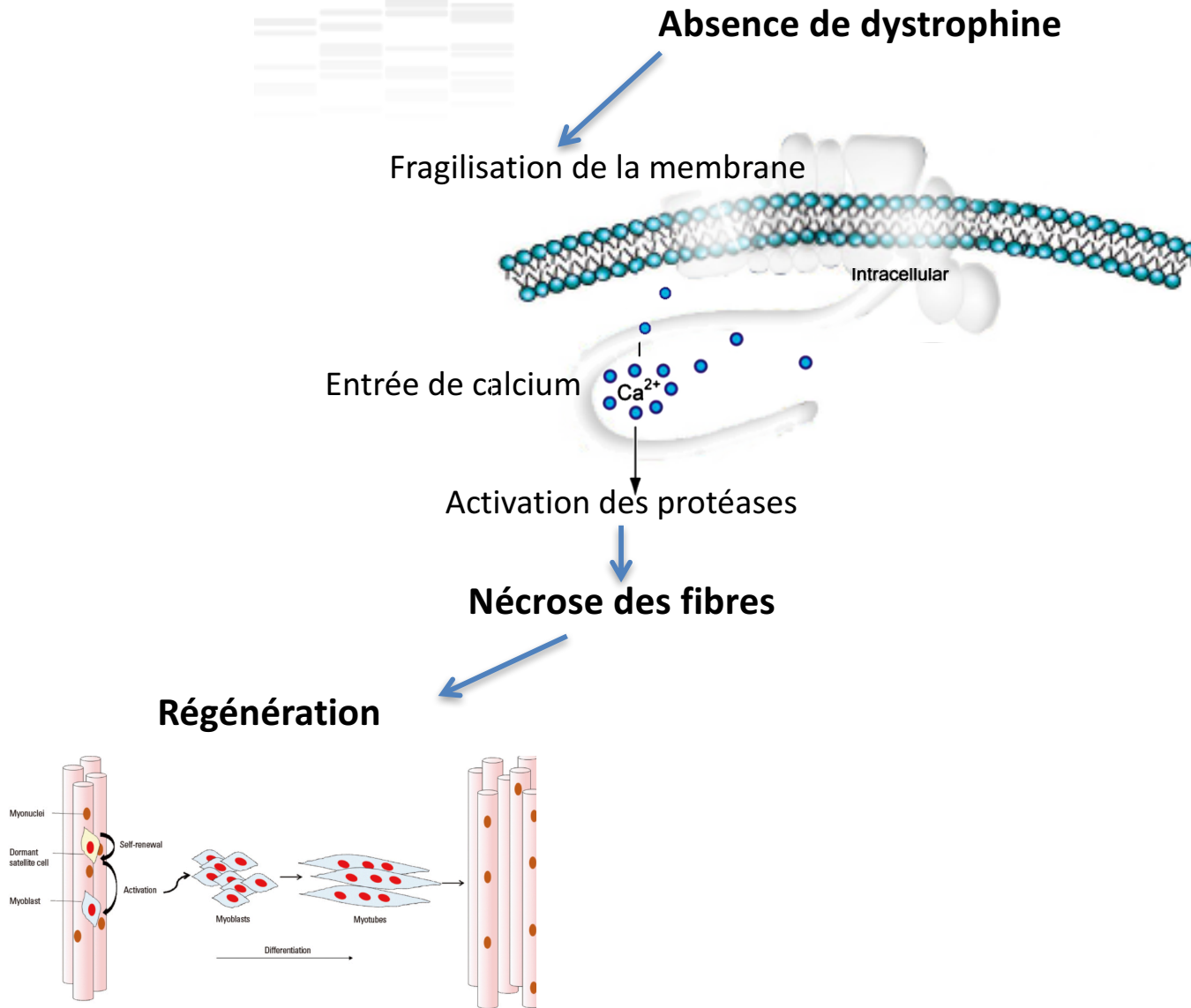
# Physiopathologie de la myopathie de Duchenne



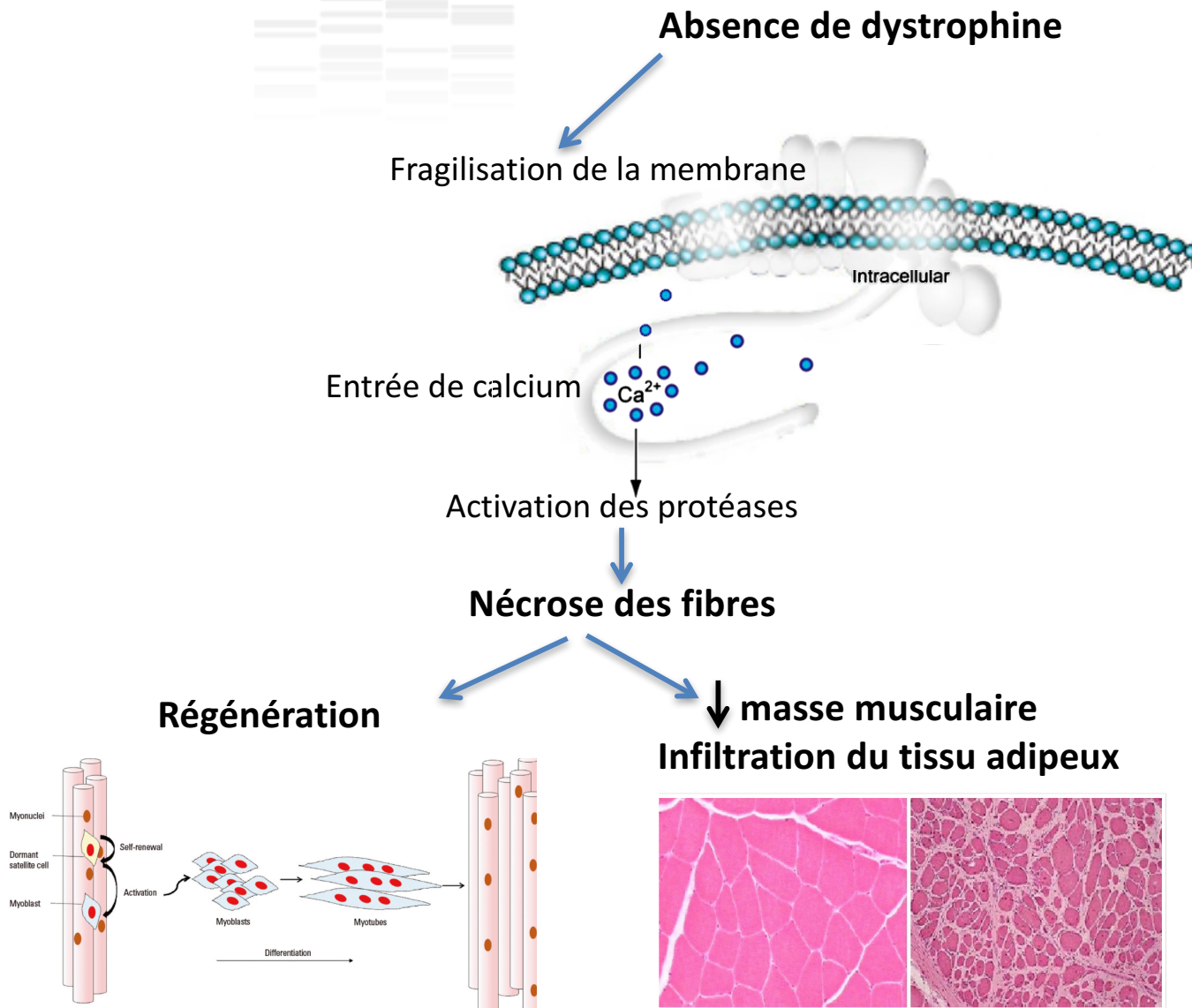
# Physiopathologie de la myopathie de Duchenne



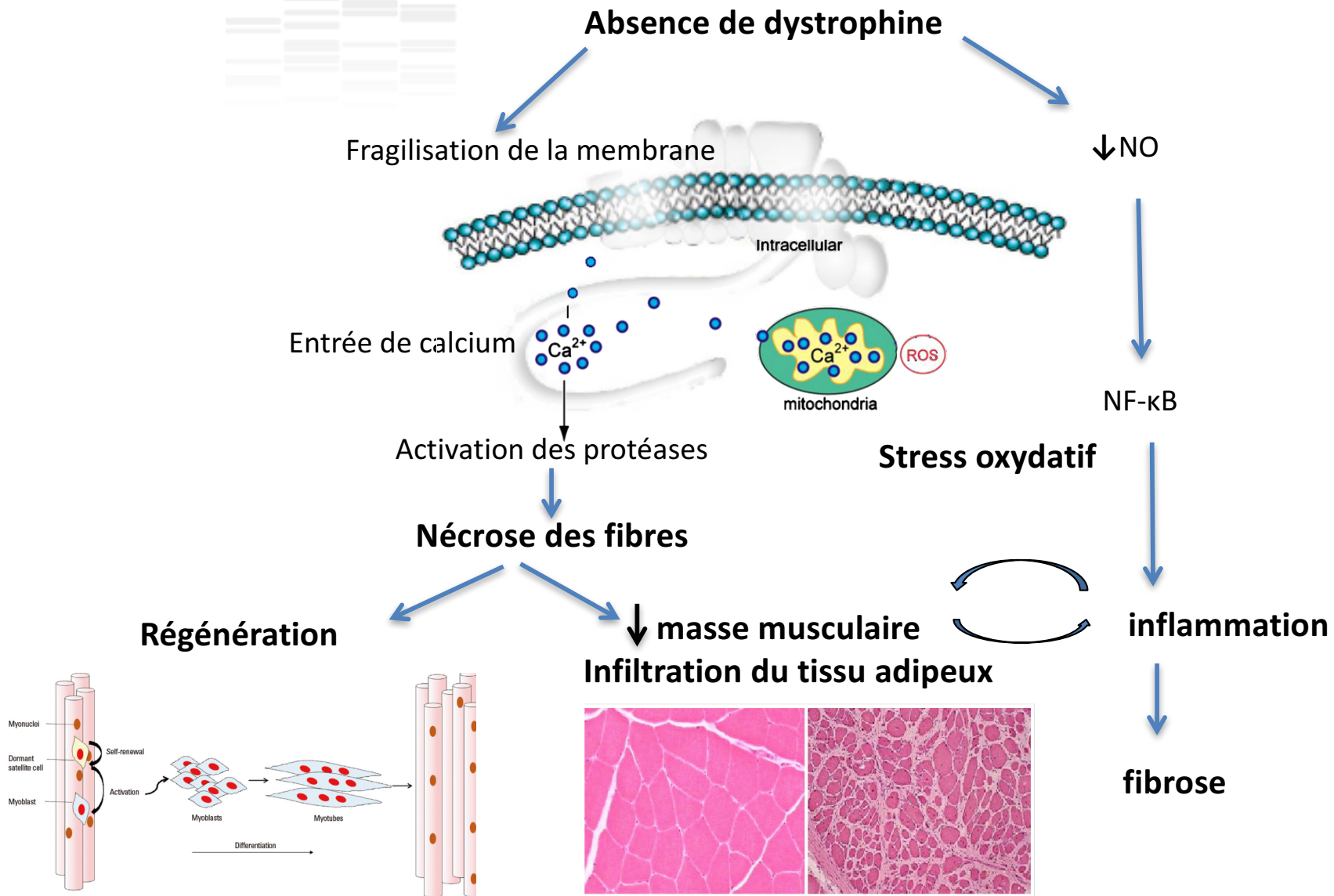
# Physiopathologie de la myopathie de Duchenne



# Physiopathologie de la myopathie de Duchenne

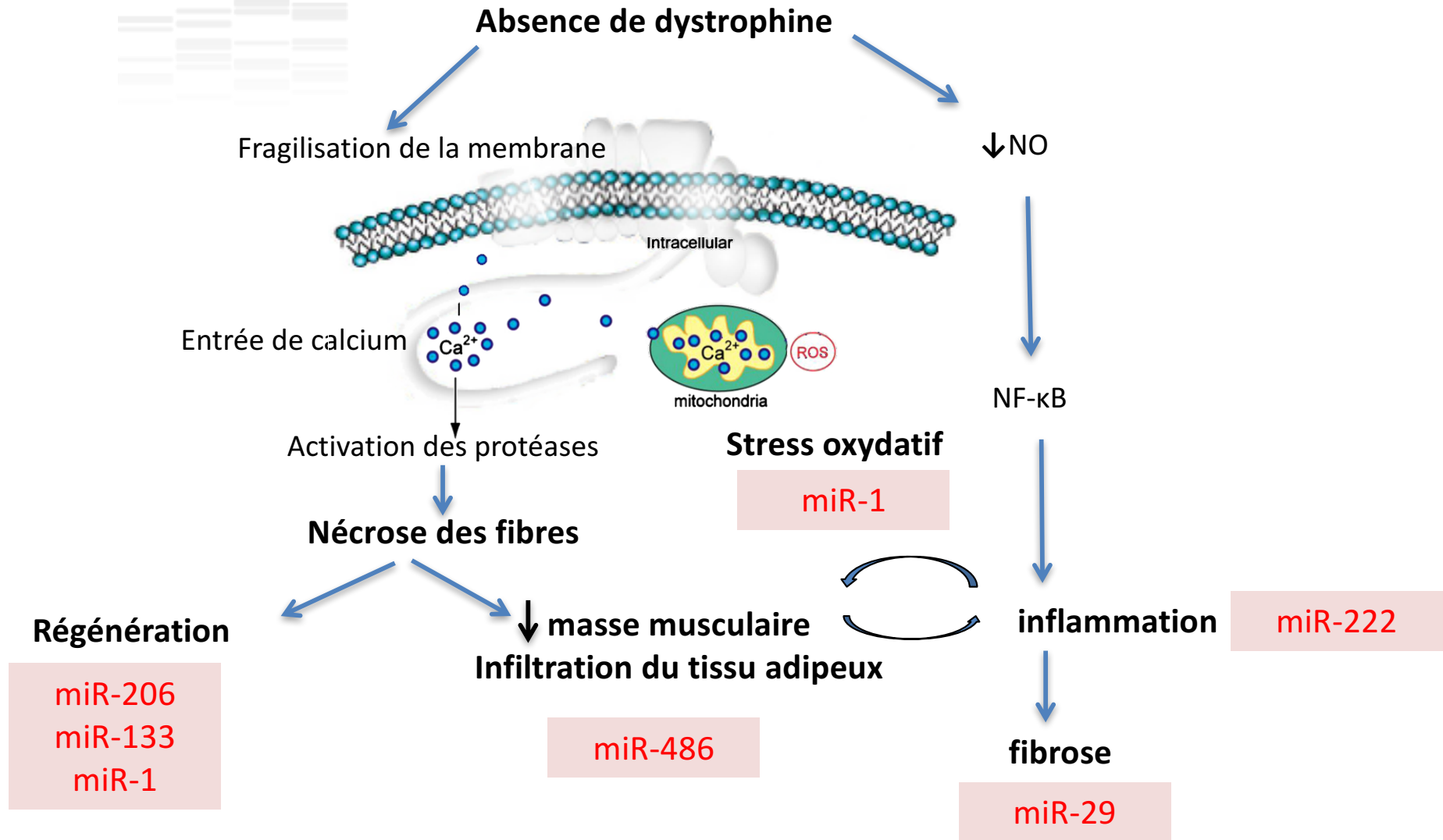


# Physiopathologie de la myopathie de Duchenne





# micro-ARNs et physiopathologie



Cacchiarelli *et al* 2011, Greco *et al* 2009, Roberts *et al* 2012, Liu *et al* 2012, Eisenberg *et al* 2007

# Le modèle du chien GRMD

## Golden Retriever Muscular Dystrophy

- **Phénotype clinique proche de l'Homme**
- **Taille** comparable à celle des enfants dystrophiques
- Référence pour les **essais précliniques**



# Le modèle du chien GRMD

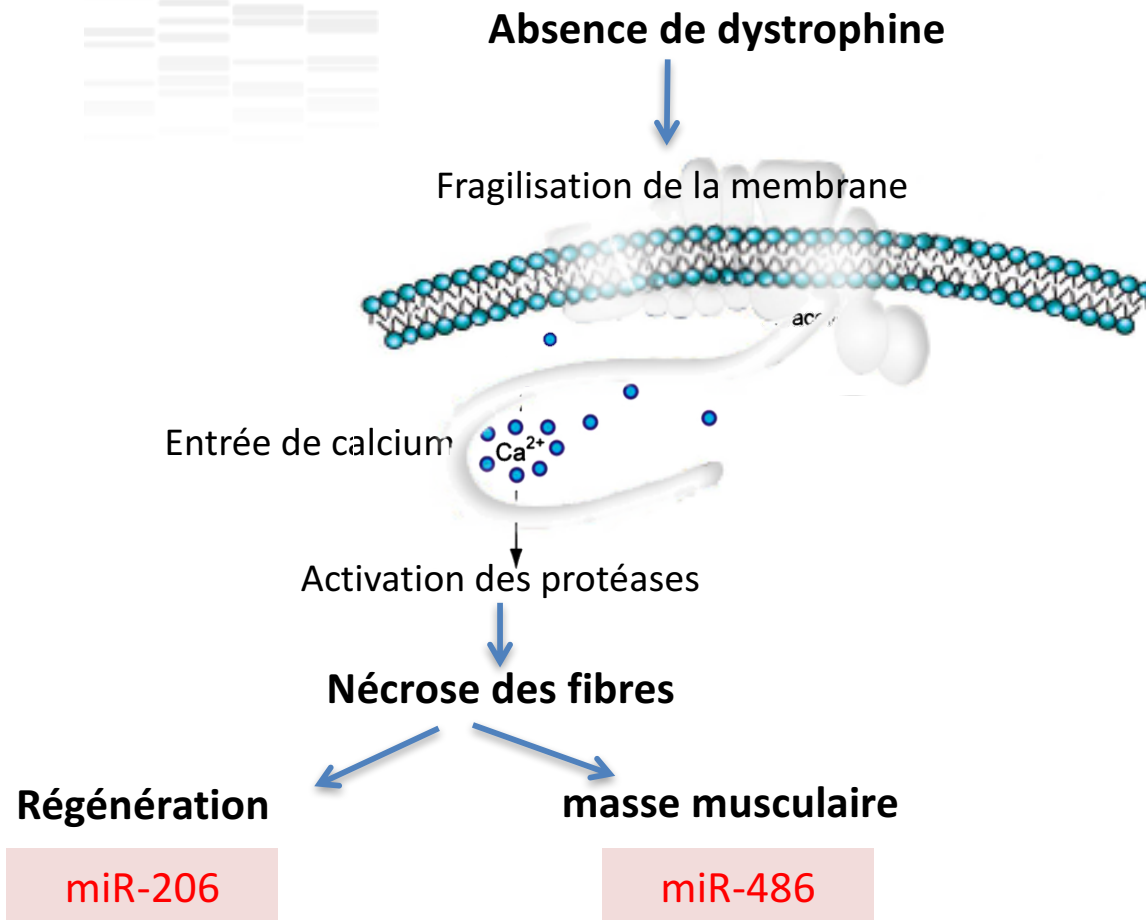
## Golden Retriever Muscular Dystrophy

- **Phénotype clinique proche de l'Homme**
- **Taille** comparable à celle des enfants dystrophiques
- Référence pour les **essais précliniques**



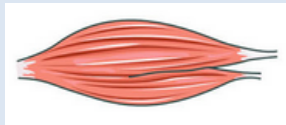
Absence de données sur l'expression tissulaire des micro-ARNs dans le muscle du chien GRMD

# Expression tissulaire des miR-206 et miR-486 chez le chien GRMD



# Démarche expérimentale

## Niveau d'expression tissulaire



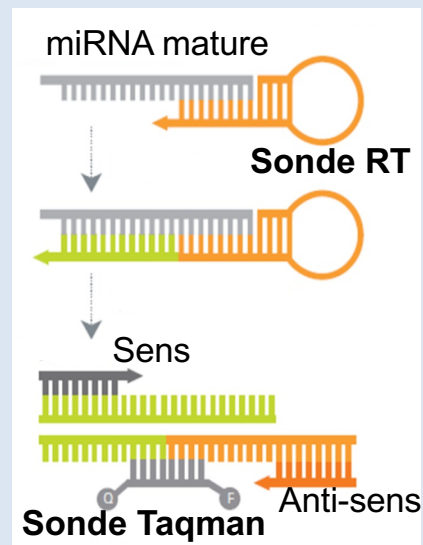
Extraction des petits ARNs



Transcription inverse

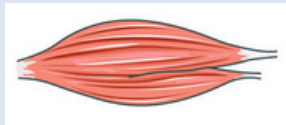


qPCR



# Démarche expérimentale

## Niveau d'expression tissulaire



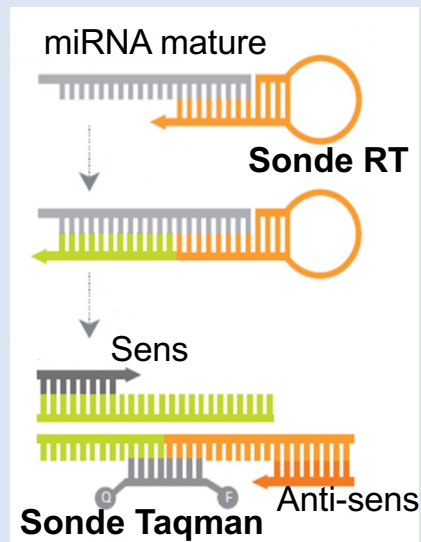
Extraction des petits ARNs



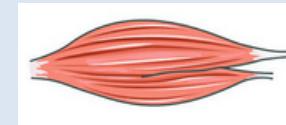
Transcription inverse



qPCR

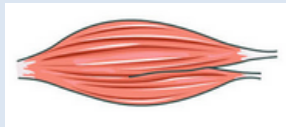


## Localisation cellulaire et phénotypage



# Démarche expérimentale

## Niveau d'expression tissulaire



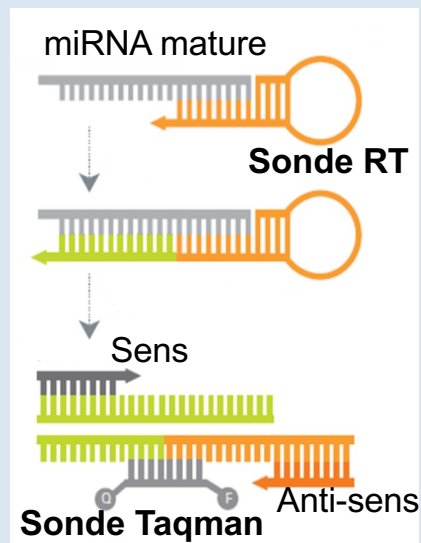
Extraction des petits ARNs



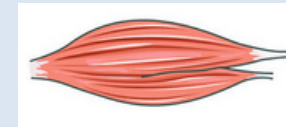
Transcription inverse



qPCR



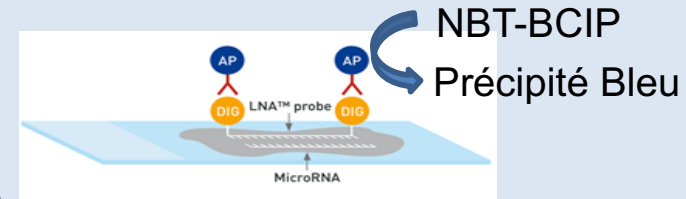
## Localisation cellulaire et phénotypage



Coupes au cryostat

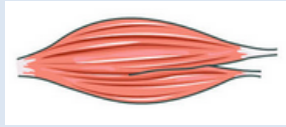


Hybridation *in situ*



# Démarche expérimentale

## Niveau d'expression tissulaire



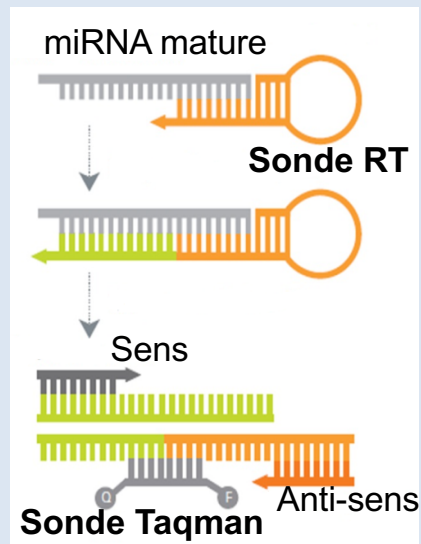
Extraction des petits ARNs



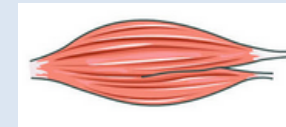
Transcription inverse



qPCR

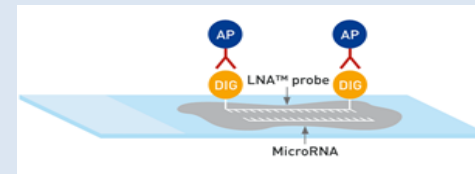


## Localisation cellulaire et phénotypage

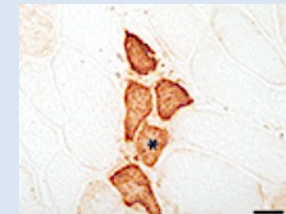


Coupes au cryostat

Hybridation *in situ*

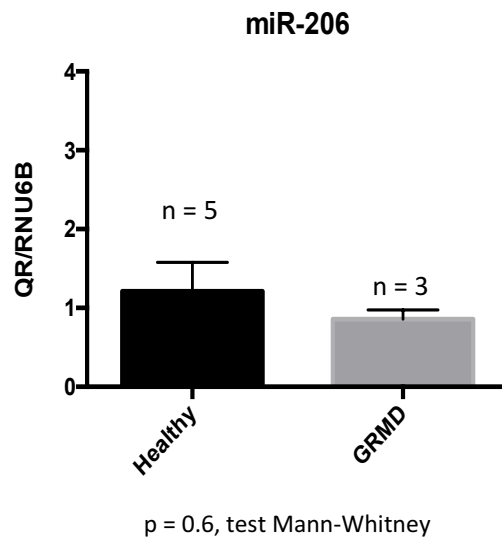


Immunomarquage  
MyHCd



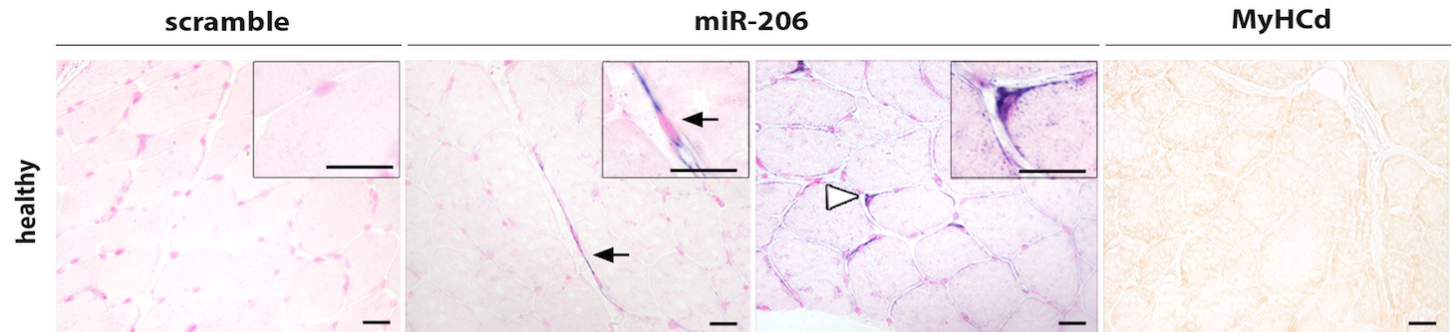
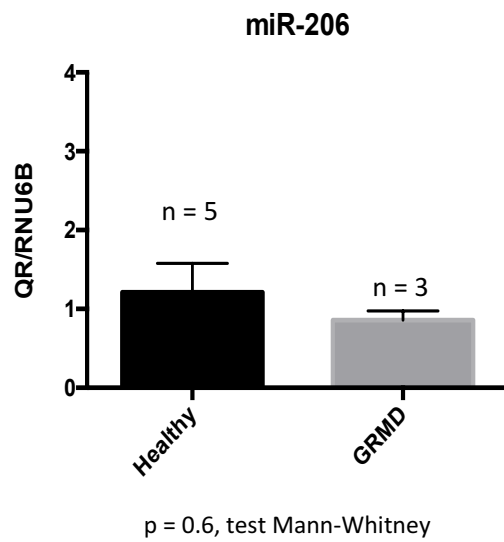


# Expression du miR-206 chez le chien GRMD



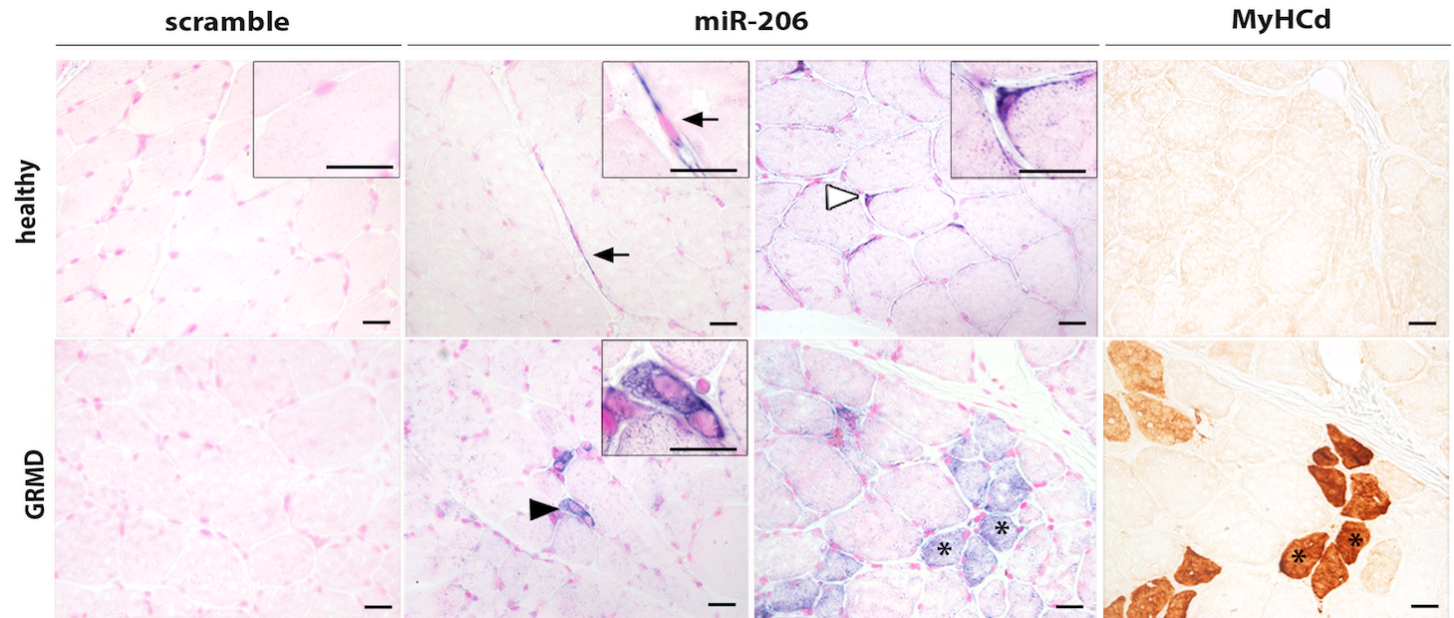
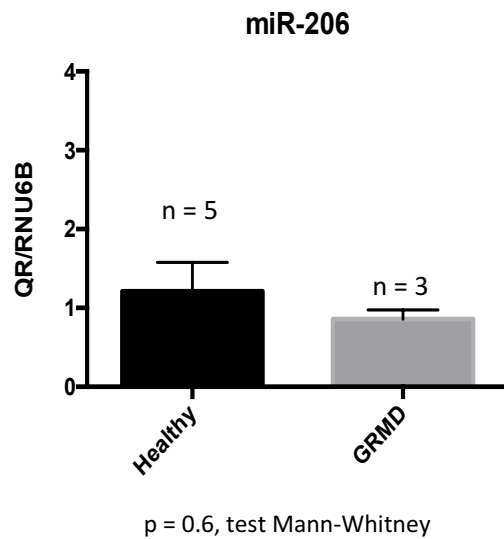
Robriquet, Babarit *et al*, 2016

# Expression du miR-206 chez le chien GRMD



Robriquet, Babarit *et al*, 2016

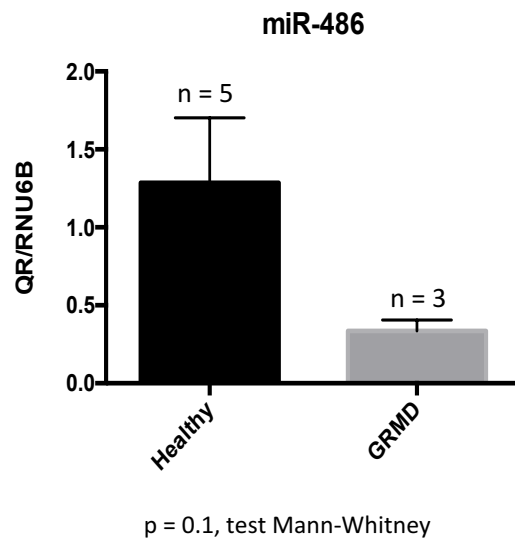
# Expression du miR-206 chez le chien GRMD



Échelle: 25 µm

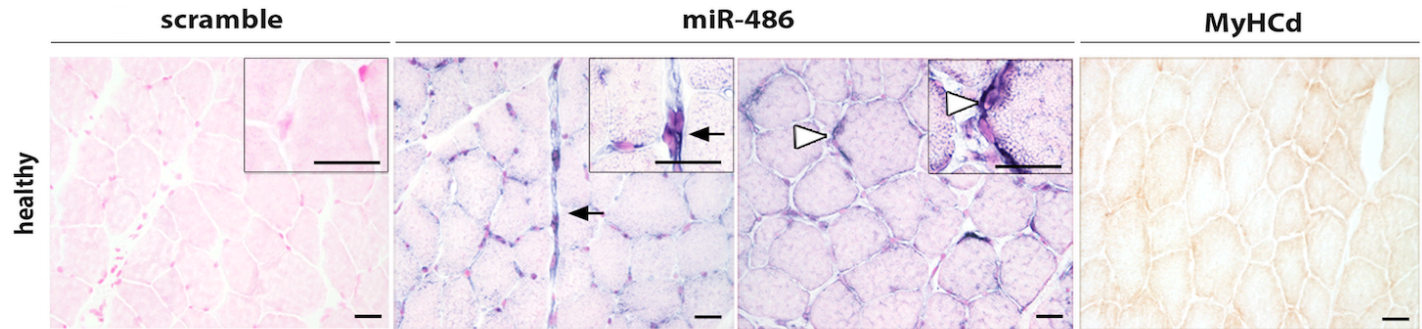
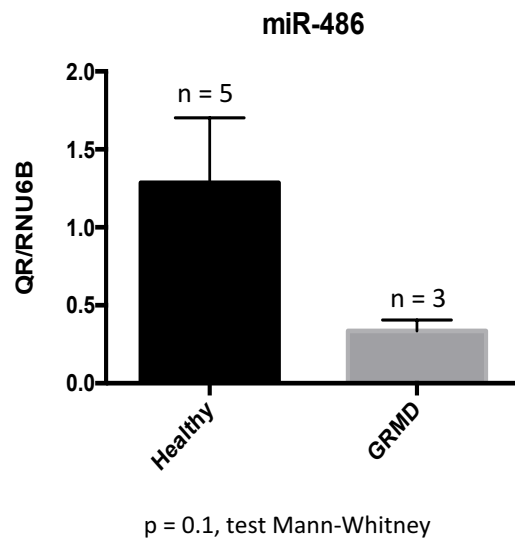
Robriquet, Babarit *et al*, 2016

# Expression du miR-486 chez le chien GRMD



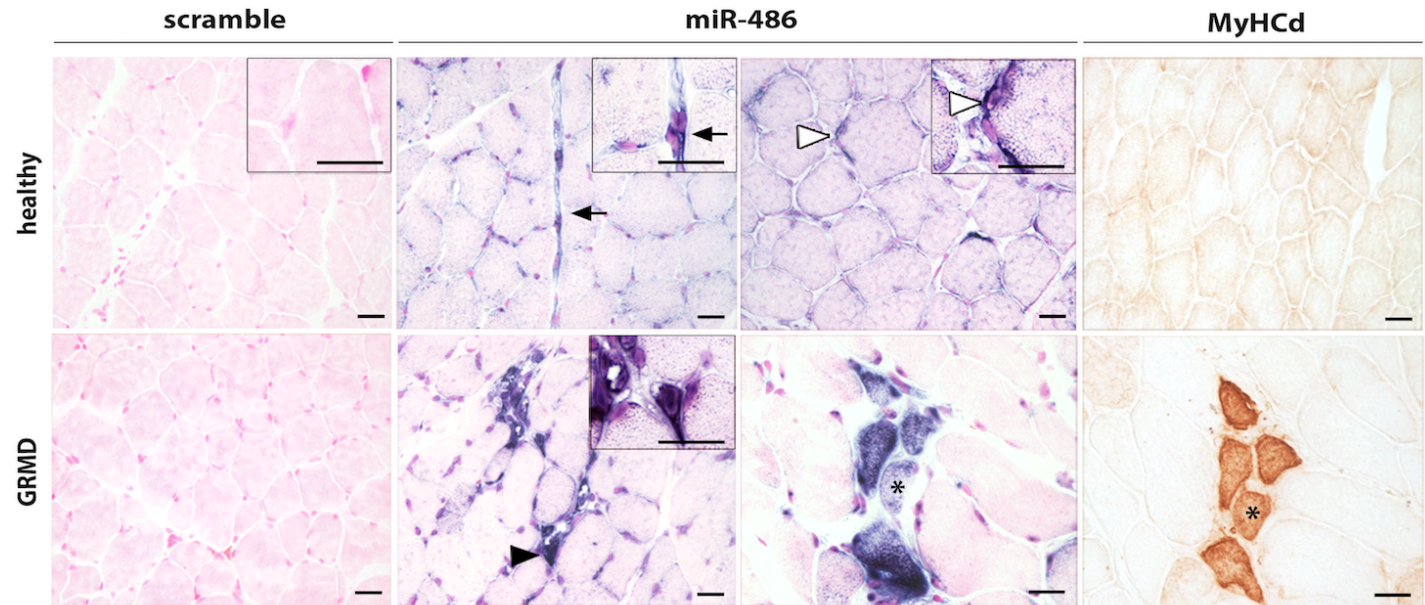
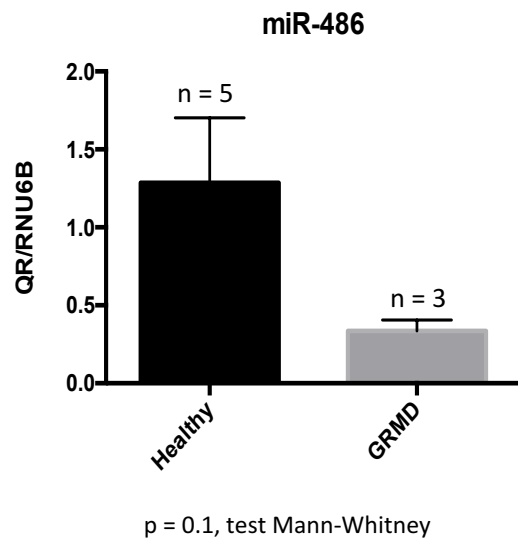
Robriquet, Babarit *et al*, 2016

# Expression du miR-486 chez le chien GRMD



Robriquet, Babarit *et al*, 2016

# Expression du miR-486 chez le chien GRMD



Échelle: 25 µm

Robriquet, Babarit *et al*, 2016

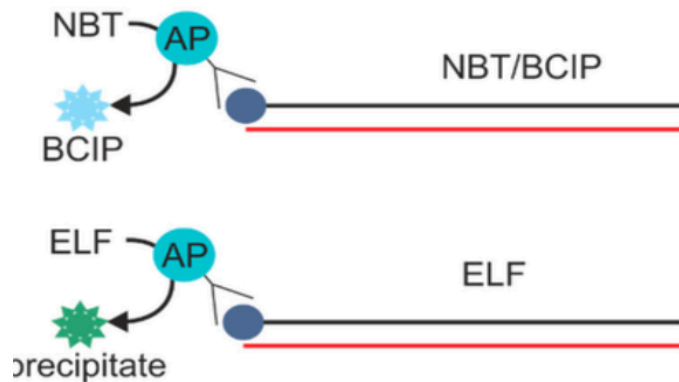


## Conclusion

- Sondes LNA : puissants outils pour la détection de micro-ARNs
- Description du profil d'expression tissulaire des miR-206 et miR-486 chez le chien GRMD
- Les techniques quantitatives ne permettent pas de détecter des dérégulations du profil d'expression

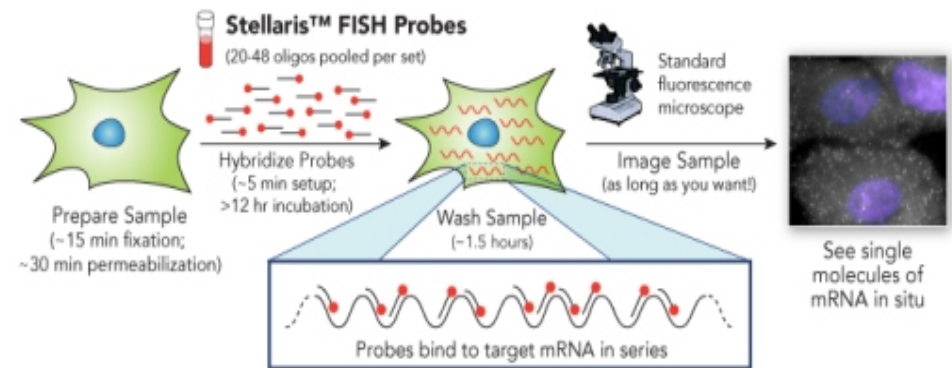
# Perspectives de développement à l'UMR703: Hybridation *in situ* quantitative

## Micro-ARN LNA-ELF-FISH



ELF : Substrat de la phosphatase alcaline hydrolysé en précipité fluorescent

## ARNm SM-FISH



Utilisation de plusieurs sondes oligonucléotidiques pour un même ARNm

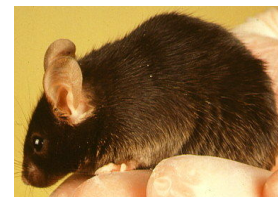


Merci

**UMR 703 PAnTher**



# Dérégulation de micro-ARNs dans la myopathie de Duchenne



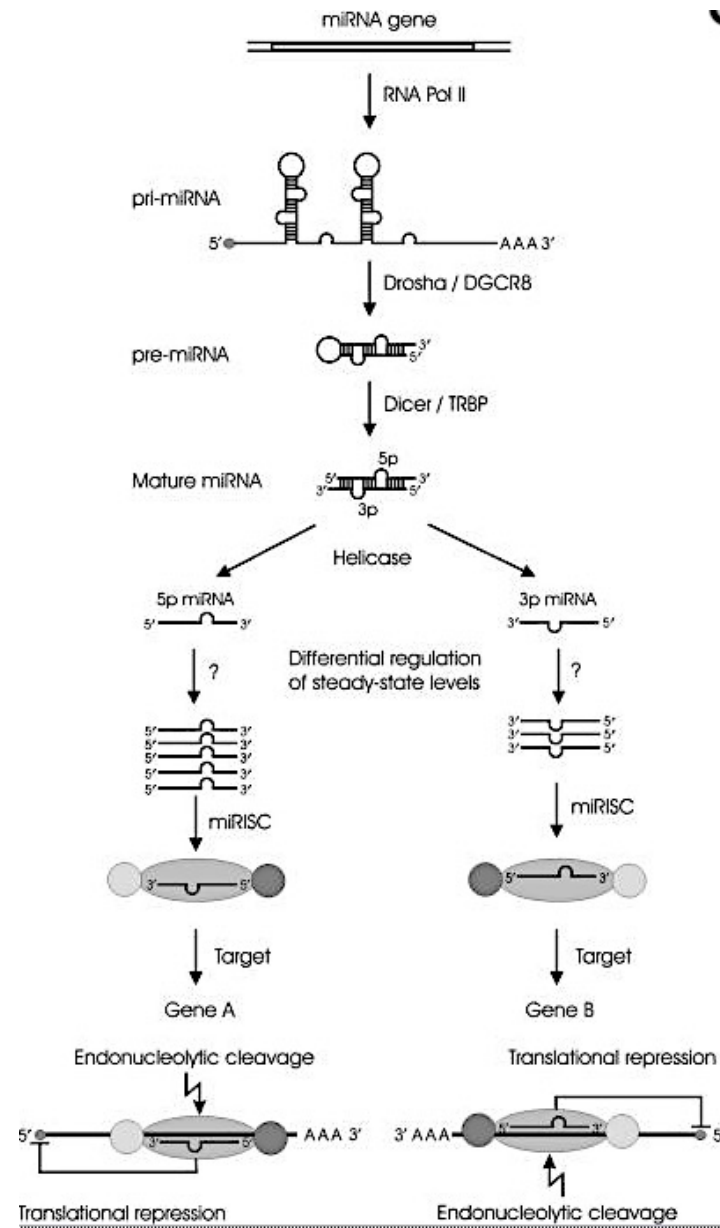
sciencephotolibrary



Robriquet et al, 2015

	Patient DMD	Souris <i>mdx</i>	Chien GRMD
miR-206	Surexprimé	Surexprimé	Non dérégulé
miR-486	Sous exprimé	Sous exprimé	Sous exprimé

# Biogenèse de micro-ARNs



Ro et al, 2007