

5. Techniques Morphologiques et de Marquage In Situ

5.1 Immunohistochimie (IHC)

L'immunohistochimie (IHC) est une technique permettant de détecter et de localiser des antigènes spécifiques au sein des tissus en utilisant des anticorps marqués. Cette méthode repose sur l'interaction spécifique entre un anticorps et son antigène cible, couplée à un système de détection, soit enzymatique (chromogène) soit fluorescent. Elle joue un rôle essentiel dans le diagnostic des pathologies toxiques, en permettant d'identifier des protéines d'intérêt impliquées dans les mécanismes de toxicité cellulaire et tissulaire. Par exemple, l'IHC est utilisée pour détecter la surexpression de certaines enzymes de détoxification hépatique après une exposition prolongée aux toxiques industriels.

- **Détection des antigènes spécifiques** : Cette technique repose sur l'utilisation d'anticorps primaires dirigés contre une protéine cible et d'anticorps secondaires couplés à des marqueurs détectables (enzymes, fluorochromes). Elle permet d'identifier la présence et la localisation d'antigènes dans les cellules et les tissus. Cette méthode est essentielle en toxicologie pour mettre en évidence des biomarqueurs de stress cellulaire, comme les protéines de choc thermique (HSP), ou des marqueurs d'apoptose tels que la caspase-3 clivée. Par exemple, l'immunohistochimie est couramment utilisée pour détecter l'expression du cytochrome P450 dans les hépatocytes, permettant d'évaluer l'impact des substances toxiques sur le métabolisme hépatique.
- **Marquages enzymatiques (DAB, AEC)** : Ces techniques permettent la production d'un signal coloré visible en microscopie optique. Le DAB (3,3'-diaminobenzidine) produit une coloration brune, tandis que l'AEC (3-amino-9-éthylcarbazole) génère une coloration rouge. Ces marquages sont largement utilisés pour la détection de protéines spécifiques dans les échantillons biologiques.
- **Marquages fluorescents** : Ces marquages utilisent des fluorochromes couplés à des anticorps ou des sondes spécifiques, permettant une détection précise et sensible des cibles biologiques en microscopie à fluorescence ou en imagerie confocale. Ils sont particulièrement utiles en toxicologie pour l'étude des interactions moléculaires et l'analyse des altérations cellulaires induites par des toxiques. Exemple : L'immunofluorescence est fréquemment utilisée pour identifier les altérations des mitochondries dans les hépatocytes après exposition à des toxines environnementales.

Exemple : L'immunohistochimie est souvent utilisée pour détecter la surexpression de récepteurs hormonaux dans les cancers du sein, comme les récepteurs aux œstrogènes.

5.2 Hybridation in situ (HIS, FISH)

L'hybridation in situ (HIS) est une technique permettant la détection et la localisation d'acides nucléiques spécifiques (ARN ou ADN) directement dans les tissus biologiques. Cette méthode repose sur l'utilisation de sondes nucléiques complémentaires marquées, qui s'hybrident avec des séquences cibles dans les cellules ou les tissus fixés. Elle est particulièrement utilisée en toxicologie pour détecter des mutations génétiques, des infections virales ou des altérations de l'expression génique. Par exemple, la technique FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) est employée pour mettre en évidence des anomalies chromosomiques dans certaines leucémies et cancers induits par des toxiques environnementaux.

- **Détection d'ARN et d'ADN spécifiques** : Utilisation de sondes nucléiques marquées (fluorescentes ou chromogéniques) pour identifier et localiser des séquences génétiques d'intérêt. Cette technique est couramment utilisée pour la détection de mutations, de virus oncogènes ou d'anomalies chromosomiques dans le cadre de la toxicologie moléculaire. Exemple : L'hybridation in situ fluorescente (FISH) est employée pour repérer les translocations chromosomiques dans les leucémies induites par l'exposition aux agents toxiques.
- **Applications en diagnostic toxicologique** : Détection de mutations ou d'anomalies génétiques.

Exemple : La technique FISH est utilisée pour détecter des anomalies chromosomiques dans certaines leucémies, facilitant ainsi le choix du traitement adapté.

5.3 Microscopie électronique et ultrastructures tissulaires

- **Principes de la microscopie électronique à transmission (MET)** : La microscopie électronique à transmission (MET) permet une observation détaillée des structures subcellulaires grâce à l'utilisation d'un faisceau d'électrons traversant des coupes ultrafines de tissus. Elle est particulièrement utile en toxicologie pour examiner les modifications ultrastructurales des cellules exposées aux toxiques. Cette technique est essentielle pour l'étude des organites intracellulaires, comme les mitochondries, les lysosomes et le réticulum endoplasmique, afin d'évaluer les effets des substances toxiques au niveau subcellulaire. Par exemple, la MET permet de visualiser les altérations des crêtes mitochondriales induites par l'exposition à des pesticides ou des métaux lourds, indiquant un stress oxydatif et une altération de la production énergétique cellulaire.

- **Microscopie électronique à balayage (MEB) :** La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique permettant d'obtenir des images détaillées de la surface des cellules et des tissus en analysant les électrons rétrodiffusés et secondaires. Elle repose sur l'interaction des électrons du faisceau incident avec les atomes de l'échantillon, produisant des images à haute résolution de la morphologie cellulaire. Cette approche est particulièrement utile pour observer les modifications morphologiques des tissus en réponse aux toxiques. Par exemple, le MEB est utilisé pour examiner l'altération de la surface des cellules pulmonaires après une exposition prolongée à des particules fines ou des fumées toxiques.

Techniques de cryofracture : La cryofracture est une méthode complémentaire en microscopie électronique permettant l'étude des membranes biologiques et des ultrastructures intracellulaires. Elle consiste à congeler rapidement un échantillon avant de le fracturer sous vide, suivi d'un dépôt de platine ou de carbone pour créer une réplique visualisable en MEB ou MET. Cette technique est utilisée en toxicologie pour observer l'organisation membranaire et les interactions entre les organites internes après exposition aux toxiques, notamment dans les cellules rénales et hépatiques affectées par des métaux lourds ou des solvants organiques.