

# Techniques de biologie cellulaire

## Techniques de Biologie Cellulaire (TBC) Crédits : 5 Coefficient : 3

### Contenu de la matière :

techniques de préparation de coupes fines de tissus animaux; visualisation des structures endo-cellulaires dans leur état réel et leurs modifications dans différentes conditions d'environnement par microscopie optique, microscopie confocale; microscopie électronique pour l'étude de l'ultra-structure cellulaire ; techniques de radiomarquage de molécules (isotopes radioactifs, fluorophores...) afin d'identifier, de localiser et de quantifier les métabolites; analyse des interactions protéine-protéine in vivo par le FRET; techniques immunocytologiques et immunohistologiques (immunohistochimie, immunofluorescence) pour détecter sur des coupes de tissu ou des cellules entières préalablement fixées et perméabilisées) un antigène cellulaire spécifique à l'aide d'un antisérum dirigé contre cet antigène, hybridation in situ, RNAi ; pontage moléculaire, cytométrie en flux, technique de culture des cellules animales et des levures et de leur analyse par microscopies.

# LES TISSUS DE L'ORGANISME

## GENERALITES (1)

Les **CELLULES** sont des **unités hautement organisées**.

Elles ne fonctionnent **pas de manière isolée**.

Elles **travaillent ensemble** dans un groupe appelé **tissu**.

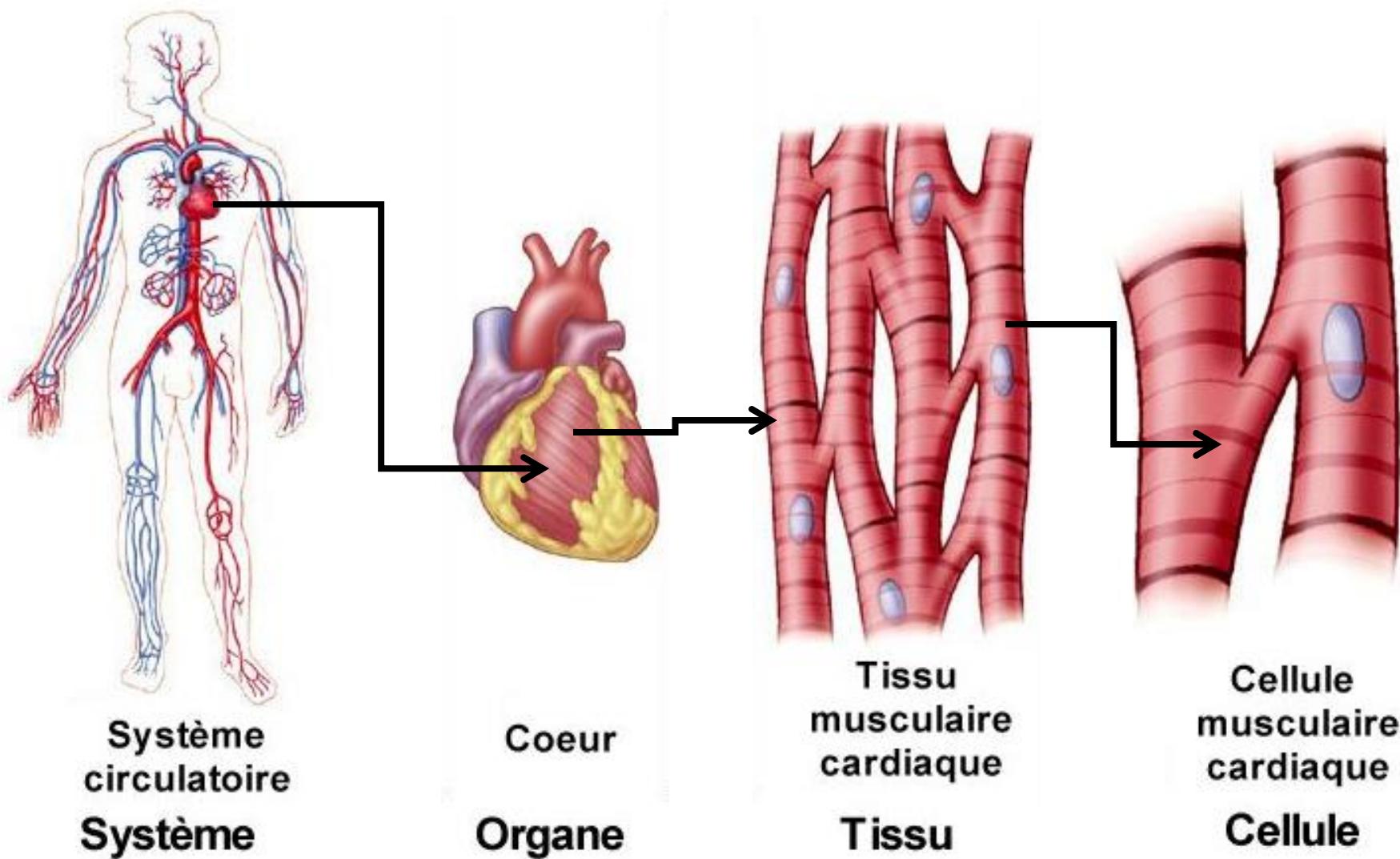
L'étude des tissus s'appelle **l'HISTOLOGIE**

On classe les tissus corporels en **4 types principaux** :

- LE TISSU CONJONCTIF
- LE TISSU EPITHELIAL
- LE TISSU MUSCULAIRE
- LE TISSU NERVEUX

# GENERALITES (2)

## Rappel sur les niveaux d'organisation



# 1. LE TISSU CONJONCTIF

# Le tissu conjonctif (1)

## Description (1)

Le tissu conjonctif est un **tissu de « remplissage »**,  
C'est le plus répandu dans le corps.

Il est formé de 3 éléments :

- des **cellules non jointives**,
- une **substance fondamentale** ou matrice ,
- des **fibres**.

→ Ce tissu est **innervé** et **vascularisé!!!**

## Le tissu conjonctif (2)

### Description (2)

#### **Rôles du tissu conjonctif :**

Il **unit, soutient et renforce** d'autres tissus corporels.

# Le tissu conjonctif (3)

## 1.1 Composants du tissu conjonctif (1)

### **a) LES CELLULES :**

- Elles sont de forme très **variables**,
- Elles **fabriquent** les fibres et la substance fondamentale.
- Elles ne **sont pas jointives**,

Il en existe **différents types selon le tissu conjonctif concerné**:

- ✓ Les fibroblastes
- ✓ Les macrophages
- ✓ Les GB, GR et plaquettes
- ✓ Les adipocytes
- ✓ Les chondrocytes, les chondroblastes
- ✓ Les ostéoblastes, les ostéocytes

## Le tissu conjonctif (4)

### 1.1. Composants du tissu conjonctif (2)

#### **b) LA SUBSTANCE FONDAMENTALE ou matrice**

- Elle **soutient** et **unit** les cellules.
- Elle est homogène, a la consistance **d'un gel**
- Elle est formée **d'eau et de sels minéraux**
- Elle est **produite par les fibroblastes**.

## Le tissu conjonctif (5)

### 1.1. Composants du tissu conjonctif (3)

#### c) **ELEMENTS FIBREUX ou fibres :**

3 types de fibres s'entrelacent entre les cellules.

→ **Les fibres de collagène** : Protéines résistantes et longues, elles permettent une certaine souplesse.

*Ex. de localisation: os, tendons, cartilages, ligaments*

→ **Les fibres élastiques** : plus petites, donnent de la force et sont très étirables.

*Ex. de localisation: peau, vaisseaux, poumons*

→ **Les fibres de réticuline** : soutiennent les parois des vaisseaux et forment la charpente des organes mous.

*Ex. de localisation: rate, ganglions lymphatiques*

## Le tissu conjonctif (6)

### 1.2. Les différents types de tissus conjonctifs (1)

→ Les différents types de tissus conjonctifs sont décrits **selon leurs constituants**.

Ainsi on distingue:

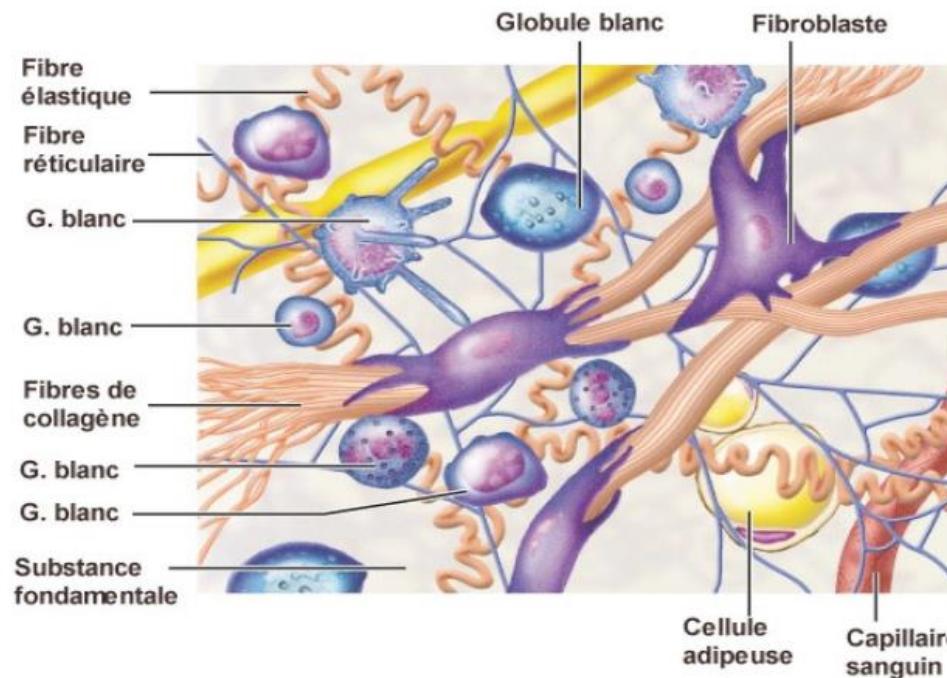
- Le tissu conjonctif proprement dit ou lâche
- Le tissu adipeux
- Le tissu conjonctif dense
- Le tissu cartilagineux
- Le tissu osseux
- Le tissu sanguin

# Le tissu conjonctif (7)

## 1.2. Les différents types de tissus conjonctifs (2)

### a) **Tissu conjonctif lâche** :

- Cellules, fibres, matrice en même proportion
- Il assure l'**élasticité** et le **soutien** (derme, vaisseaux sanguins)



# Le tissu conjonctif (8)

## 1.2. Les différents types de tissus conjonctifs (3)

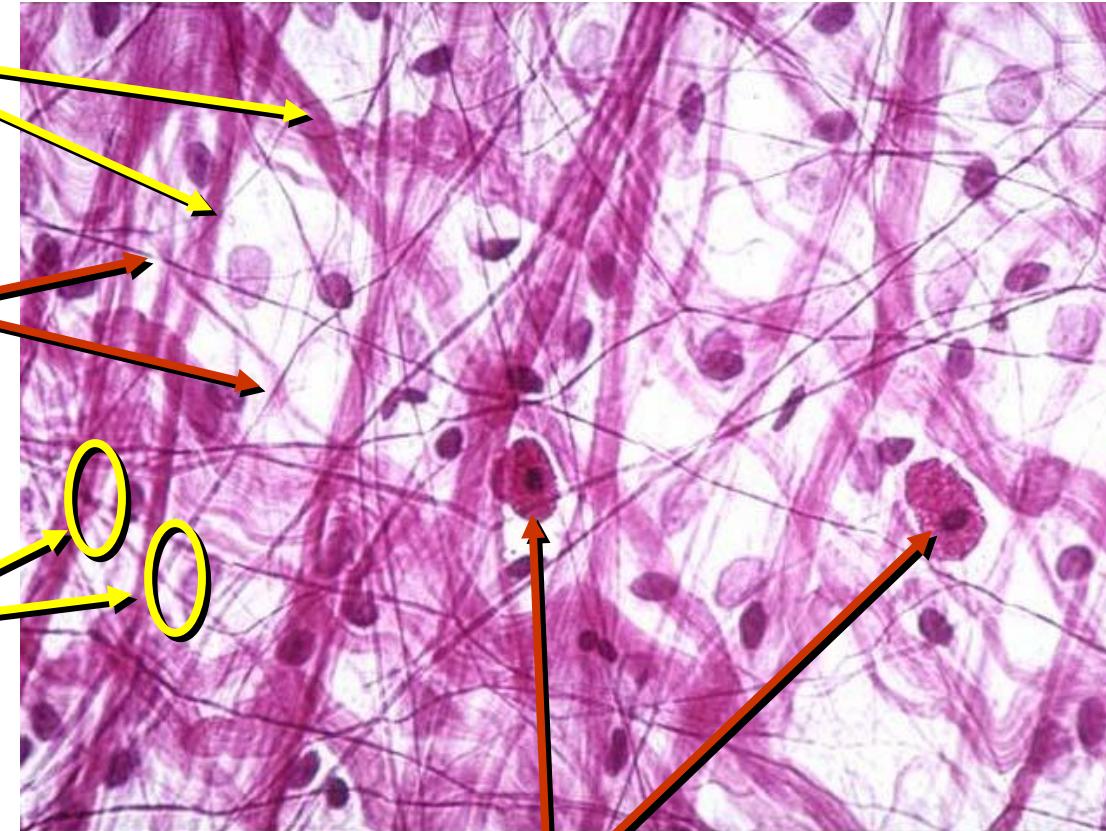
**Fibres de collagènes**

(en rose)

**Fibres élastiques**

(en noir)

**Noyaux de fibroblastes**



→ **Microscopie optique du tissu conjonctif lâche**

**Globules blancs**

**Note:** Les fibres de réticuline sont trop fines pour être vues au microscope optique.

## Le tissu conjonctif (9)

### 1.2. Les différents types de tissus conjonctifs (4)

#### **b) le Tissu conjonctif adipeux :**

→ Tissu adipeux = cellules adipeuses (adipocytes) + fibres de réticuline.

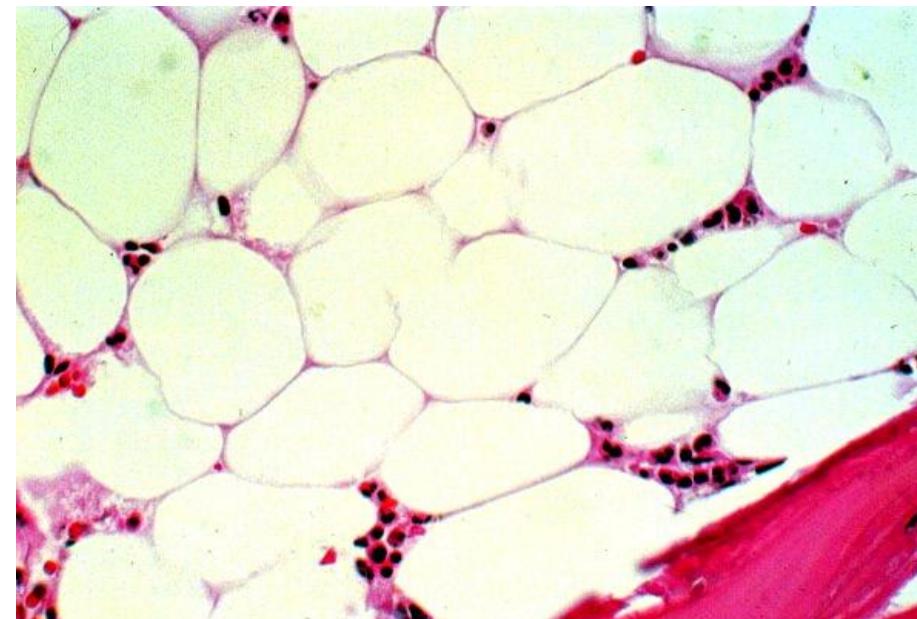
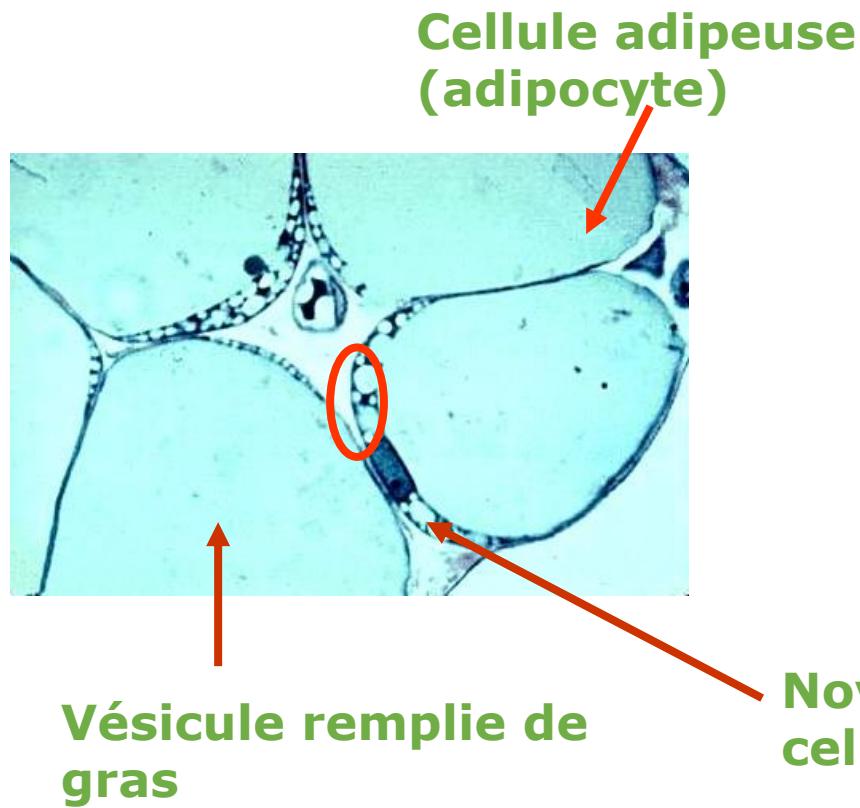
C'est le plus grand réservoir lipidique de l'organisme.

Il assure plusieurs rôles:

- Rôle énergétique
- Rôle de protection contre les chocs
- Rôle d'isolant thermique

# Le tissu conjonctif (10)

## 1.2. Les différents types de tissus conjonctifs (5)



→ Microscopie optique du tissu adipeux

Noyau et organites cellulaires

## Le tissu conjonctif (11)

### 1.2. Les différents types de tissus conjonctifs (6)

#### c) le **Tissu conjonctif dense**

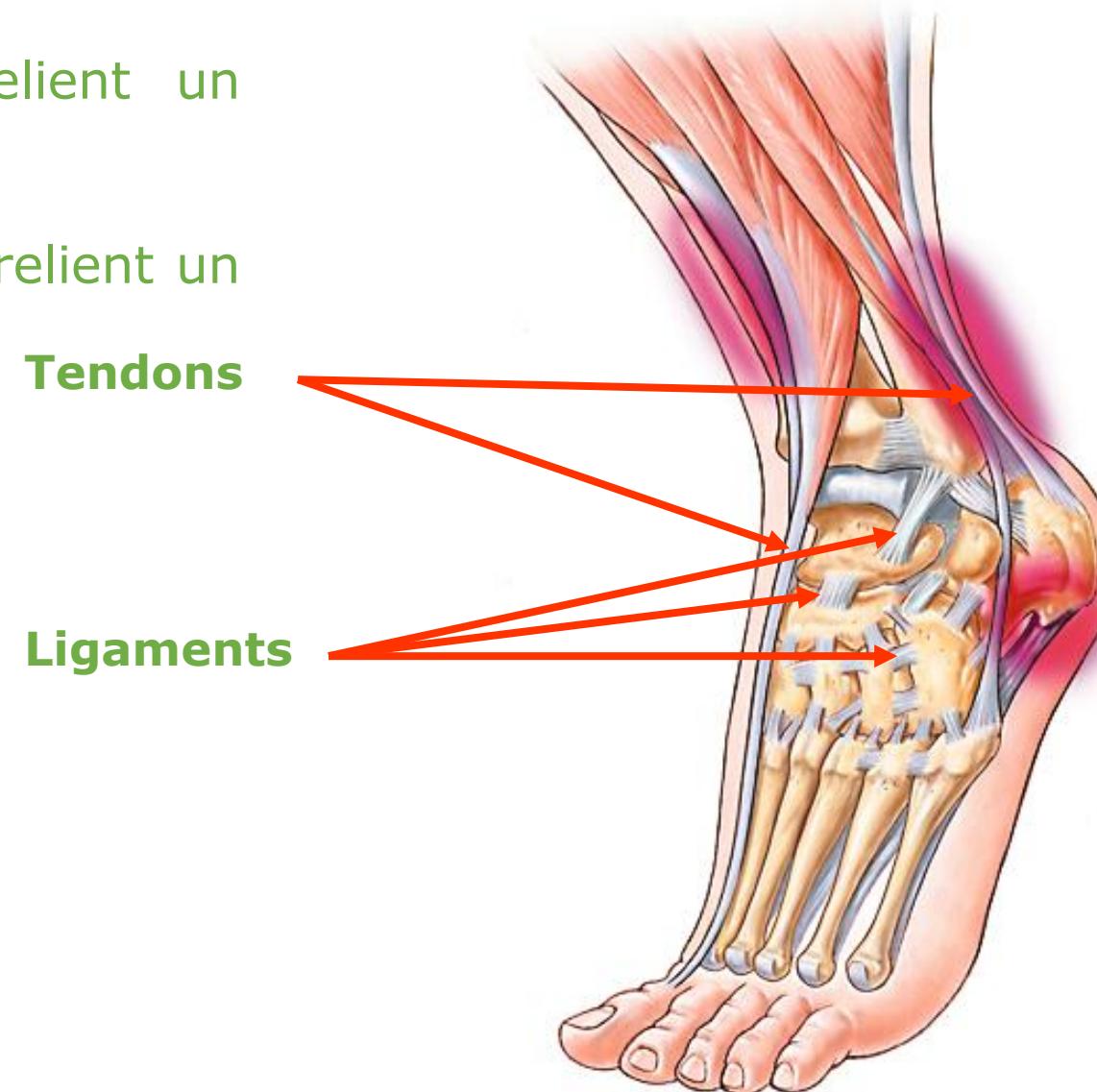
→ Assemblage très dense de **fibres parallèles de collagène**

→ Il apporte **force** et **solidité** des points d'attaches

Ex : *ligaments, tendons*

→ **Remarque :**

- **Les tendons** relient un muscle à un os
- **Les ligaments** relient un os à un os



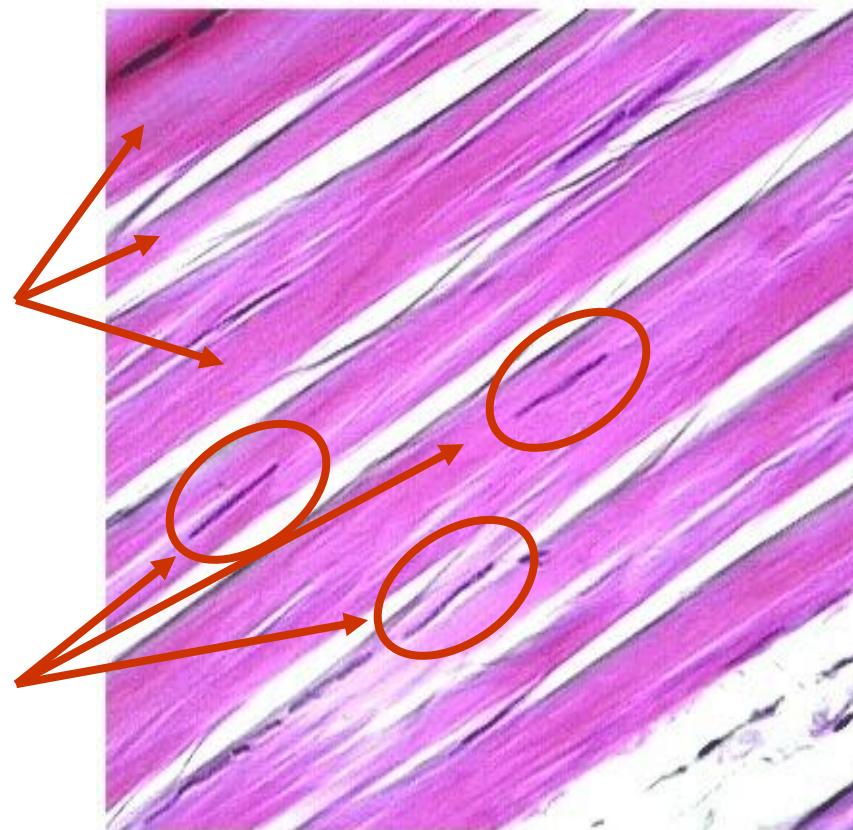
# Le tissu conjonctif (12)

## 1.2. Les différents types de tissus conjonctifs (7)

→ **Microscopie optique du tissu conjonctif dense**

**Fibres de collagène**

**Noyaux des fibroblastes**



# Le tissu conjonctif (13)

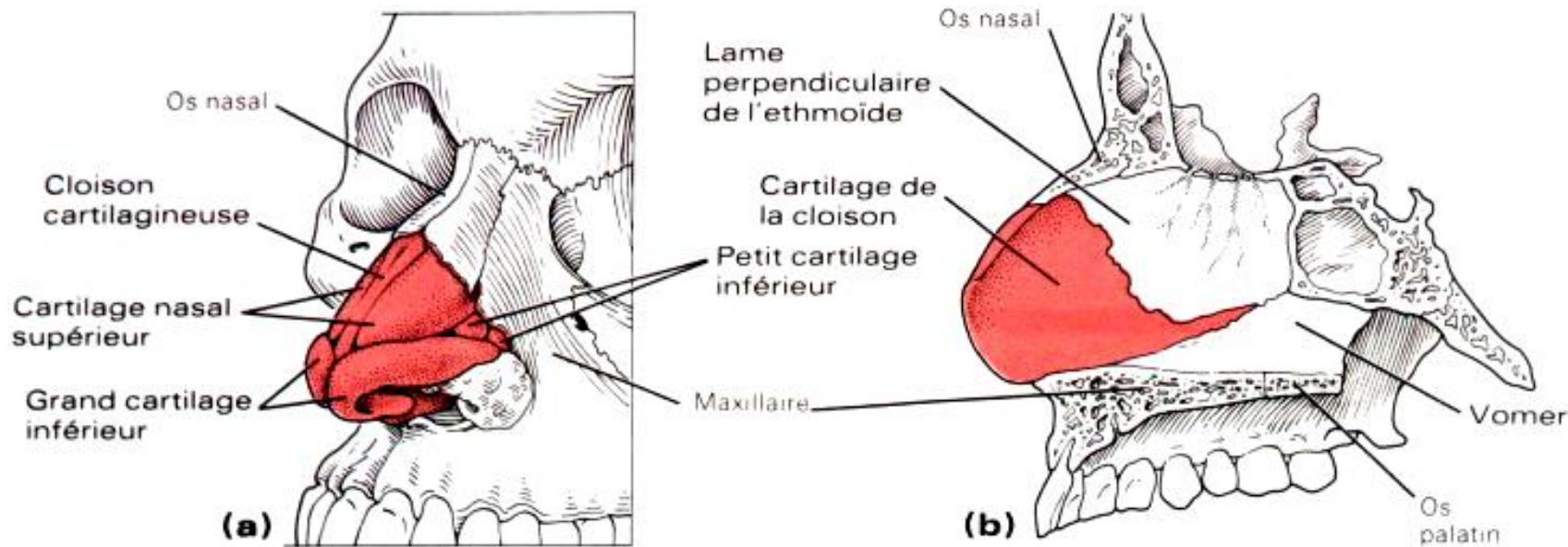
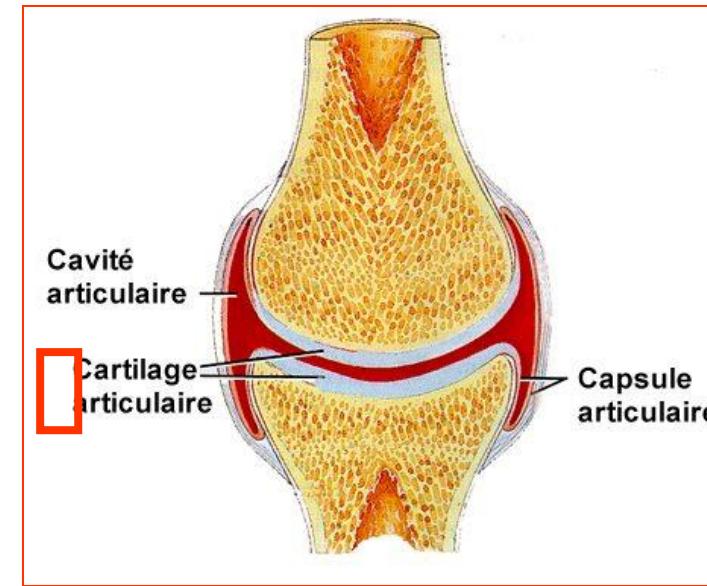
## 1.2. Les différents types de tissus conjonctifs (8)

### d) le **Tissu cartilagineux**

- **Fibres de collagène** enrobées d 'une substance fondamentale solide: **chondroïtine-phosphate**
- Fibres et substance fondamentale sont sécrétées par des cellules indifférenciées:  
**Les chondroblastes**  
**(Note:** Chondroblastes matures = **chondrocytes**)
- Le cartilage **supporte des tensions** considérables!!

## → Remarque:

- Le **cartilage** recouvre les **articulations** et forme certaines **parties souples** du corps comme l'extrémité du nez ou le larynx (la "pomme d'Adam").
- **L'arthrite** est causée par la destruction du cartilage recouvrant les articulations.



# Le tissu conjonctif (14)

## 1.2. Les différents types de tissus conjonctifs (9)

- Contrairement aux autres tissus conjonctifs, le cartilage **ne contient ni vaisseaux, ni nerfs**  
*Ex : articulation, nez, larynx, trachée*



Chondrocytes

Chondroïtine-phosphate  
et collagène (on ne peut  
pas voir le collagène ici...)

→ Microscopie optique du tissu  
cartilagineux

## Le tissu conjonctif (15)

### 1.2. Les différents types de tissus conjonctifs (10)

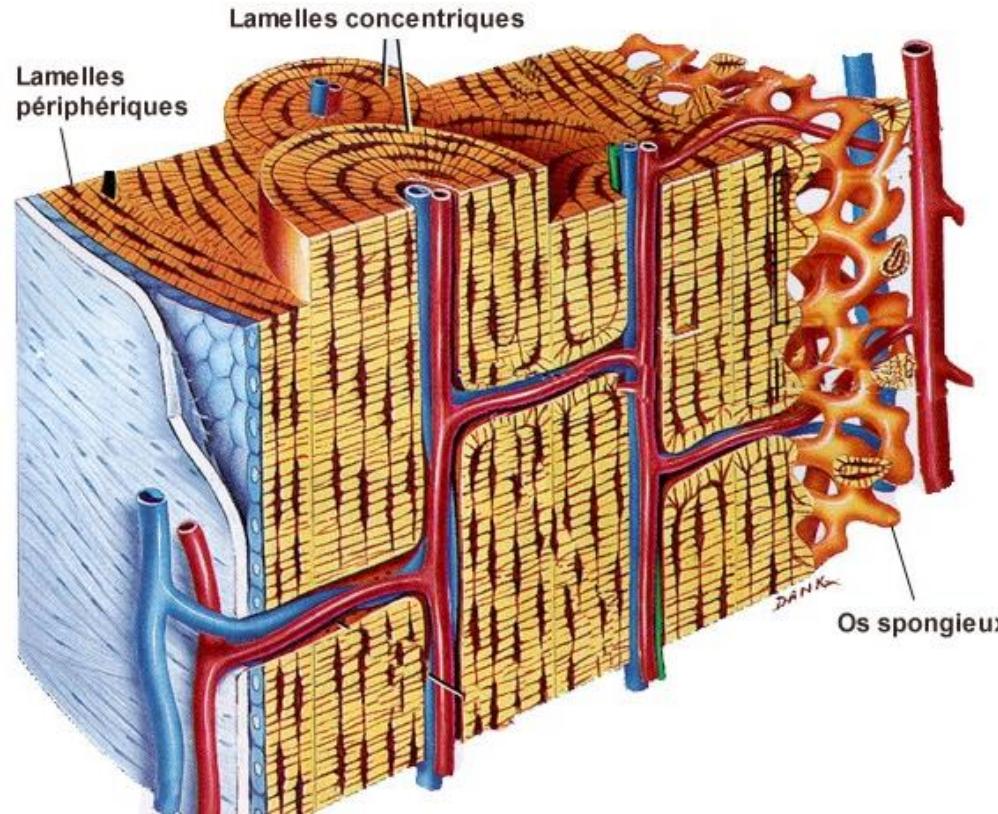
#### e) Le tissu osseux :

- Il assure la **dureté**, le **soutien** des tissus mous et **protège** les structures délicates.
- Il est formé de cellules, **les ostéoblastes** qui sécrètent:
  - Fibres de collagènes (Flexibilité)
  - Minéraux, phosphates et calcium (Rigidité)

**Note:** *Ostéoblastes matures = ostéocytes*

- On retrouve le tissu osseux dans **le squelette**
- Contient des **vaisseaux sanguins**

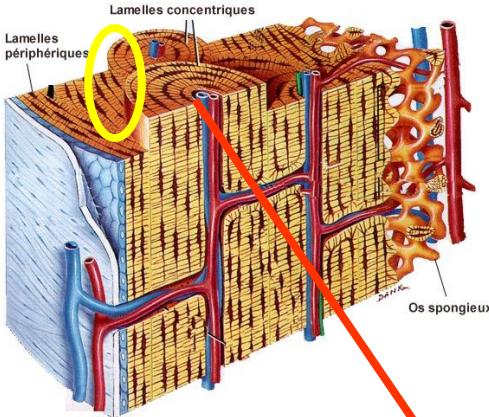
→ **Remarque: l'Os**



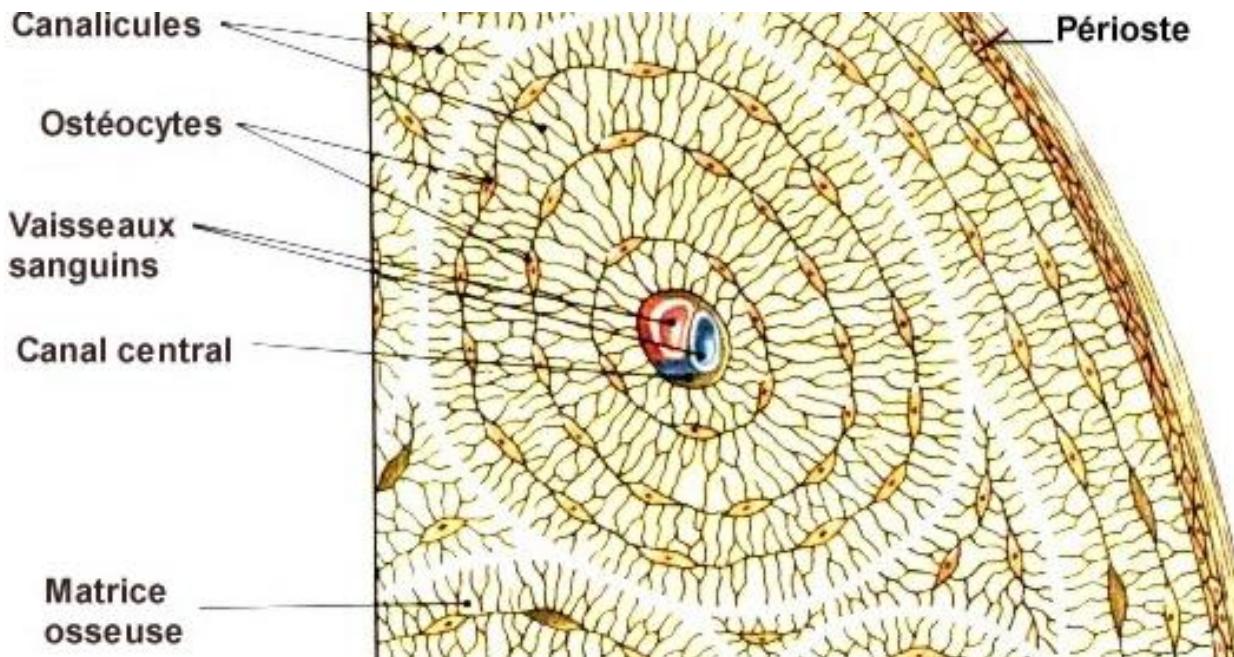
Un **os long**, comme ceux des jambes ou des bras, est formé de **matière osseuse disposée en lamelles périphériques** (qui font tout le tour de l'os) et **en colonnes faites de lamelles concentriques**). Remarquez **les vaisseaux sanguins qui irriguent le tissu**. On retrouve une veine et un artère au centre de chacune des colonnes osseuses.

# Le tissu conjonctif (16)

## 1.2. Les différents types de tissus conjonctifs (11)



Les ostéocytes sont reliés entre eux par de petits canaux, **les canalicules**.



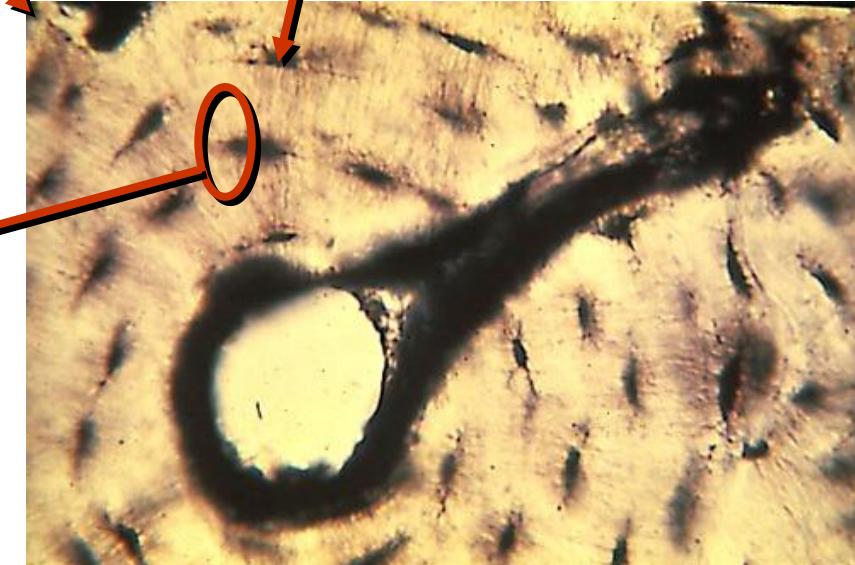
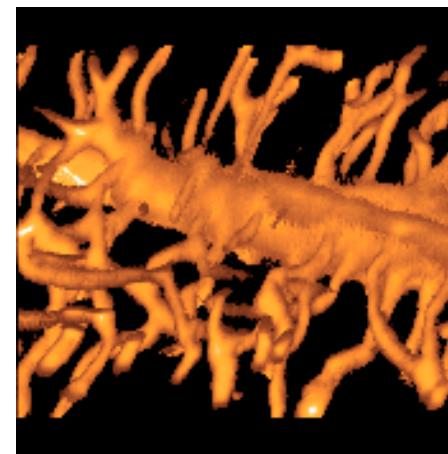
# Le tissu conjonctif (17)

## 1.2. Les différents types de tissus conjonctifs (12)



Colonne faite de lamelles concentriques

Ostéocyte



# Le tissu conjonctif (18)

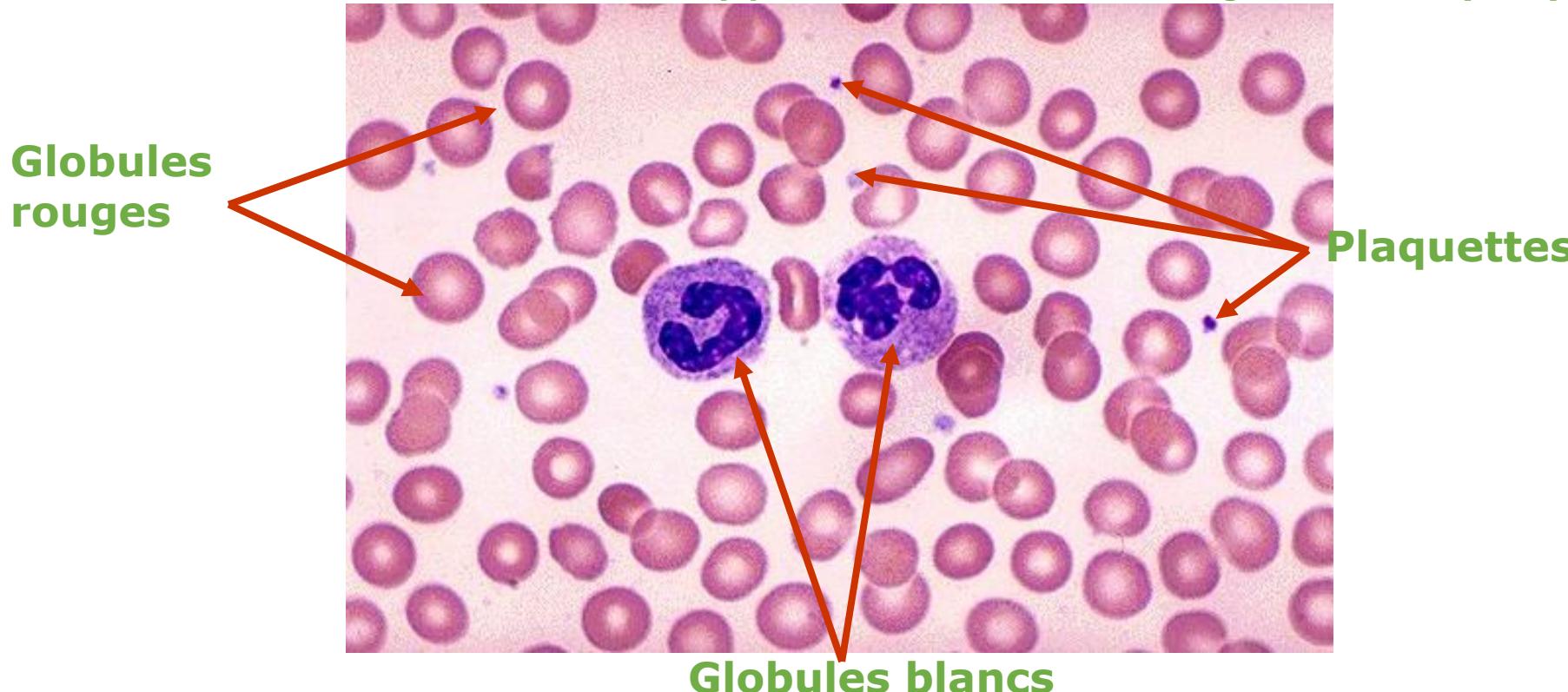
## 1.2. Les différents types de tissus conjonctifs (13)

### f) **Le tissu sanguin :**

- Formé de **cellules**: les éléments figurés du sang (EFS) baignant dans **un liquide**: le plasma.
- EFS:
  - **Globules rouges** (érythrocytes)
  - **Globules blancs** (leucocytes)
  - **Plaquettes** (thrombocytes)
- C'est donc un **tissu conjonctif liquide**...mais qui **peut devenir solide** suite à la coagulation

# Le tissu conjonctif (19)

## 1.2. Les différents types de tissus conjonctifs (14)



Les **globules rouges** sont plus nombreux et plus petits que les globules blancs. Notez que, contrairement aux globules blancs, **les plaquettes et les globules rouges ne contiennent pas de noyau**.

Les plaquettes jouent un rôle important dans la coagulation sanguine.

## 2. LE TISSU EPITHELIAL ou EPITHELIUM

# Le tissu épithélial (1)

## 2.1. Caractéristiques des tissus épithéliaux

- Ce tissu, à la différence du conjonctif, est composé **presque exclusivement de cellules**.
- Il est composé de **cellules jointives**, disposées en **couches continues, simples ou multiples**
- Un épithélium est **toujours polarisé**
- Un épithélium est **non vascularisé** mais **innervé**
- On distingue:
  - L'épithélium de revêtement
  - L'épithélium glandulaire

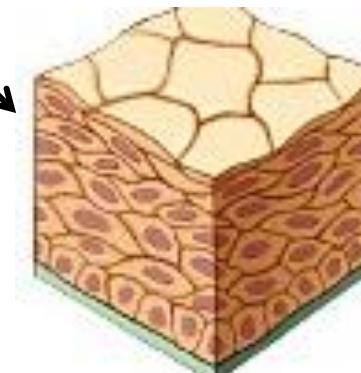
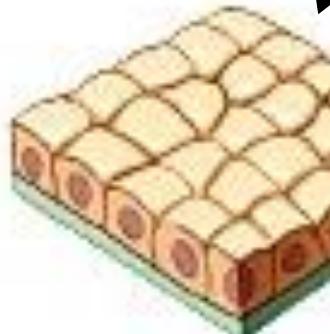
## Le tissu épithélial (2)

### 2.2. L'épithélium de revêtement (1)

→ Sa classification se fait **selon le nombre de couches de cellules** et selon **la forme de ces cellules**

→ Pour la classification selon le nombre de couche de cellules, on distingue:

- Les épithéliums **simples** (une seule couche)
- Les épithéliums **stratifiés** (plusieurs couches)



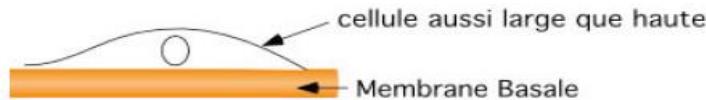
# Le tissu épithélial (3)

## 2.2. L'épithélium de revêtement (2)

→ La forme des cellules peut être:

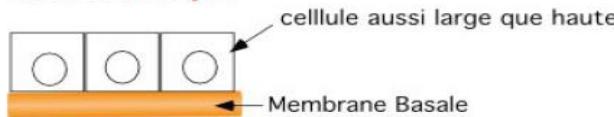
- **Pavimenteuse** = aplatis. *Ex: cellules des alvéoles pulmonaires*

Cellule pavimenteuse



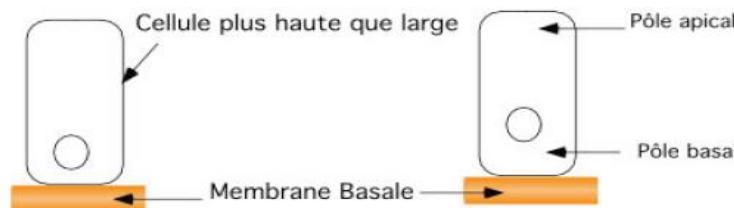
- **Cubiques** = en forme de cube ou de pavé  
*Ex: cellules des ovaires, de l'intestin*

Cellule cubique



- **Cylindriques** = allongée. *Ex: Cellules du tube digestif*

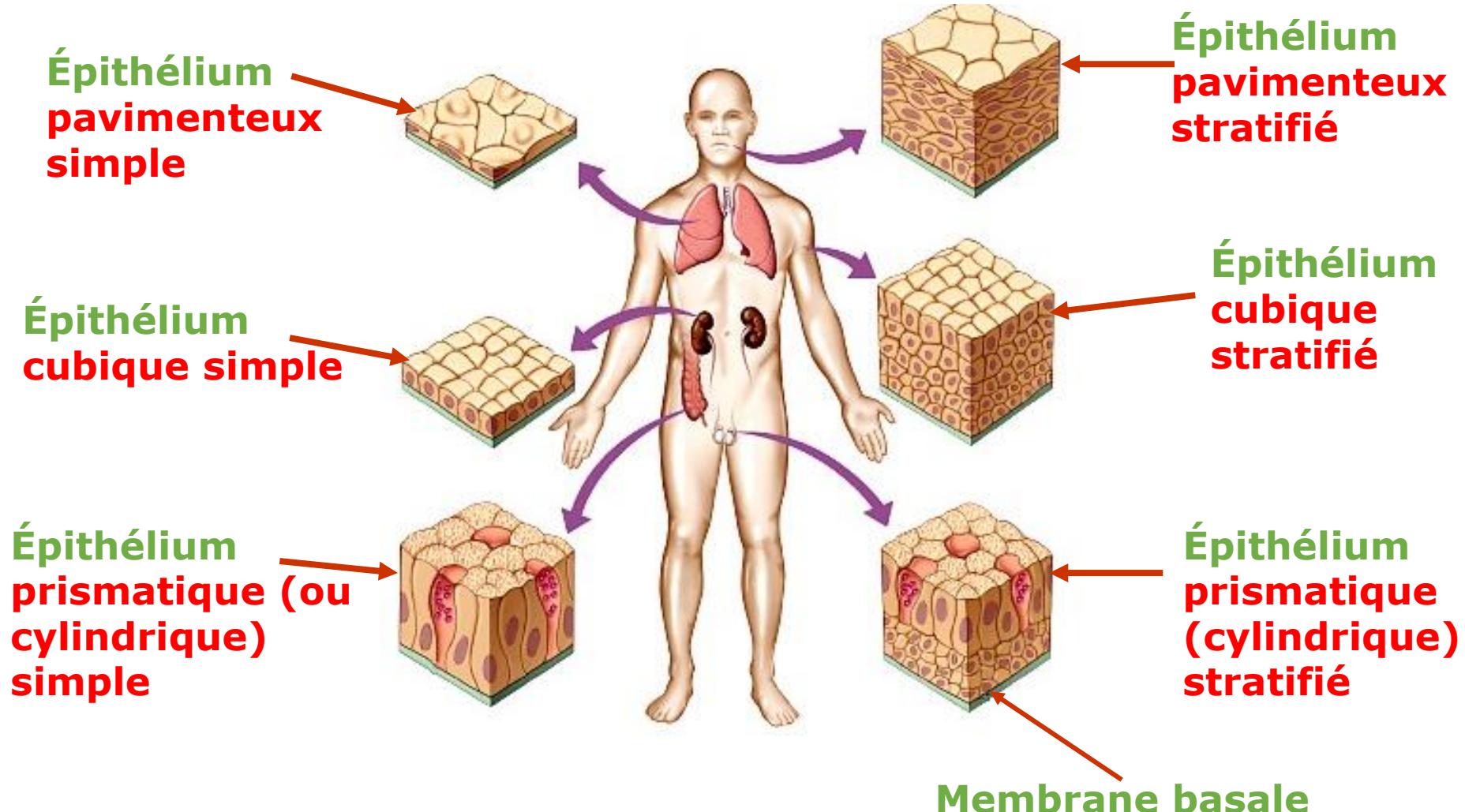
Cellule prismatique



# Le tissu épithélial (4)

## 2.2. L'épithélium de revêtement (3)

Les épithéliums sont classés selon **la forme des cellules** et le fait qu'il y ait **une ou plusieurs couches** de cellules.



# Le tissu épithélial (5)

## 2.2. L'épithélium de revêtement (4)

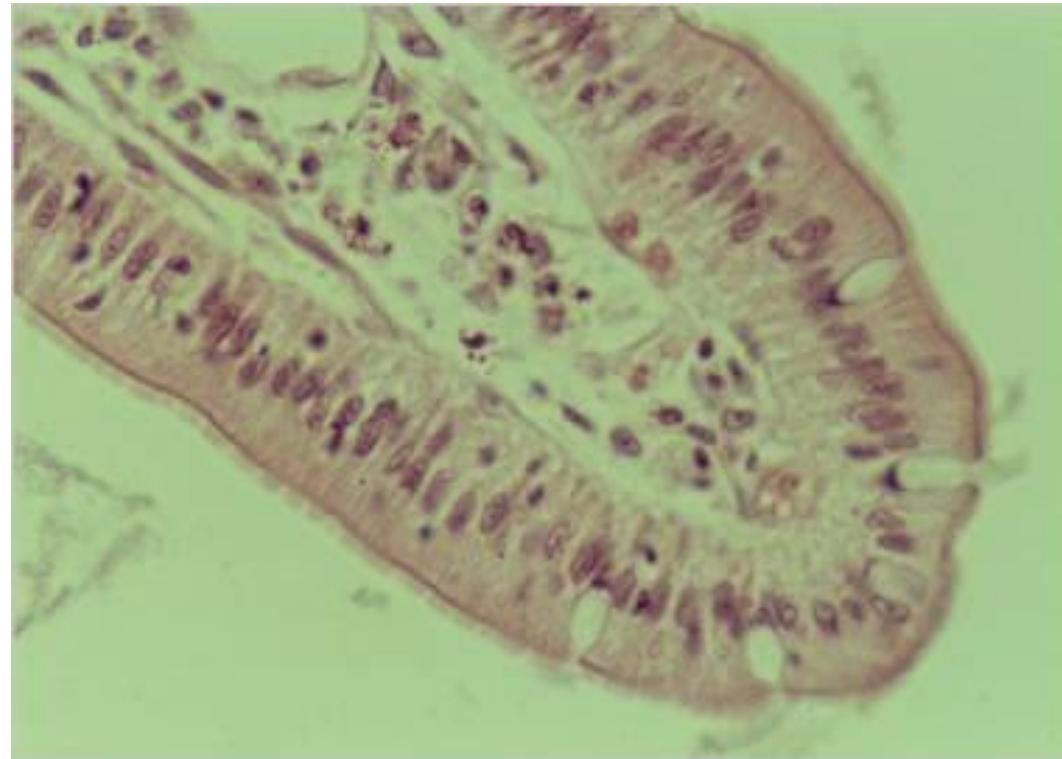


- 1. Cellules ciliées** : chacune se caractérise par une ligne foncée.
- 2. Cellule sécrétrice** : son cytoplasme fait saillie dans la lumière.

→ **Épithélium simple cylindrique avec cellules ciliées et cellules sécrétrices** (cellules de l'oviducte).

# Le tissu épithélial (6)

## 2.2. L'épithélium de revêtement (5)

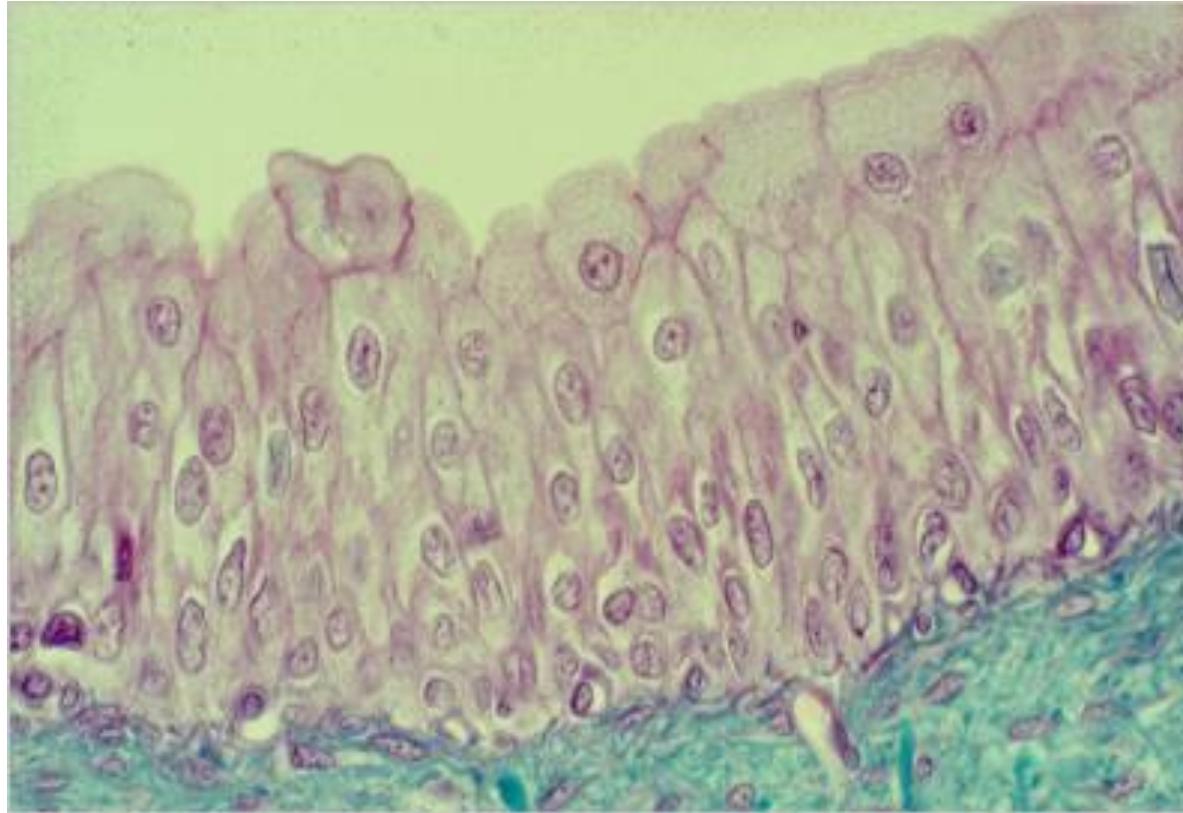


→**Épithélium simple cylindrique avec cellules munies d'un plateau strié et cellules caliciformes.**

Les **cellules caliciformes** produisent des **glycoprotéines** qui **protègent et lubrifient le revêtement interne** de l'intestin. La durée de vie de ces cellules se situe entre 2 à 4 jours.

# Le tissu épithélial (7)

## 2.2. L'épithélium de revêtement (6)



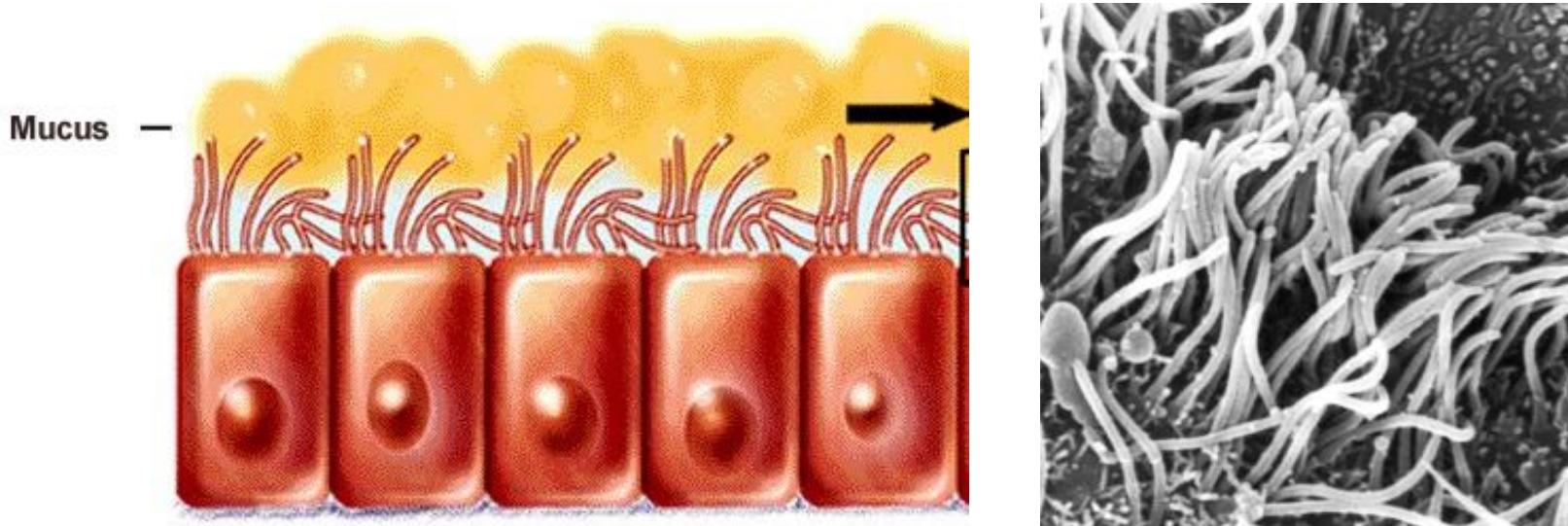
### →Épithélium de transition ou pseudostratifié

Il s'agit d'une section transversale de **l'uretère**. Cet épithélium comporte une couche basale. Les cellules grossissent au fur et à mesure qu'elles s'éloignent de la couche basale.

# Le tissu épithélial (6)

## 2.2. L'épithélium de revêtement (5)

→ Dans certains cas, les cellules sont **ciliées** :



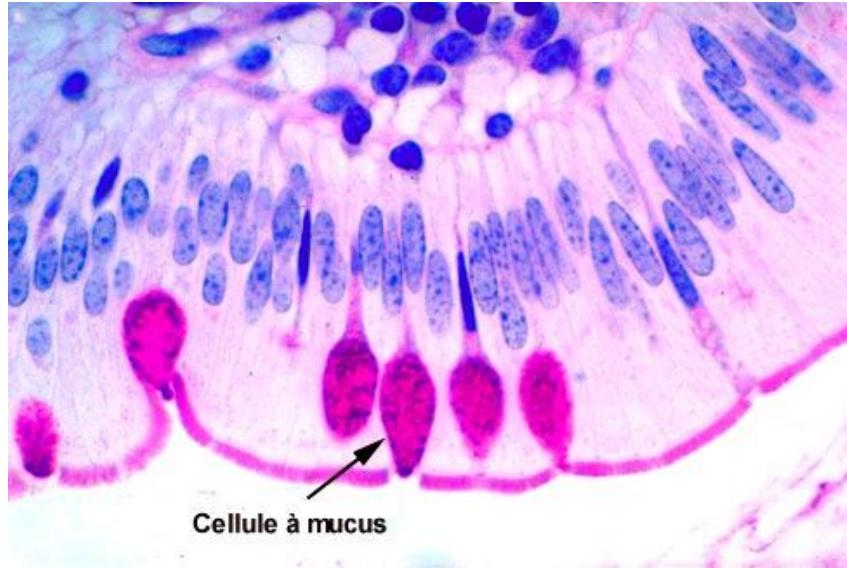
→ **Cellules ciliées**, responsables du **déplacement du mucus dans les voies respiratoires**. Cet épithélium recouvre donc les voies respiratoires

Certaines cellules de cet épithélium cylindrique simple sécrètent un liquide visqueux, le **mucus**. Ce mucus **piège la plupart des poussières et bactéries** qui risqueraient d'atteindre les fragiles alvéoles pulmonaires. Le mouvement des cils des cellules remonte constamment le mucus vers la gorge où il est avalé (ou craché par terre pour les plus malpropres!).

# Le tissu épithélial (7)

## 2.2. L'épithélium de revêtement (6)

→ Certaines cellules épithéliales peuvent **sécréter des substances**. Ex: *cellules à mucus*



→ **Cellules à mucus de l'intestin** (épithélium prismatique simple)  
La cellule contient une **grosse vésicule remplie de mucus** (en rose sur l'image). C'est ce mucus qui est sécrété par la cellule.

→ **L'épithélium des voies respiratoires** comme celui des **voies digestives** (de la bouche à l'anus) contient des **cellules à mucus**.

# Le tissu épithélial (8)

## 2.2. L'épithélium de revêtement (7)

### Les fonctions du tissu épithélial de revêtement:

#### → Protection :

- **Mécanique.** *Ex : la peau: épiderme + kératine*
- **Chimique.** *Ex : l'épithélium intestinal fabrique du mucus.*

#### → Fonction sensorielle. *Ex: cellules olfactives et gustatives*

#### → Fonction d'échange. *Ex: Replis et microvillosités de l'épithélium intestinal augmentent la surface d'échange et facilite l'absorption des nutriments.*

#### → Fonction de mouvement.

*Ex : l'épithélium des bronches est constitué de cellules ciliées qui font avancer le mucus vers l'extérieur*

# Le tissu épithélial (9)

## 2.3. L'épithélium glandulaire (1)

L'épithélium glandulaire exerce la fonction de **secrétions**

On distingue:

- Les **GLANDES ENDOCRINES**.

*Ex: hypophyse, thyroïde, glandes surrénales...*

- Les **GLANDES EXOCRINES**.

*Ex: glandes sébacées, sudoripares, lacrymales...*

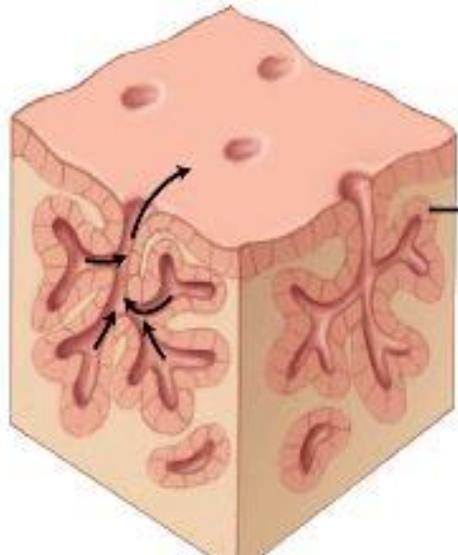
Certaines sont **mixtes** (ou **amphicrines**).

*Ex: le pancréas, gonades (ovaires, testicules)*

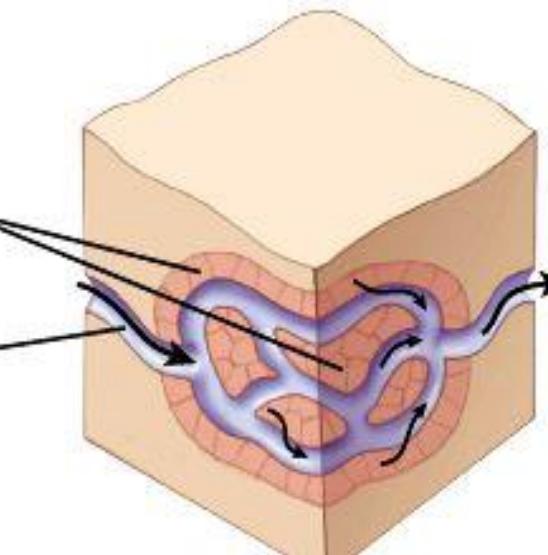
# Le tissu épithélial (10)

## 2.3. L'épithélium glandulaire (2)

**Glande exocrine**



**Glande endocrine**



→ Une glande **exocrine** sécrète des substances **hors du corps**

→ Une glande **endocrine** sécrète des substances **dans le sang**

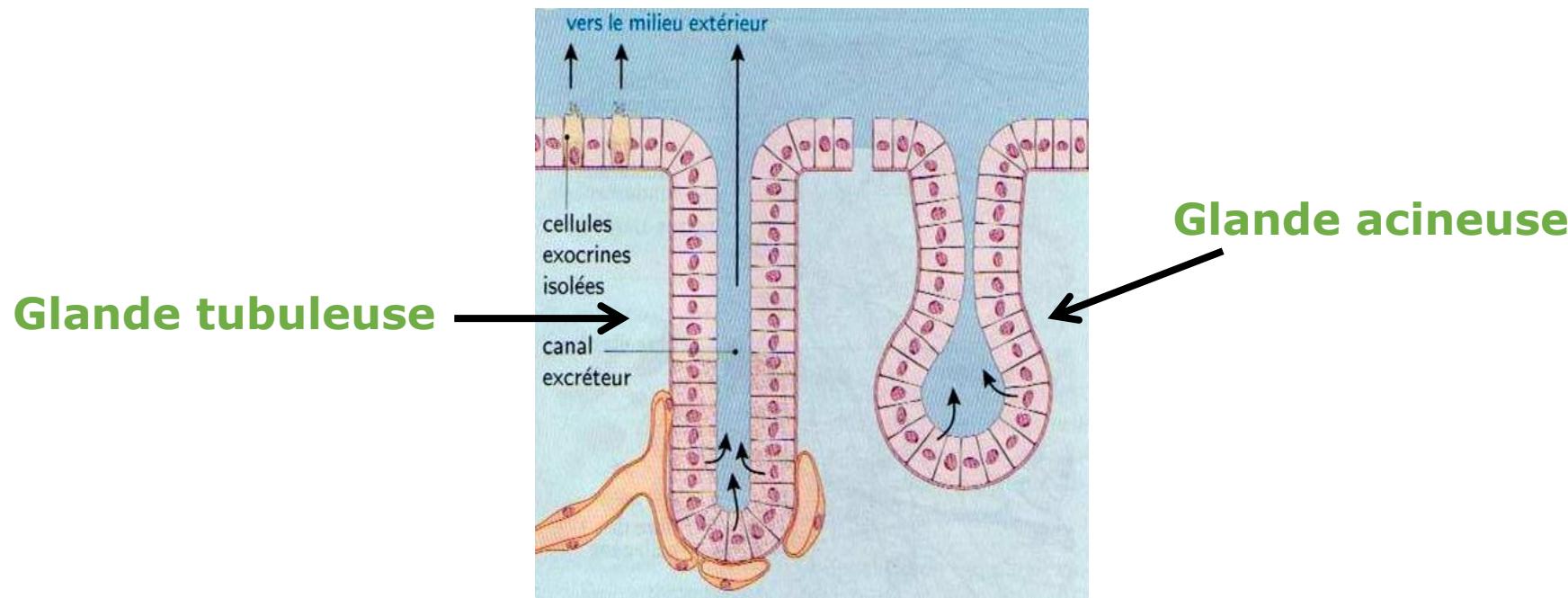
Plusieurs **substances sécrétées** dans le sang ou à l'extérieur du corps le sont **par des cellules épithéliales** formant des glandes **exocrines** ou **endocrines**.

# Le tissu épithélial (11)

## 2.3. L'épithélium glandulaire (3)

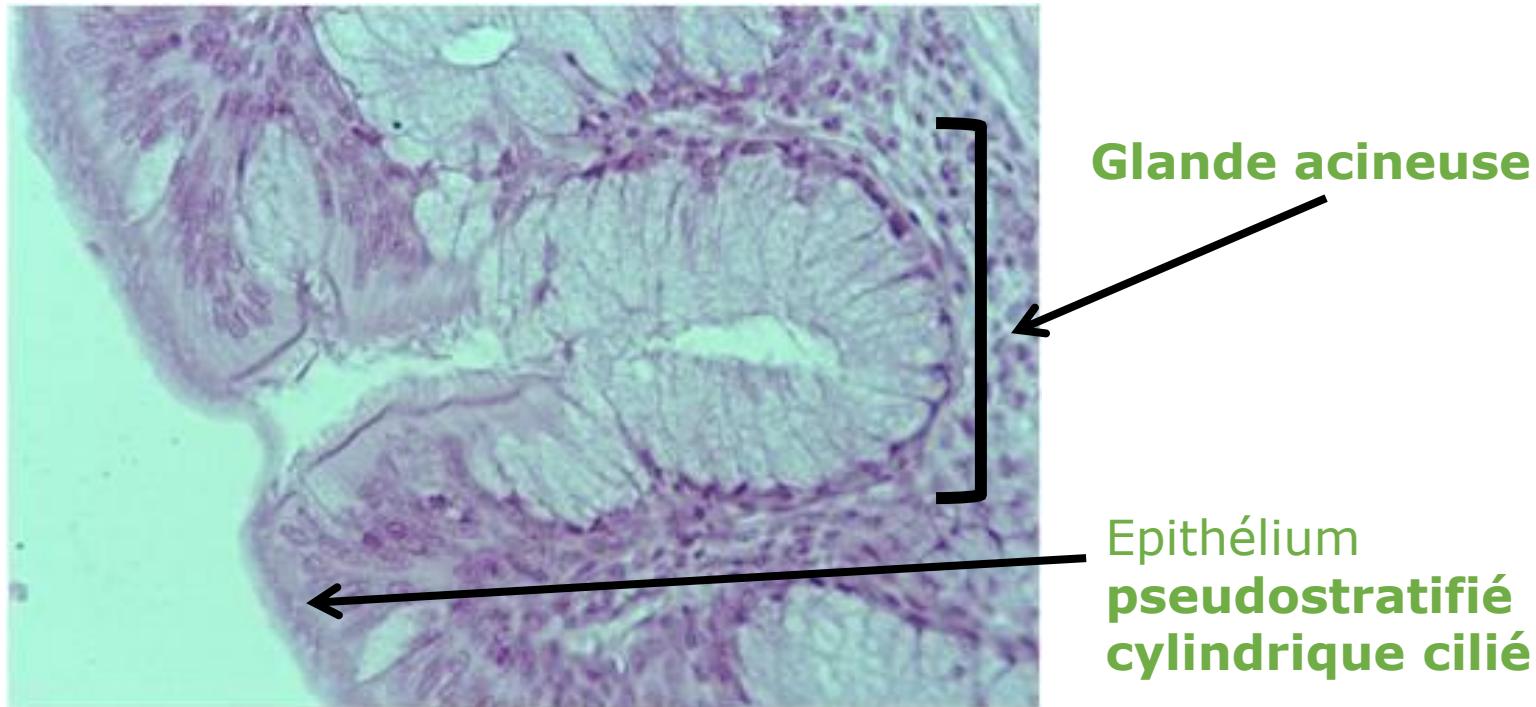
### → **Aspect des glandes exocrines**

- les glandes **tubuleuses**. Ex: *glandes sudoripares/sueur*
- les glandes **acineuses**. Ex: *glandes mammaires/lait*
- les glandes **alvéolaires**. Ex: *glandes sébacées/sébum*



# Le tissu épithélial (12)

## 2.3. L'épithélium glandulaire (4)

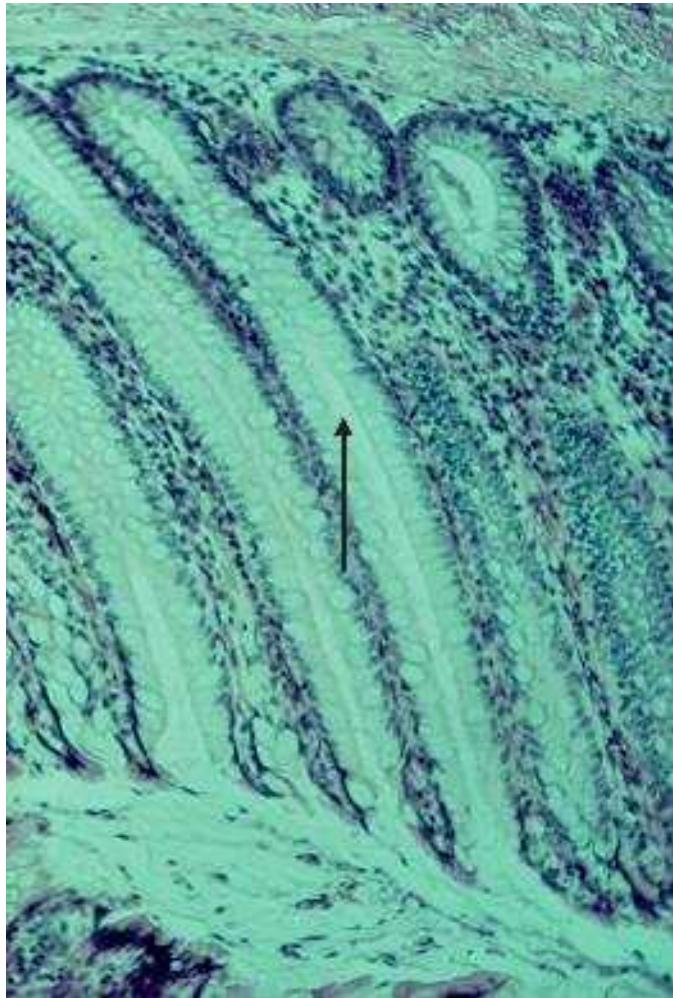


→**Glande acineuse sécrétant du mucus**

L'épithélium **pseudostratifié cylindrique cilié** s'interrompt pour faire place à un regroupement de **cellules muqueuses** (cytoplasme pâle, noyaux écrasés contre la membrane cellulaire basale). On appelle ce regroupement de cellules **muqueuses glande intra-épithéliale**.

# Le tissu épithélial (13)

## 2.3. L'épithélium glandulaire (5)



### →**Glande tubuleuse**

Il s'agit d'une **crypte intestinale**. La flèche indique la lumière du tubule. La paroi est très riche en cellules caliciformes.

# Le tissu épithélial (14)

## 2.4. Particularités: les membranes (1)

Les membranes sont constituées :

→ Soit d'une **couche de tissu épithélial** et d'une **couche de tissu conjonctif** :

- **Les muqueuses**
- **Les séreuses.**

→ Soit de **tissu conjonctif** : **les synoviales.**

# Le tissu épithélial (15)

## 2.4. Particularités: les membranes (2)

→ Les **muqueuses** tapissent les cavités corporelles qui débouchent sur l'extérieur.

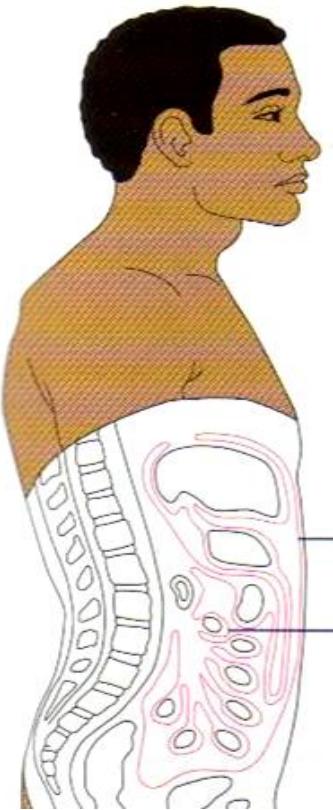
*Ex : le tube digestif, les voies respiratoires...*

→ Les **séreuses** tapissent les organes qui se trouvent dans les cavités corporelles qui ne débouchent pas directement sur l'extérieur

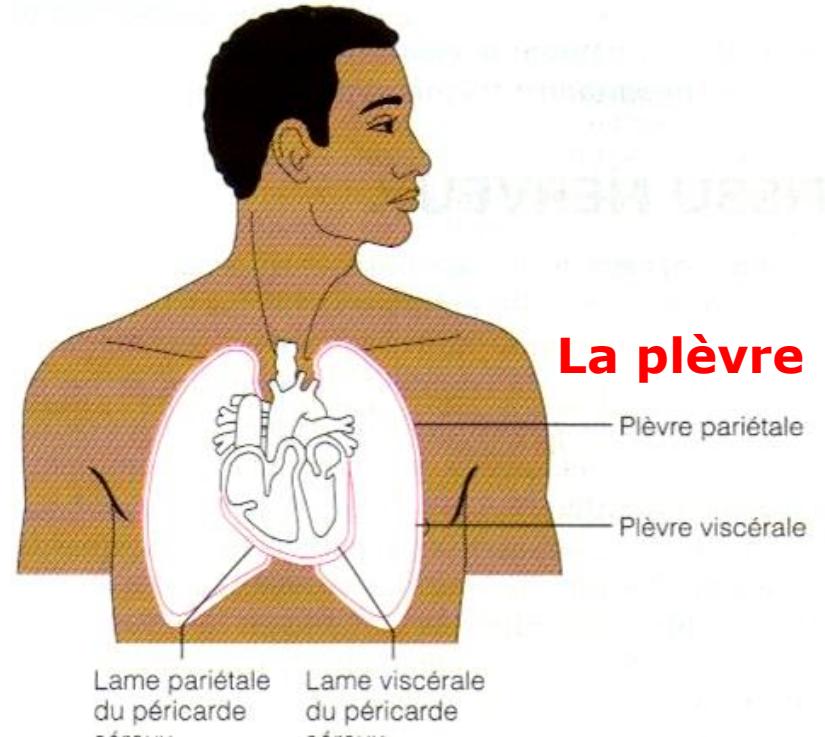
*Ex : le péricarde, la plèvre, le péritoine*

# Le tissu épithélial (16)

## 2.4. Particularités: les membranes (3)



**Le péritoine**



**Le péricarde**

→ Les séreuses tapissent les organes qui se trouvent dans les cavités corporelles qui ne débouchent pas directement sur l'extérieur

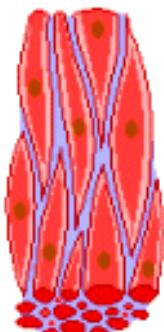
### 3. LE TISSU MUSCULAIRE

# Le tissu musculaire (1)

On en distingue 3 types:



→ Le tissu musculaire **strié squelettique**



→ Le tissu musculaire **lisse**



→ Le tissu musculaire **cardiaque**

## Le tissu musculaire (2)

→ **Le tissu musculaire permet:**

- **Le mouvement**
- **Le maintien de la posture**
- **La production de chaleur**

# Le tissu musculaire (3)

## → Caractéristiques des cellules musculaires

- Allongées
- Excitables
- Contractiles

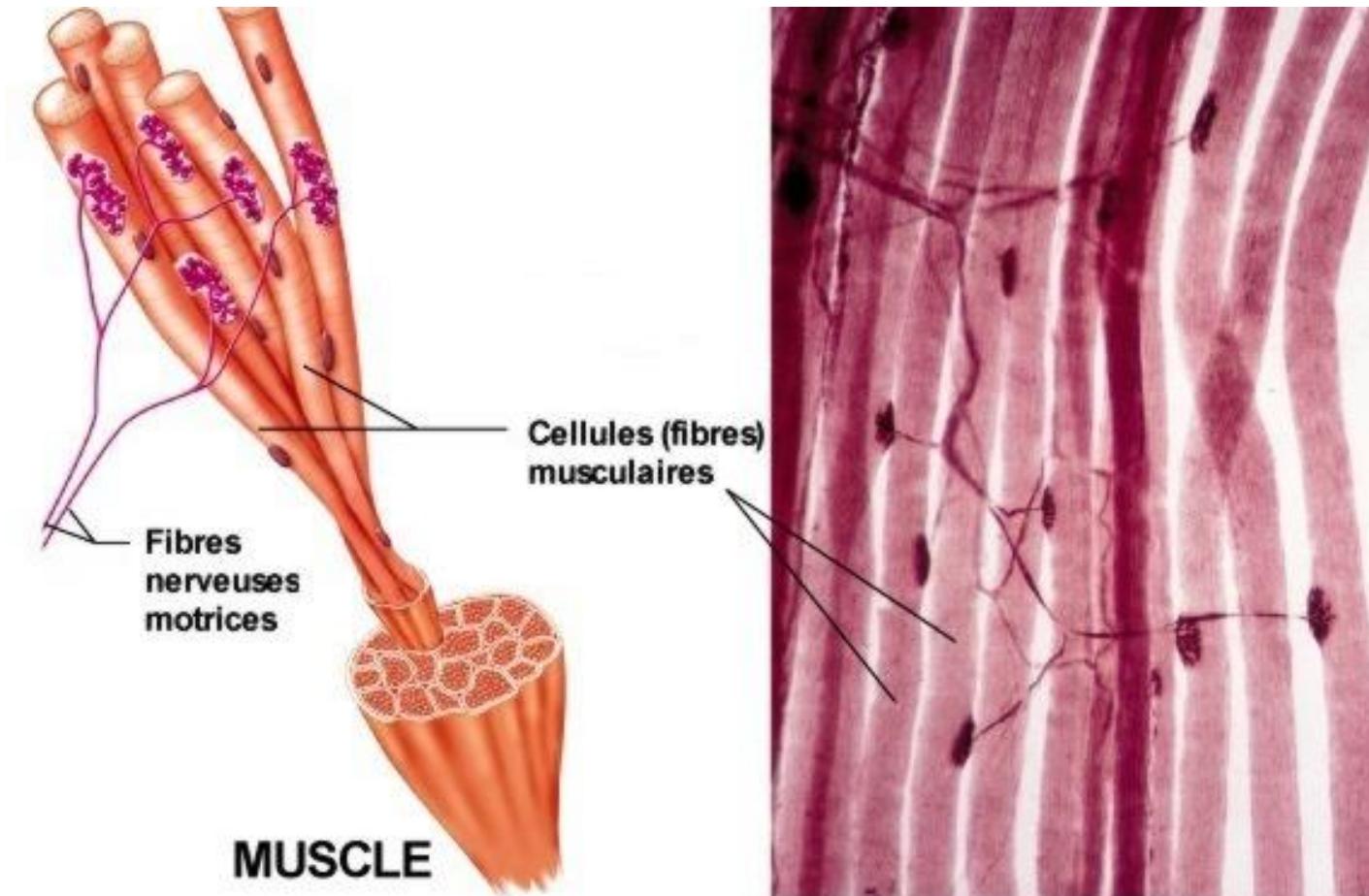
Suite à une excitation, les cellules musculaires peuvent se raccourcir: Elles se **contractent**.

# Le tissu musculaire (4)

## → Vue d'ensemble

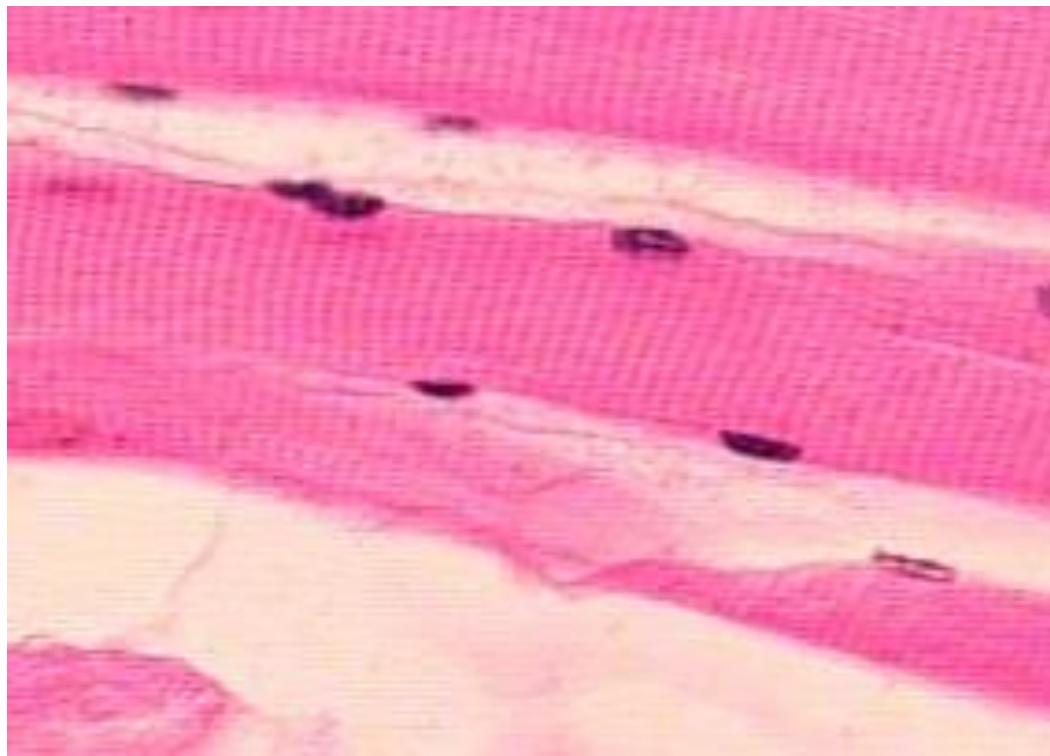
	Tissu muscle squelettique	Tissu muscle cardiaque	Tissu muscle lisse
Localisation	Attachés aux os <i>Ex: biceps</i>	cœur	Paroi des organes creux (TD, utérus, vx...)
Rôle	Mouvement, soutien	Propulsion du sang dans les vaisseaux	Transport des substances par contractions-relâchement
Aspect des cellules	Longues, cylindriques, striées, polynucléées	Ramifiées, striées, mononucléées	Lisses, fusiformes, mononucléées

# Le tissu musculaire (5)



→ **Le tissu musculaire strié squelettique**

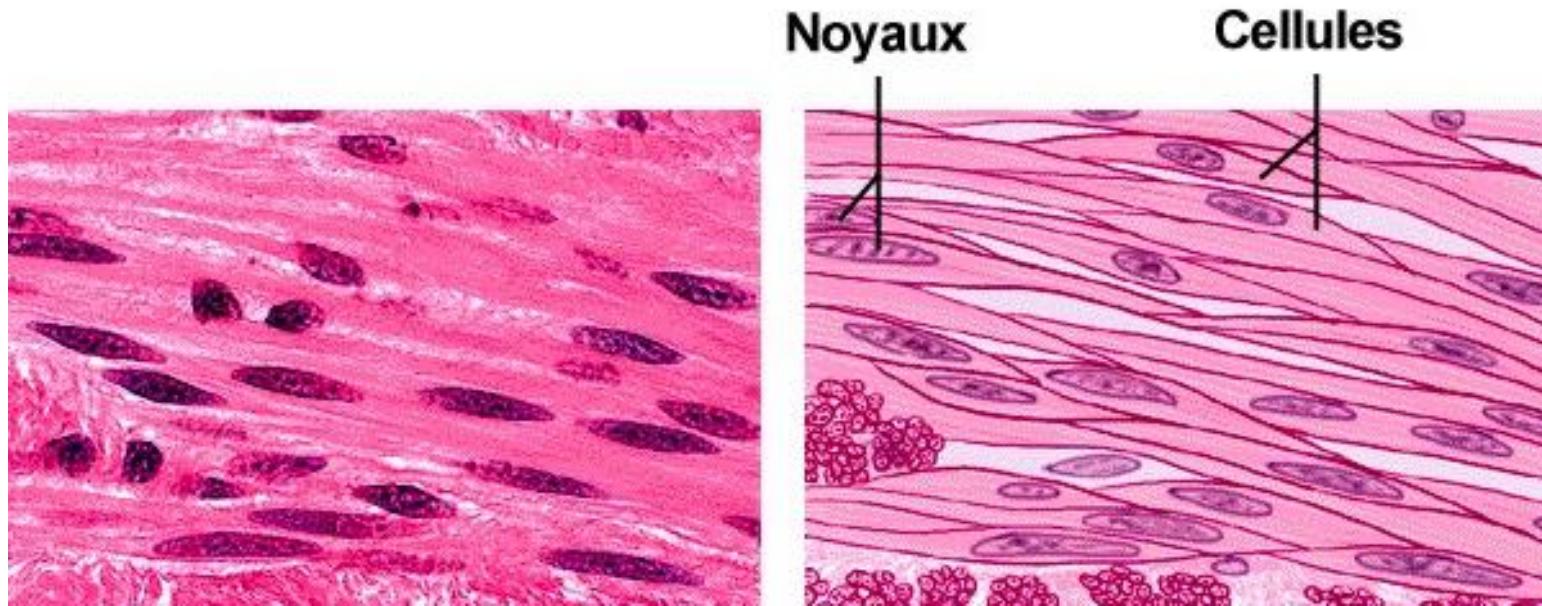
## Le tissu musculaire (6)



→ **Myocytes squelettiques en coupe longitudinale**

Cette vue à fort grossissement vous permet de bien voir les striations transversales et longitudinales.

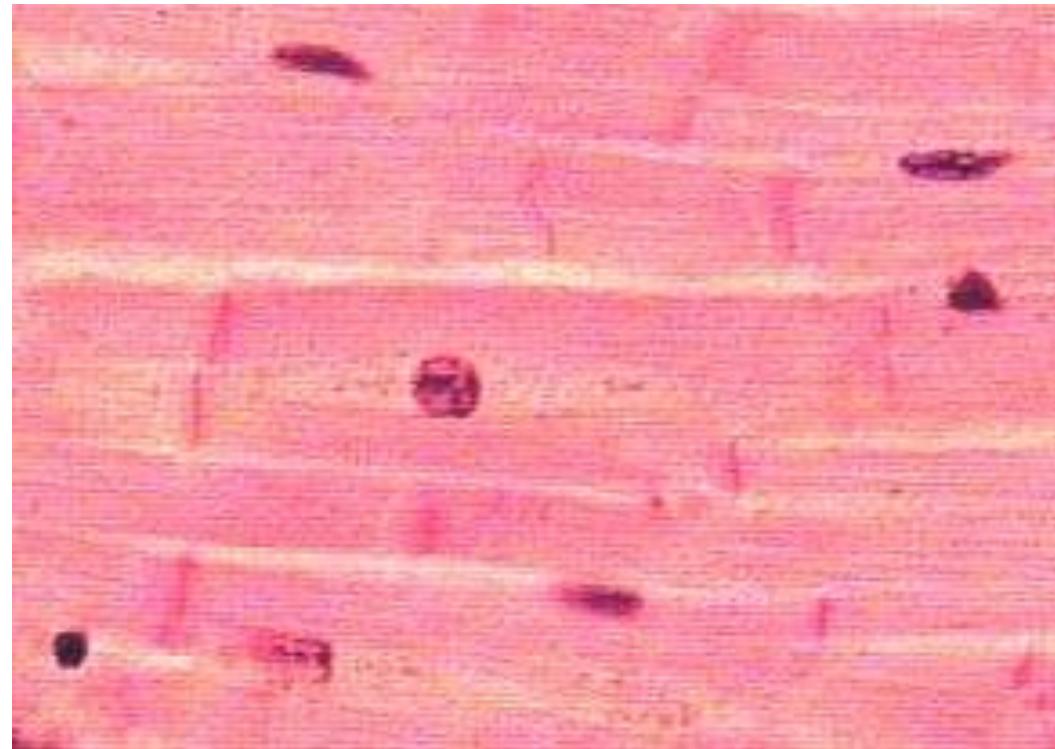
# Le tissu musculaire (7)



→ **Myocytes lisses**

Les Cellules sont fusiformes et allongées.

## Le tissu musculaire (8)



→ **Myocytes cardiaques en coupe longitudinale**

on Voit très bien les bifurcations et les striations de la fibre

## 4. LE TISSU NERVEUX

# Le tissu nerveux (1)

→ Le tissu nerveux **amorce** et **transmet** l'influx nerveux. Il permet de **coordonner** les différentes activités corporelles.

Le tissu nerveux contient 2 types de cellule:

→ **Les Neurones.**

→ **Les Cellules gliales** (10 fois plus nombreuses que les neurones...)

# Le tissu nerveux (2)

## Les neurones (1)

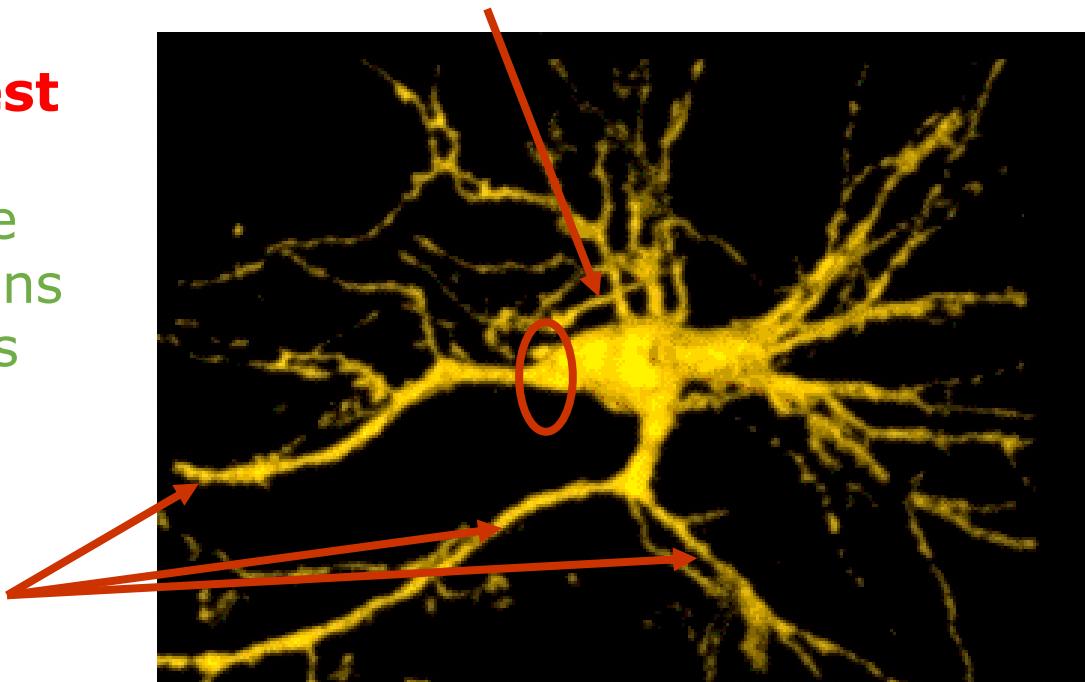
**Les Neurones** = Cellules spécialisées, capables de recevoir des stimuli et de transmettre l'influx nerveux à d'autres neurones ou fibres musculaires

→ **Chaque neurone est formé:**

- D'un corps cellulaire
- De prolongements fins = axone et dendrites

Prolongements

**Corps cellulaire**

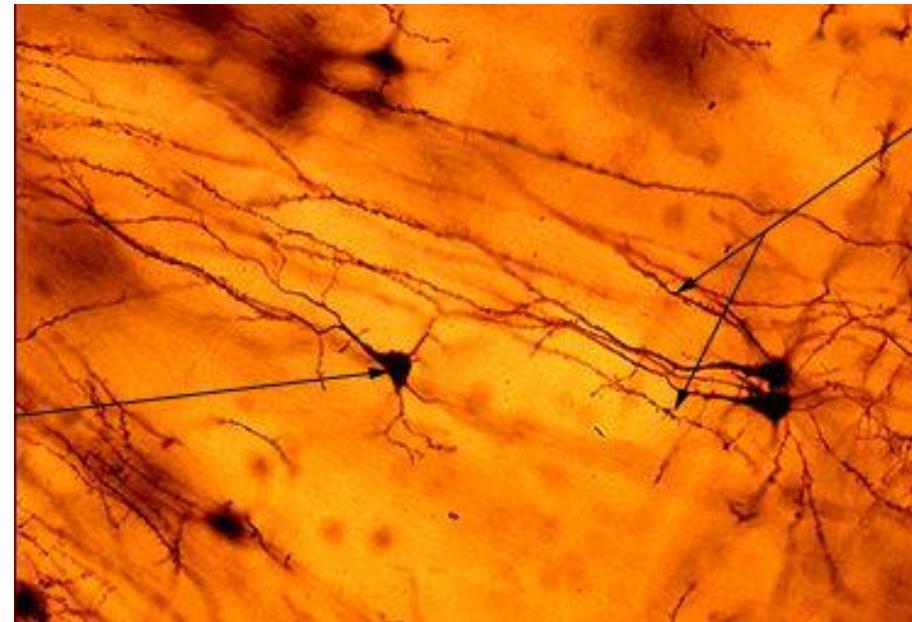


# Le tissu nerveux (3)

## Les neurones (2)

Corps cellulaire

Dendrites

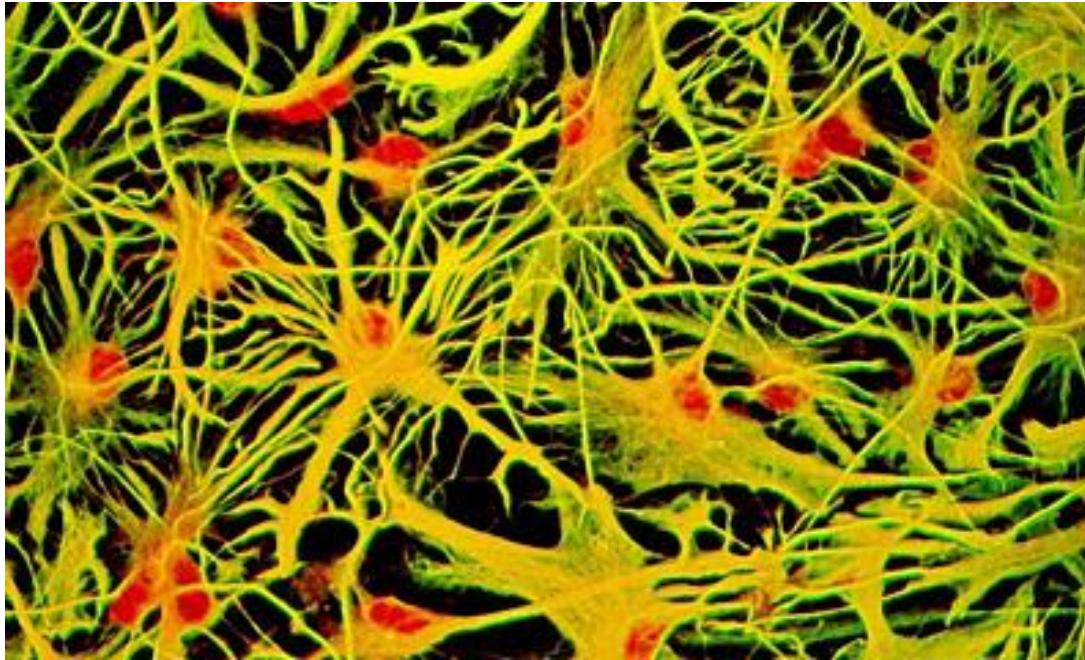


→ **Neurones pyramidaux**

Cette coupe représente quelques neurones pyramidaux du système nerveux central. Nous pouvons observer des ramifications dendritiques riches en épines

## Le tissu nerveux (4)

### Les neurones (3)



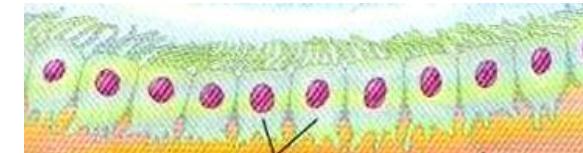
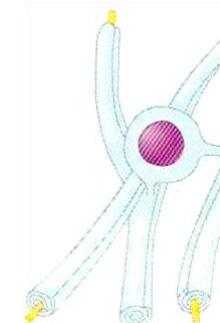
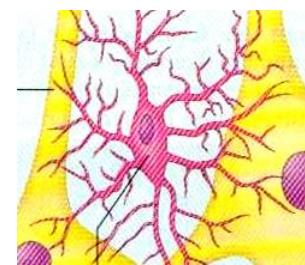
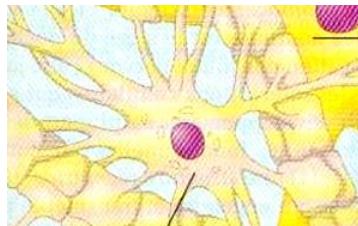
Les neurones **communiquent les uns avec les autres par des connexions entre leurs prolongements**. Ils forment dans le système nerveux de complexes réseaux électriques.

# Le tissu nerveux (5)

## Les cellules gliales

### → **Les Cellules gliales**

- Ne génèrent pas d'influx nerveux
- Elles ont un rôle de soutien, de nutrition,
- De défense des neurones,
- De formation de leur gaine de myéline...



## Préparations biologiques

- Les examens histologiques sont réalisés après traitement échantillons par des agents: physiques ou chimiques (fixateurs). préserver au maximum leurs caractéristiques morphologiques et biochimiques.
- Les cellules ou tissus peuvent être préparés sous forme:

**frrottis,**

**d'observations vitale**

**empreinte**

**Coupe biologique (6 étapes)**

# LES PRELEVEMENTS

## Les prélèvements cytologiques

Les cellules isolées peuvent être obtenus de diverses façons :

- **Recueil des liquide spontanément émis** (urine, expectoration, fistule, drain,...)
- **Raclage, brossage, écouvillonnage, aspiration** de cellules (col utérin, bulle cutanéo-muqueuse, bronches, voies biliaires, aspiration après lavage bronchoalvéolaire)

**Ponction à l'aiguille d'un liquide** (épanchement de séreuse ou articulaire, liquide céphalorachidien, kystes,...)

**Ponction à l'aiguille d'un organe ou d'une tumeur** (ganglion, nodule thyroïdien ou mammaire,..)

**Apposition d'un organe** (pièce opératoire, biopsie) sur une lame

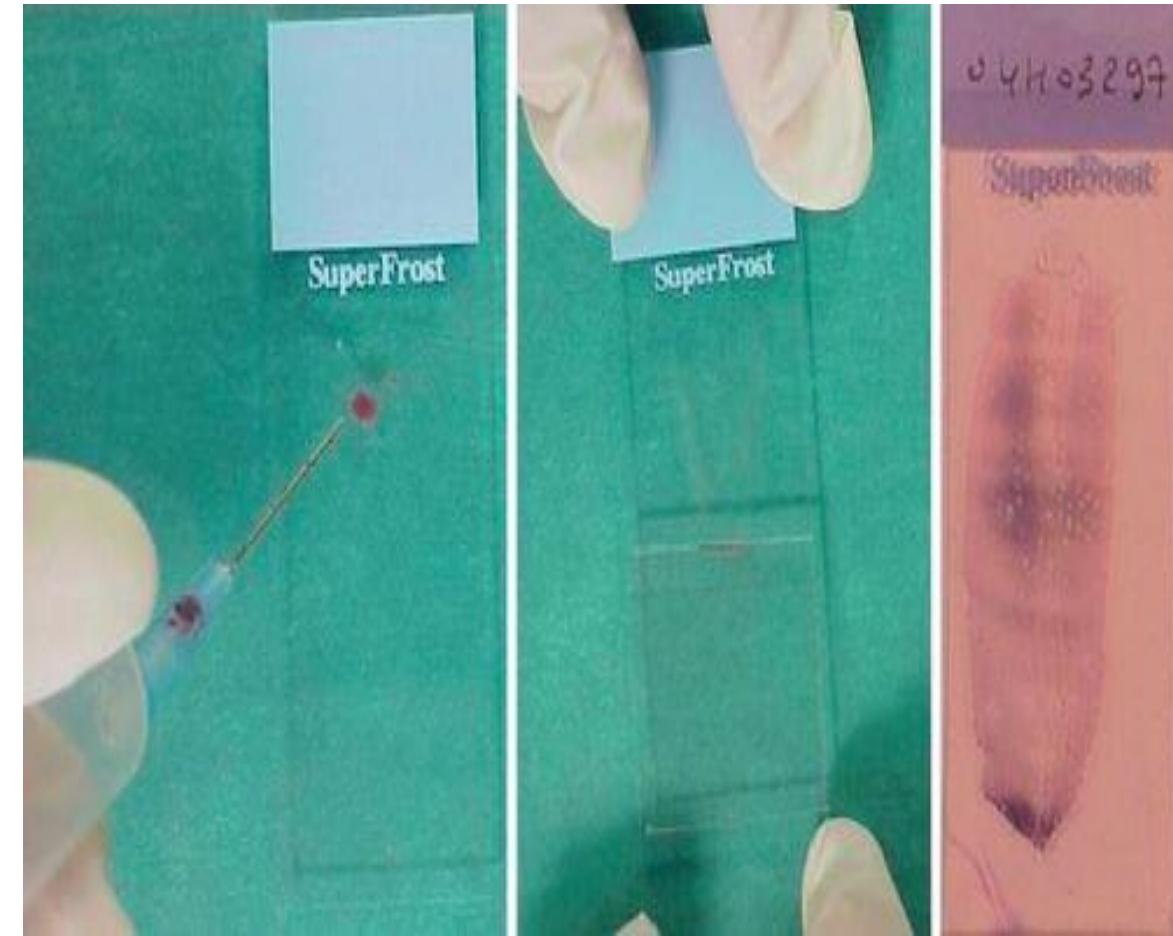
# Prélèvement Tissulaire

- Le matériel est prélevé de différentes façons :
- Biopsie (directe comme pour la peau, le muscle ou avec endoscopie pour les organes des appareils respiratoire, digestif, urinaire).
- Ponction à l'aiguille (comme pour le liquide pleural, péritonéal, articulaire, pour les ganglions, les seins, la moelle osseuse).
- D'une pièce opératoire
- D'une autopsie
- Ou de la dissection d'organe en expérimentation animale.

- **Enregistrement**
- Lorsqu'un prélèvement parvient au laboratoire, il est enregistré et reçoit un numéro d'identification Unique qui sera retranscrit sur les blocs et les lames qui seront examinées au microscope après le traitement technique du prélèvement.
- Chaque prélèvement doit être accompagné d'une fiche de renseignements remplie par le médecin prescripteur qui doit mentionner :
  - l'identité du patient : nom, prénom, date de naissance, sexe.
  - le siège, la date (jour et heure) et la nature du prélèvement (biopsie ou exérèse).

- les circonstances cliniques et para cliniques qui ont motivé le prélèvement,
- L'aspect macroscopique ou endoscopique des lésions (un compte-rendu opératoire peut être utilement joint) ; éventuellement l'aspect d'imagerie, en particulier pour les tumeurs osseuses.
- les antécédents pathologiques du patient, les antécédents d'examens anatomo-pathologiques effectués dans un autre laboratoire. La nature des traitements éventuellement administrés au malade.
- le nom et coordonnées du médecin prescripteur et du préleur

- **I) Techniques d'étude des cellules**
- **1) Etalement des cellules sur des lames de verre** : l'étalement est fait par le préleveur lors des cytoponctions d'organes, des frottis, écouvillonage, brossages ou appositions ; ce geste doit être maîtrisé pour éviter un écrasement des cellules ou des amas en plusieurs couches peu interprétables



- **2) Etalement des cellules en monocouche**
- Cette technique moins répandue consiste à recueillir les cellules par ponction (séreuse, organe plein,...) ou frottis (col utérin) et à les transmettre au laboratoire dans un liquide conservateur.
- Les cellules présentes dans le flacon de fixateur sont ensuite remises en suspension (Vortex) et éventuellement soumises à une dispersion par gradient de densité, puis s'effectue un processus de concentration (par filtration et/ou centrifugation).
- Enfin, les cellules sont transférées en couche mince sur une lame, sur une pastille de taille déterminée.

- **3) Cytocentrifugation sur lame de verre**

- Le liquide (naturel, ou d'épanchement, ou de lavage) est acheminé au laboratoire où il est centrifugé directement sur une lame de verre,
- sous forme de pastille



## • **FIXATION**

- **La fixation des étalements** se fait soit par simple

séchage à l'air pour la coloration de May-

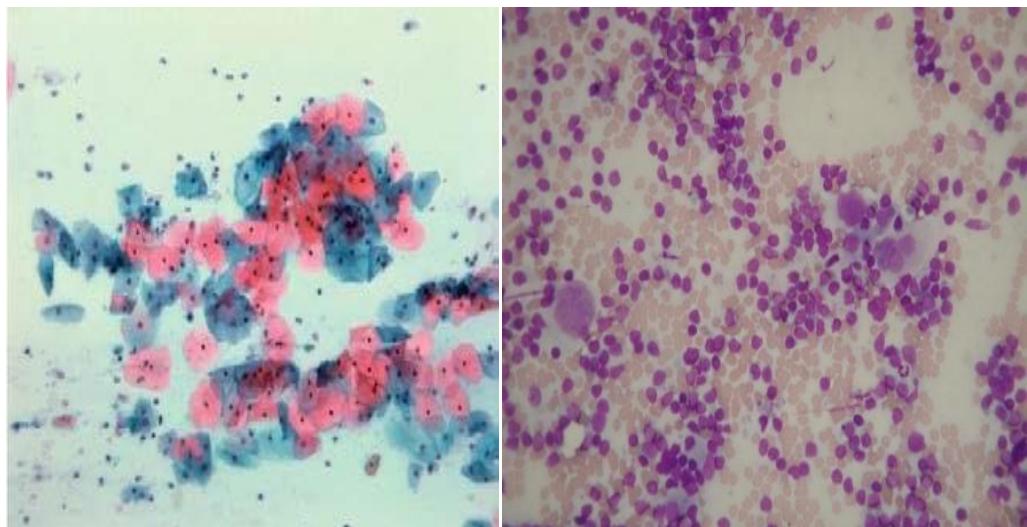
Grunwald-Giemsa , soit par immersion dans

l'alcool-ether ou par application d'un aérosol de

laque fixante, pour les colorations de Harris-

Schorr ou de Papanicolaou (frottis cervicouterins.

Produit de cytoponction d'un ganglion lymphatique de lymphome de Hodgkin ; étalement coloré au May-Grünwald-Giemsa



Frottis cervico-utérin :  
étalement coloré au  
Papanicolaou

## • Inconvénients

- Un examen cytopathologique fournit des renseignements souvent partiels, voire sans certitude.
- Par exemple, les anomalies cytoplasmiques et nucléaires observées dans des cellules cancéreuses, peuvent être difficiles à distinguer de modifications cellulaires induites par des phénomènes inflammatoires ou régénératifs. L'examen cytopathologique est le plus souvent un examen de dépistage ou d'orientation diagnostique.
- Un contrôle par biopsie peut être nécessaire avant toute thérapeutique.

## • II) Techniques d'étude des tissus

- La technique de base comporte plusieurs étapes :
  - la fixation,
  - l'inclusion en paraffine,
  - la confection des coupes et leur coloration.

## • 1) La Fixation

- Indispensable pour conserver la morphologie cellulaire, elle doit être immédiate ou au moins très rapidement débutée après l'obtention du prélèvement.
- Toute fixation défectueuse rend l'étude anatomo-pathologique difficile voire impossible (dessiccation et/ou autolyse du tissu).



## **BUT des fixations**

Figer les tissus dans l'état le plus proche de leur état initial

Les liquides fixateurs les plus utilisés sont le formol 10% tamponné et le liquide de BOUINS (formol +acide picrique)

. Pour les biopsies de petite taille, des fixateurs à base d'alcool peuvent être utilisés (fixation encore plus rapide mais effet délétère sur certains antigènes ce qui peut nuire à des techniques particulières d'immunohistochimie).

- Au cours de la fixation Trois précautions doivent être prises :
- 1) le volume du fixateur doit représenter environ 10 fois le volume de la pièce.
- 2) Le récipient doit être de taille suffisamment grande pour prévenir les déformations des pièces opératoires volumineuses.

Avant fixation, les organes creux (tube digestif, vésicule biliaire, utérus..) doivent être ouverts et si nécessaire lavés de leur contenu afin de prévenir l'autolyse des muqueuses ; les organes pleins volumineux (foie, rate) doivent être coupés en tranches pour faciliter la pénétration rapide et homogène du fixateur ;

- les poumons peuvent être fixés par insufflation d'une solution de formol dans les bronches ou coupés en tranches.
- Seuls les cerveaux de nécropsies seront plongés dans une solution de formol sans être tranchés en raison de la fragilité de la substance cérébrale.

- La durée de la fixation dépend de la taille du prélèvement : au minimum 2 à 5 heures pour une biopsie et 48 heures pour une pièce opératoire.
- Nature du fixateur : le fixateur le plus habituellement utilisé est le formol
- Les prélèvements calcifiés (os, certaines tumeurs) doivent être sciés, puis fixés, puis plongés dans une solution décalcifiante (acide) avant d'être inclus dans la paraffine, ce qui rallonge la durée de la technique.

## Fixation par des méthodes physiques

1. **La dessication** est une méthode très simple. Elle consiste a laisser l'eau s'évaporer a l'air libre et a température ambiante.
2. **La sublimation** consiste a faire évaporer la glace. Elle suppose d'abord une transformation de l'eau en glace par congélation, ensuite une sublimation de la glace.
3. **Il existe une troisième possibilité qui consiste a remplacer l'eau par un solvant miscible a l'eau** : alcool éthilique, méthilique, ou l'acétone. Cette technique s'appelle la **déshydratation**.

- **Les fixateurs chimique les plus répondus**

- **Formol:** en forme liquide conserve assez bien les systèmes enzymatiques.
- **Formaldéhyde** = fixateur de pénétration / réaction rapides. Réaction réversible par ajout d'eau, (dégradation des échantillons).
- **Glutaraldéhyde:** polymérise pour donner des produits dérivés. A préparer extemporanément. Réaction irréversible. Il pénètre peu et lentement ce qui fixe très bien les tissus. Par contre les activités enzymatiques sont quasiment perdues.

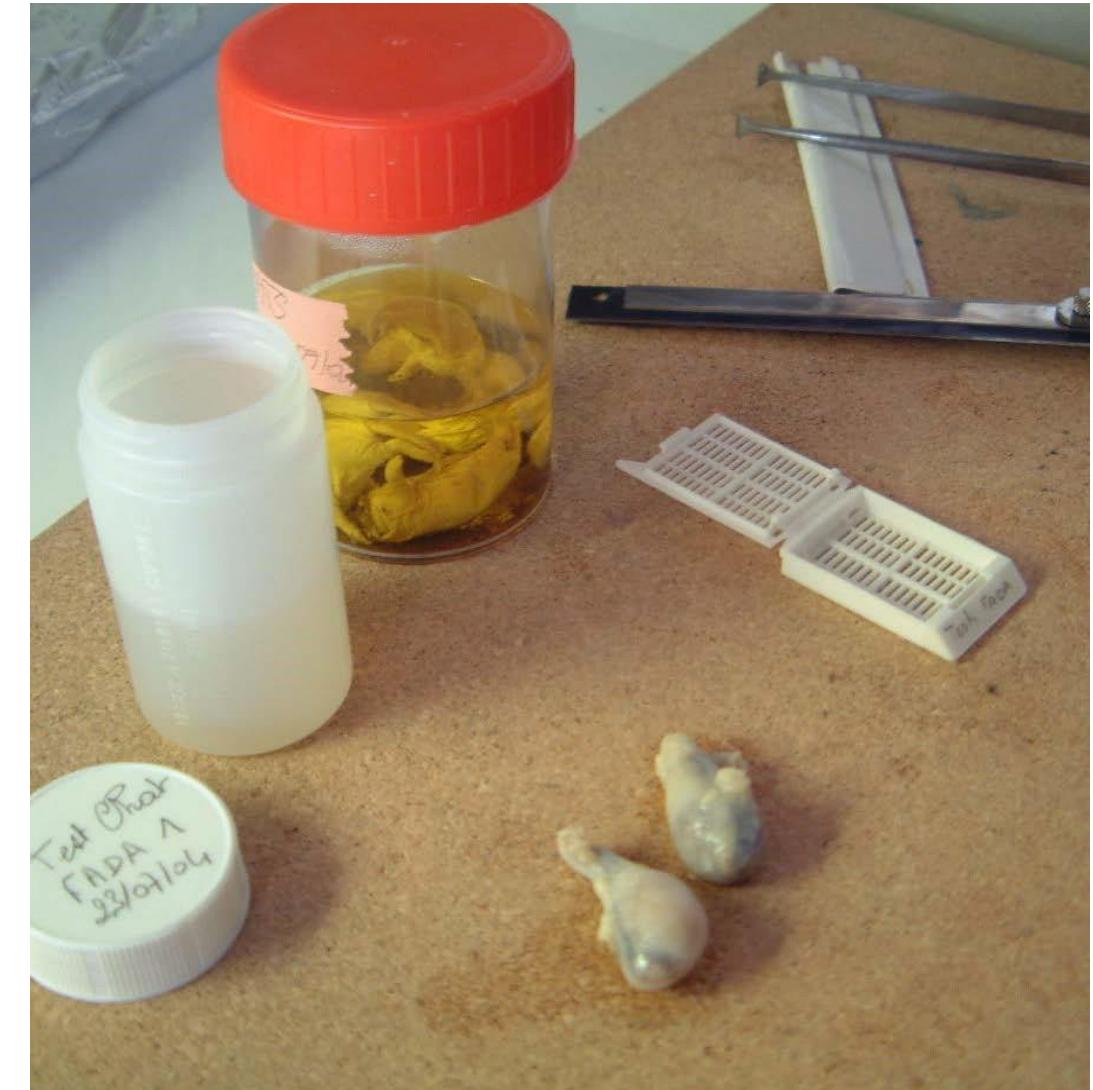
- **Tétraoxyde d'osmium**: Il s'agit d'un agent oxydant, il complète l'action d'un fixateur avant l'inclusion en microscopie électronique. Il est toxique et oxydant. dégrade les protéines.
- **L'acétate d'uranyle**: réagit avec les lipides et les acides nucléiques. Surtout utilisé pour renforcer le contraste des structures.
- **Autres moyens**: congélation brutale afin de vitrifier l'eau . Cela évite les traitements chimiques très toxiques et nocifs.

# Avantage et inconvénients des fixateurs

- le formol seul (formaldéhyde dilué) dans l'eau courante
- économique,
- incolore,
- permet la fixation de grosses pièces,
- permet l'immunohistologie

**MAIS**

- allergisant,
- carcinogène



. . 2/ **Fixation doit**

- être rapide,
- permettre des colorations topographiques,
- permettre l'immunohistologie,
- être peu ou pas toxique.
- préserver les structures tissulaires et cellulaires,
- éviter les artefacts (gonflements, rétractions),

- **Bouin** (Acide acétique Formol Acide picrique)
- rapide,
- pénétrant,
- légères rétractions tissulaires,
- très belles colorations topographiques,

## MAIS

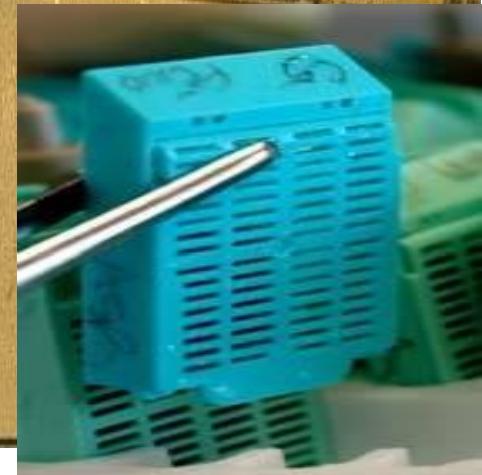
- ne permet que difficilement l'immunohistologie, coloré : tache ! (et ne part qu'avec l'épiderme).



## 2) INCLUSION

Placer les prélèvements dans des cassettes spécialement conçues pour la circulation des spécimens. Il faut bien identifier les cassettes à l'aide d'un crayon à la mine.

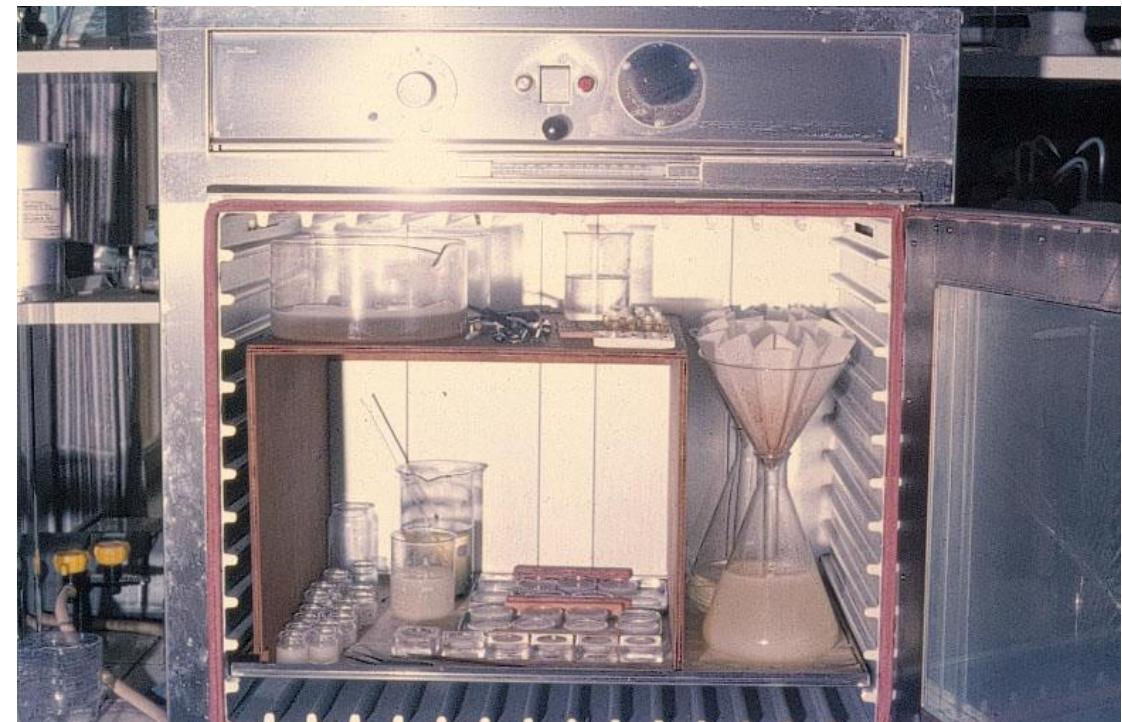
N'utilisez jamais de crayon à l'encre



## • Déshydratation

- L'eau tissulaire est remplacée par de la paraffine. Mais ces milieux ne sont pas miscibles entre eux. On procède donc par étapes en remplaçant :
  - l'eau par un alcool ( $70^\circ, 95^\circ, 100^\circ$ )
  - l'alcool par un solvant organique (Toluène),
  - Toluène par la paraffine

- **2-1) Circulation** : Étape consistant à faire pénétrer la paraffine au sein du tissu
- **2-1-1) Déshydratation des tissus** : 3 bains d'alcool à concentrations croissantes c'est-à-dire : 70%-85%-90%, pour que le tissu ne subisse ni distorsion ni durcissement. On termine avec 3 bains d'alcool absolu afin d'enlever complètement l'eau des tissus.

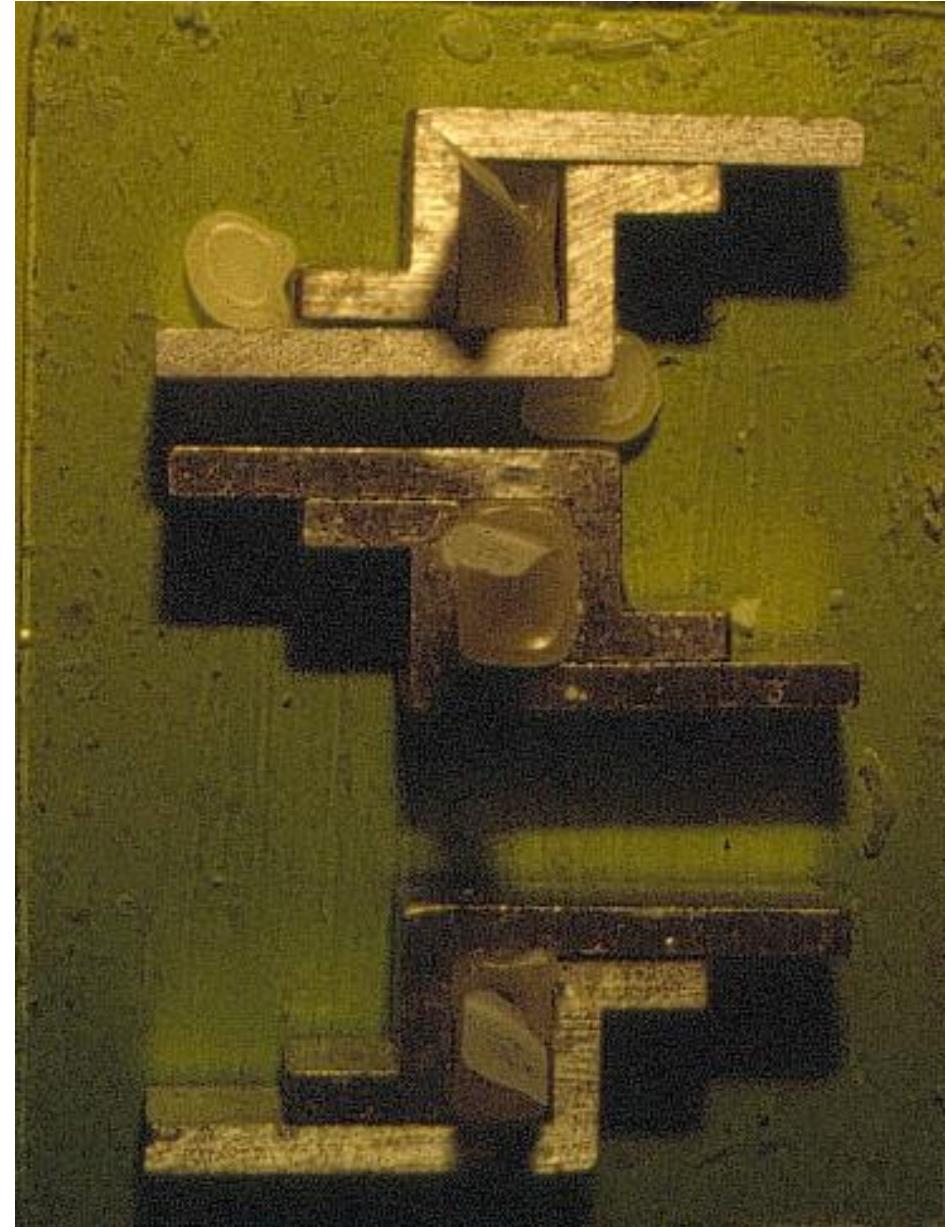


- **2-1-2)L'éclaircissement :** 3 bains de toluène à 100% qui servent à remplacer l'alcool dans les tissus afin que celui-ci soit miscible avec la paraffine.
- Le toluène éclaircira le tissu pour que son indice de réfraction soit plus élevé et augmentera sa transparence.
- **2-1-3)L'imprégnation :** bains de paraffine chaude (44°C à 60 °C) pour solidifier le tissu.

### 3) L'enrobage

Il est difficile de couper un organe fixé en tranches suffisamment minces pour être observables au microscope. Puisqu'un bloc de cire peut être tranché très finement. Cette méthode permet d'obtenir des coupes d'organes aussi minces que  $5\mu\text{m}$

Le prélèvement est imprégné de paraffine fondu  
On coule la paraffine fondu contenant le prélèvement dans un moule  
A température ambiante, la paraffine se solidifie afin de le rigidifier pour pouvoir le couper ensuite



- **Le but** est d'entourer l'échantillon par une substance dure afin de faire des coupes fines, ultrafines et régulières.
- Ex : paraffine, résines hydrophobes, résines hydrosolubles.
- Le milieu d'inclusion idéal: totalement soluble dans l'eau ;
- point de fusion très bas (pour ne pas détruire les protéines) ;
- chimiquement inerte ;
- doit être perméable aux réactifs, doit pouvoir polymériser, sans libérer de sous-produits ;
- facile à couper ; bonne cohésion avec les tissu.

- **Parafine:** Surtout utilisée en microscopie photonique :
  - méthode simple,
  - peu coûteuse,
  - inclusion automatisée.
  - Pb : il peut y avoir des réactions avec des tissus.
  - **Inconvénients** : l'alcool dissout les lipides.
  - La définition des structures tissulaires est rarement  $<0,6\mu\text{m}$ .
  - Meilleure définition avec des coupes plus fines.

- **Les résines hydrosolubles:**
- - résines plus dures que la paraffine = milieu de soutien plus résistant en photonique : 3 avantages :
  - coupes plus fines donc meilleure résolution et détails plus fins ;
  - moins de distorsion des tissus ;
  - sont hydrosolubles.

## 4) Microtomie

Le bloc solide de paraffine contenant le tissu est coupé grâce à un microtome,

les coupes de 3 à 5 microns d'épaisseur sont étalées sur des lames

= utiliser des microtomes pour réaliser des coupes fines voire ultra-fines pour la microscopie électronique à partir de bloc de tissus réalisés (paraffine ou résines) afin de pouvoir observer les détails cellulaires

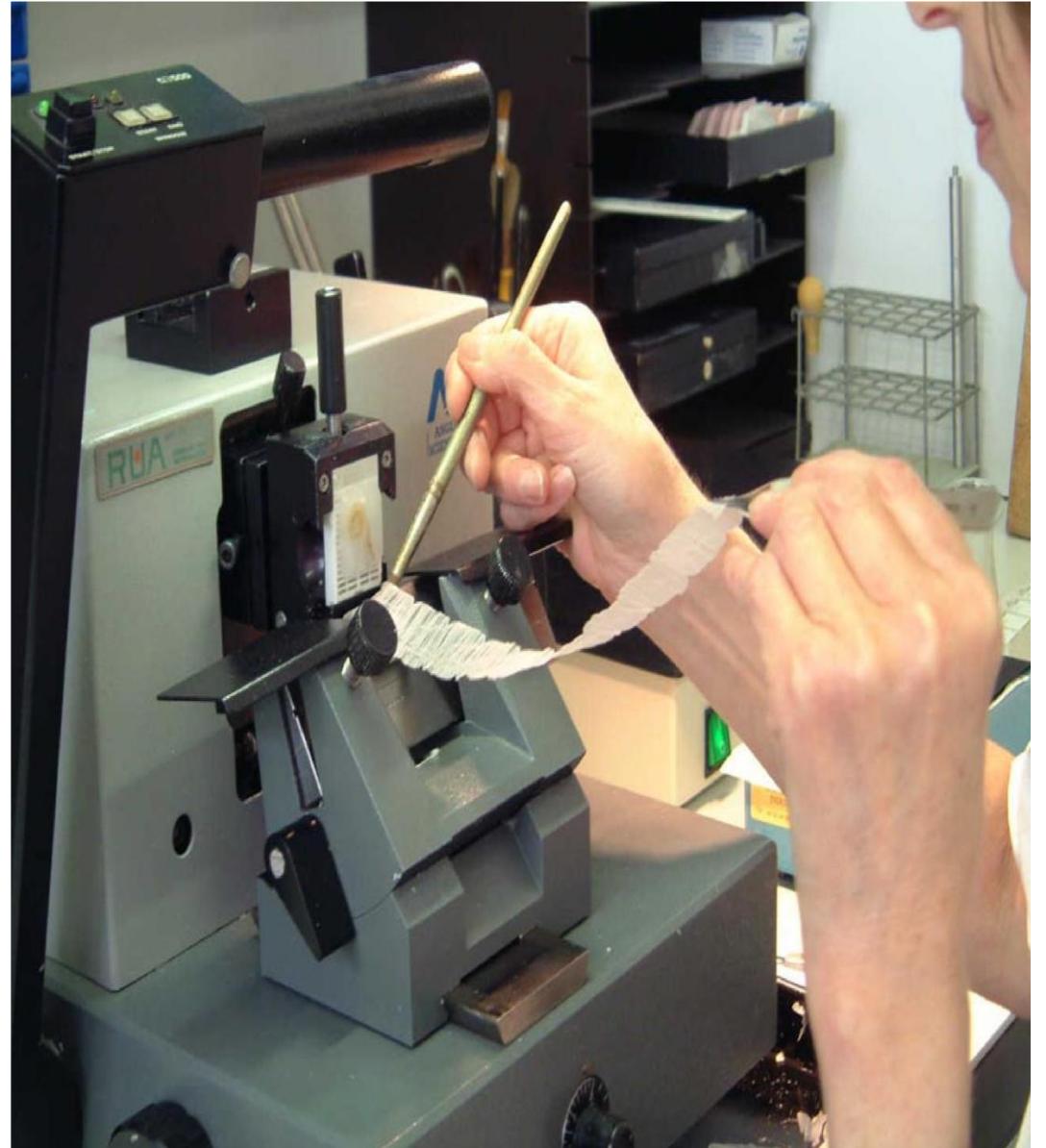


- On distingue plusieurs types de coupe selon la méthode de conservation et d'amincissement suivie :

Conservation	Inclusion	Épaisseur de la coupe
Congélation (à -20 °C)	Aucun	5 à 100 µm (MO)
Polymérisation des protéines	Paraffine	5 µm (MO)
Polymérisation des protéines et des lipides	Résine	1 à 0,05 µm (ME)

- **Les coupes histologiques (MO)**

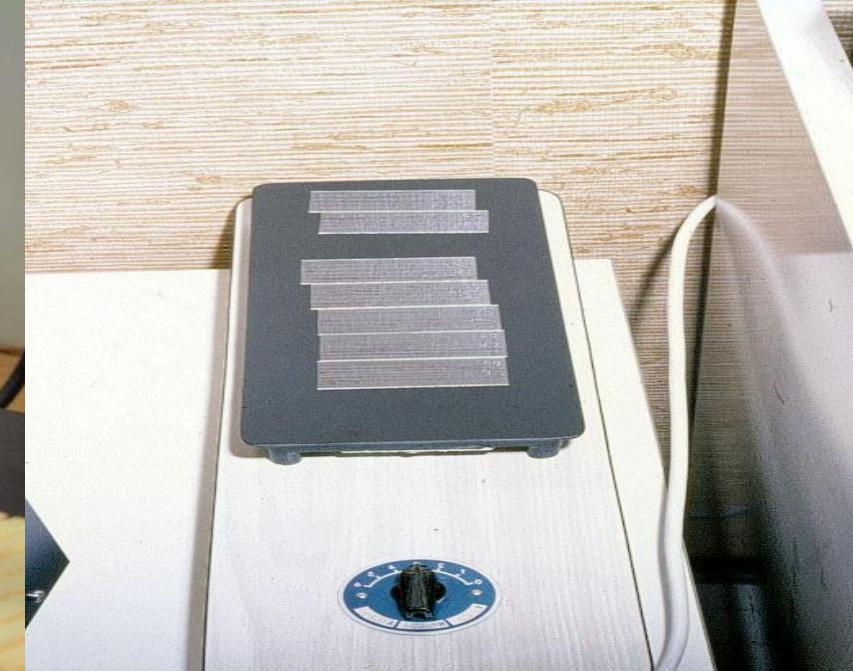
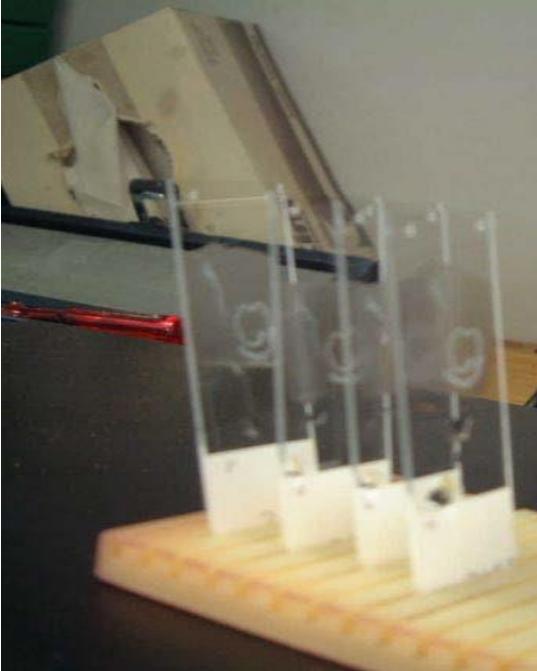
- 2 à 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur,
- quelques centimètres de largeur et longueur,
- nombreuses colorations possibles,
- montées entre lame et lamelle,
- grandissement de 10 à 1000 fois (environ).



Les lames gravées et garnies de ruban de paraffine sont disposées sur une platine chauffante

Les coupes sont placées dans une étuve dont la température est légèrement inférieure au point de fusion de la paraffine, pendant au moins 30 minutes.

Si le tissu est particulièrement fragile, les coupes sont séchées dans une étuve à 37° pendant toute une nuit. Les coupes peuvent alors être colorées.



## 5) colorations

- But: colorer les structures et/ou des constituants moléculaires pour les visualiser, localiser, identifier.
- Colorant = produit susceptible de teindre une ou plusieurs structures de façon durable (caractérisée par un spectre d'absorption).
- Il existe différentes types de colorations : **coloration histologique, coloration structurale, coloration cytologique, coloration vitale, colorations topographiques.**
- **Colorations topographiques:** ce sont celles qui différencient le mieux les différents tissus constituants d'un ensemble et permettent la visibilité en général jusqu'aux noyaux, d'un organe.
- **Colorations histologiques** : ce sont celles qui différencient finement tous les éléments d'un tissu y compris ses structures fines et ses excrétats ou sécrétats. Une telle coloration devient histochimique si elle est spécifique de tel ou tel composé défini.

- • **Colorations cytologiques** : ce sont celles qui permettent d'analyser les détails internes des cellules. De telles colorations peuvent être cytochimiques si elles mettent en évidence des fonctions chimiques déterminées.
- • **Colorations progressives** : elles nécessitent d'arrêter la montée de la coloration au point voulu
- • **Colorations régressives** : après sur coloration, on différencie par un réactif qui enlève progressivement l'excès de colorant.
- • **Colorations directes** : elles se fixent directement sur l'objet.
- • **Colorations indirectes avec mordançage** : la fixation du colorant a lieu par l'intermédiaire d'un sel métallique "mordant".

## 1) Colorations de routine

- Après dissolution de la paraffine, puis réhydratation, le tissu est coloré. La coloration usuelle associe un colorant basique nucléaire (hématéine, hématoxyline)
- et un colorant acide cytoplasmique (éosine, érythrosine, ou phloxine). On y ajoute souvent du safran qui se fixe sur le collagène

## Coloration de base ou spéciale

De base : HPS (Hématoxyline-Phloxine-Safran)

Déparaffiner les lames

bains de toluène (95%-100%). 3 minutes chacun.

bains d'alcool (80%-95%-100%). 3 minutes chacun.

Rincer à l'eau courante.

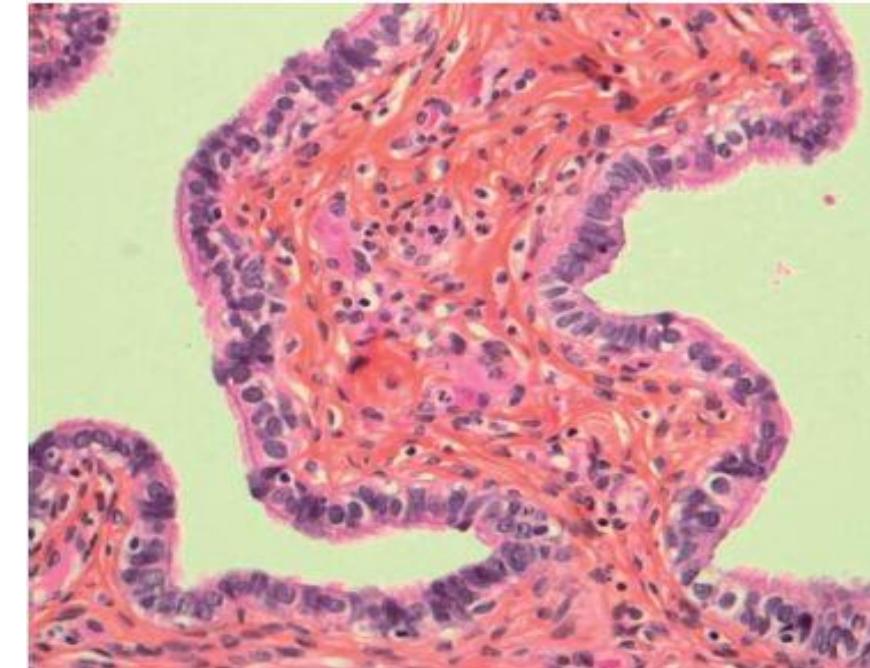
**Hématoxyline de Gill.** 3 à 10 minutes

Différencier avec le bicarbonate de Na 5 à 10 secondes Rincer à l'eau courante. Phloxine 1 minute. Rincer à l'eau courante.

3 bains successifs d'alcool à 100%. 40 secondes chacun.

**Safran.** 3 à 10 minutes (6minutes)

3 bains successifs d'alcool à 100%. 40 secondes chacun. 3 bains de toluène à 100% Montage des lames.



*Les cytoplasmes sont roses, les noyaux bleutés, le collagène jaune.*



Fluorochromes	Excitation (nm)	Emission (nm)	Applications
DAPI	359	461	liaison avec l'ADN
Hoescht 33258	346	460	liaison avec l'ADN
Lucifer Yellow	425	530	
Fluo-3	506	526	$Ca^{2+}$ libre
Isothiocyanate de fluoresceine x (FITC)	490	512	liaison avec les protéines
Rhodamine	550	580	liaison avec les protéines

## • 2) Colorations spéciales :

- Pour ce qui est des colorations spéciales, elles sont différentes selon la demande et selon ce que l'on désire observer

### **Coloration des différents types de tissus: Tissus contenant des lipides**

**a) Coloration par les lysochromes** Parmi les colorants lysochromes on trouve le bleu de crésyl ammoniacal. on fait agir une solution aqueuse à 1 ou 2%, on lave à l'eau puis par de l'ammoniaque diluée à 50% ; les lipides apparaissent jaune d'or, les parois des tissus fongiques étant incolores ou vineux pâle.

### **b) Coloration par les bleus métachromatiques**

Elle consiste en un virage du colorant dans une teinte autre que la sienne propre lorsqu'il est fixé par l'objet. Parmi les bleus les plus utilisés on trouve le bleu de toluidine et le bleu de crésyl.

## • C) Réactions des caroténoïdes

- On rattache habituellement les caroténoïdes aux lipides en raison de leurs caractères de solubilité. Ils se colorent directement en violet, bleu ou vert dans les acides forts et en violet dans les liquides iodés (lugol, Melzer).

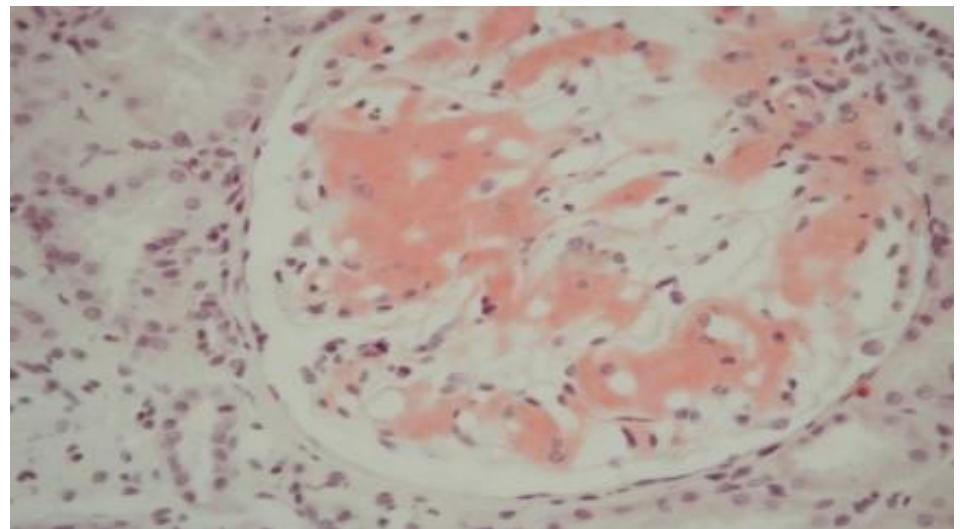
## • d) Réaction des chromolipoïdes

- Ce sont en général des pigments jaunes à bruns, basophiles et acido-résistants.
- On les rencontre notamment chez les russules et rhodophylles.

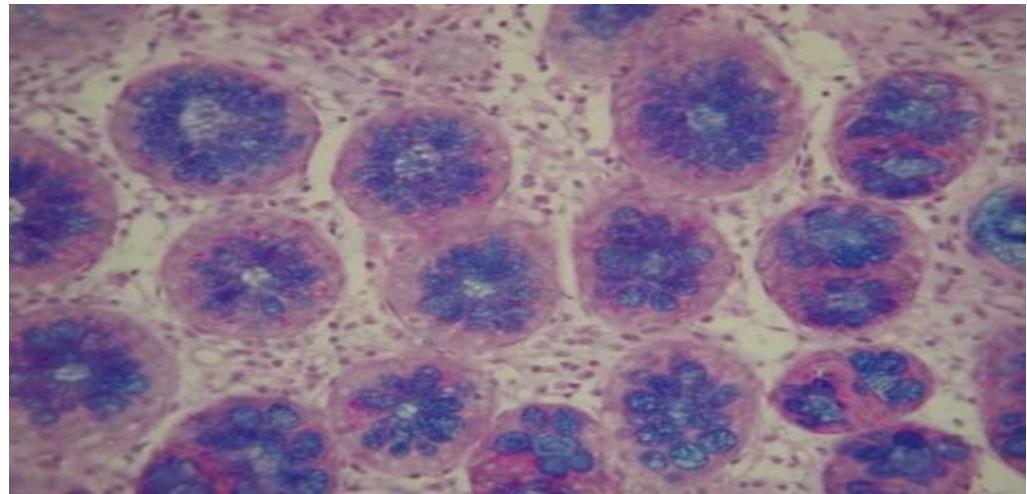
- **coloration des mucopolysaccharides** se fait par le bleu d' ALCIAN
- **Le mucicarmin** colore en rouge les mucopolysaccharides acides

**Le P.A.S. (Periodic Acid Schiff)** est une méthode de coloration qui met en évidence les glucides en rouge magenta. L'oxydation de certains polysaccharides par l'acide périodique est révélée par le colorant rouge magenta de Schiff.

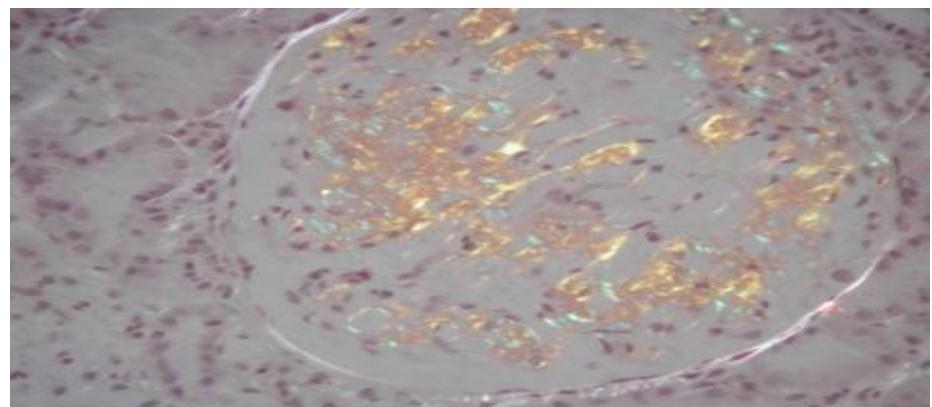
Coloration de rouge Congo d'une amylose glomérulaire : aspect dichroïque vert jaune des dépôts amyloïdes en lumière polarisée.



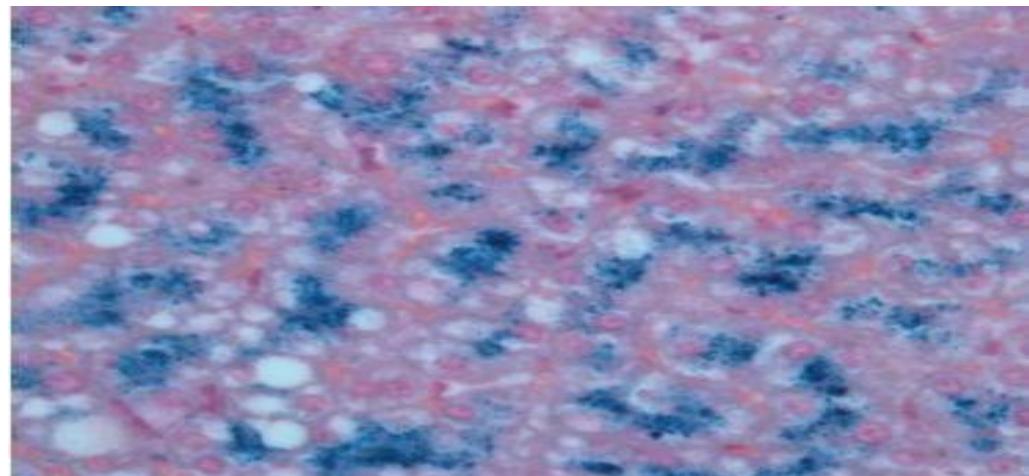
Coloration de PAS-bleu Alcian sur les cellules caliciformes mucisécrétantes de la muqueuse intestinale.



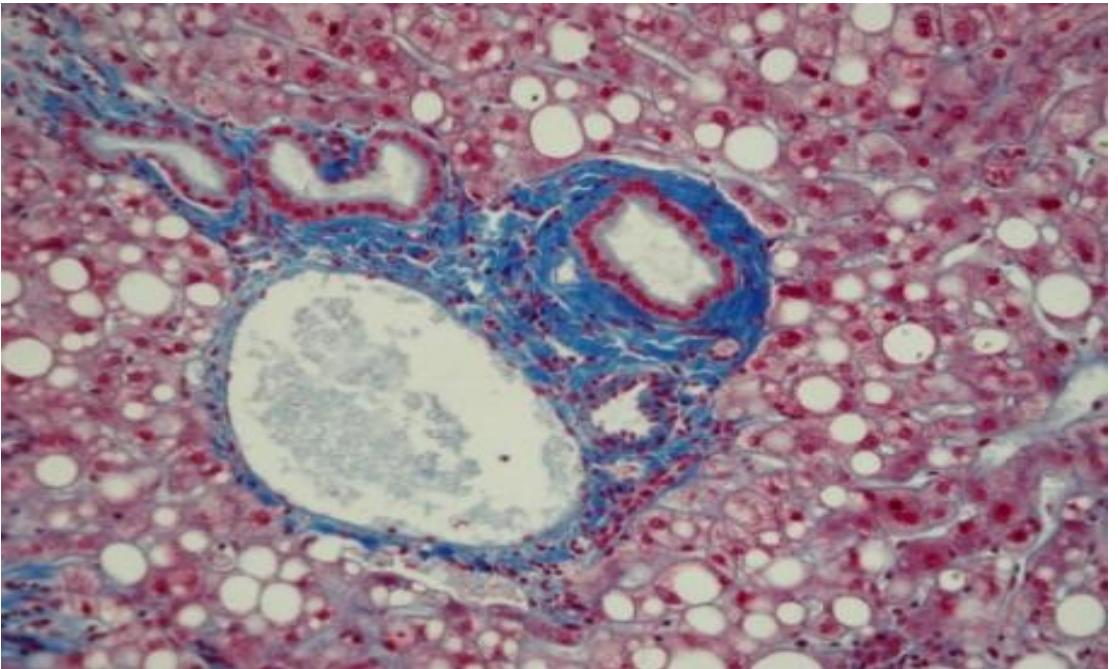
**Les lipides.** Le réactif le plus commode est le Soudan III en solution alcoolique qui les colore en rouge vif. Ce colorant colore aussi les cires, résines, cutine, subérine et latex mais ne colore pas la cellulose, la lignine, les mucilages.).



Coloration de Perls : surcharge hémosidérinique dans des hépatocytes (granules bleus).

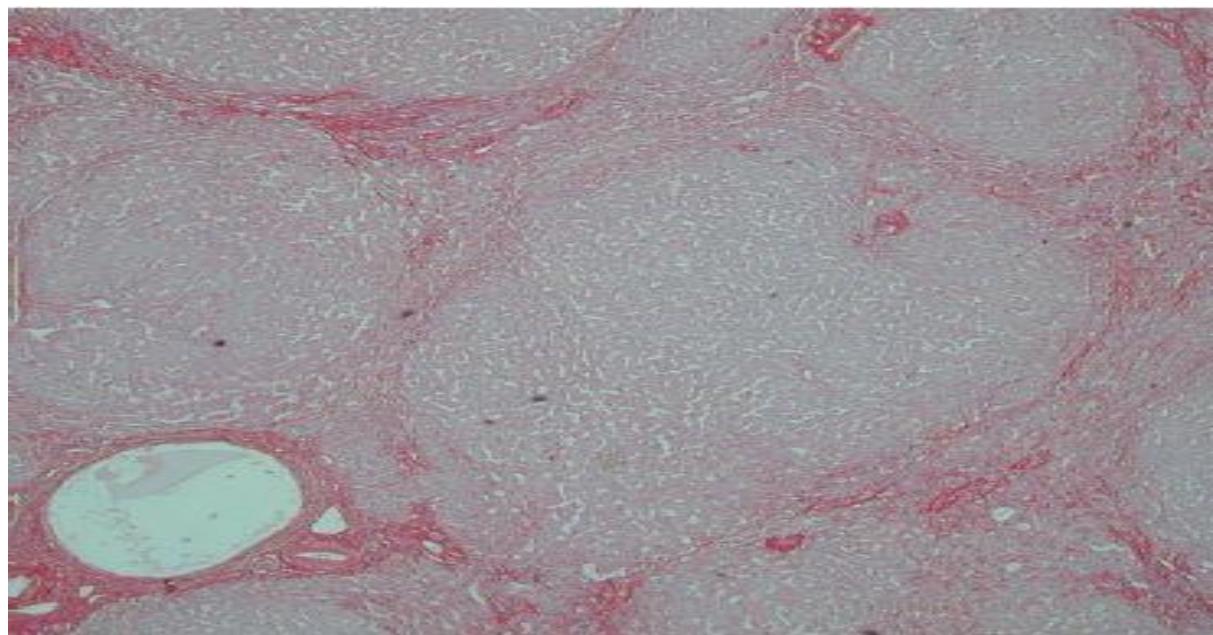
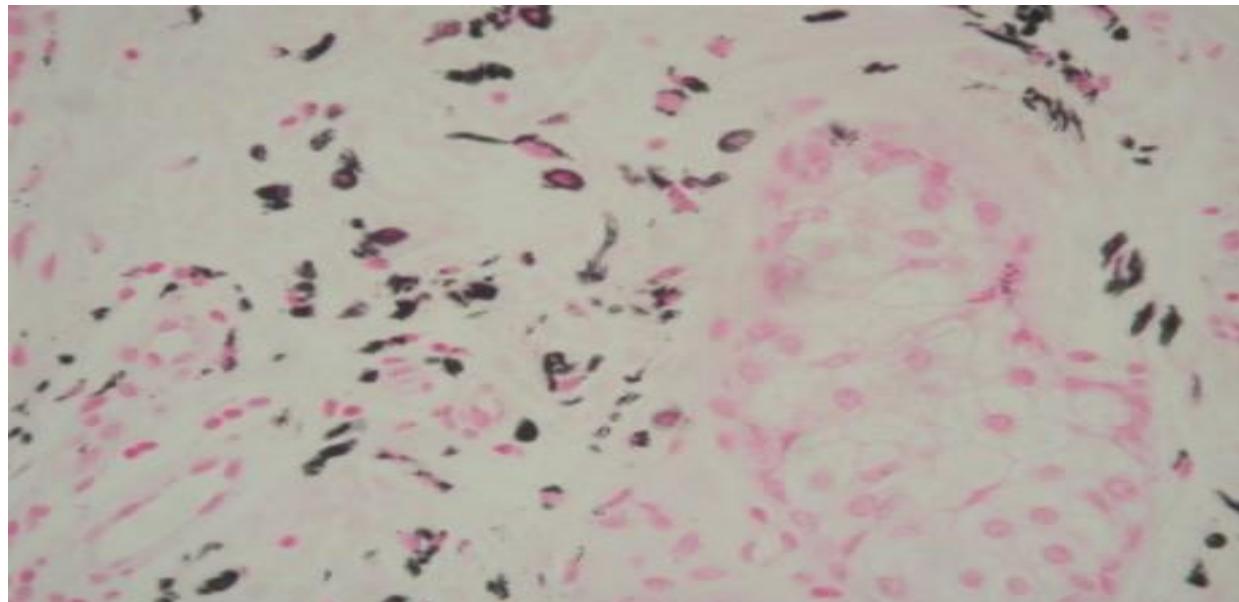


Mélanocytes chargés de mélanine (noire) autour d'une glande sébacée.  
Coloration de trichrome de Masson au bleu d'aniline sur tissu hépatique ; coloration bleue du collagène d'un espace porte.

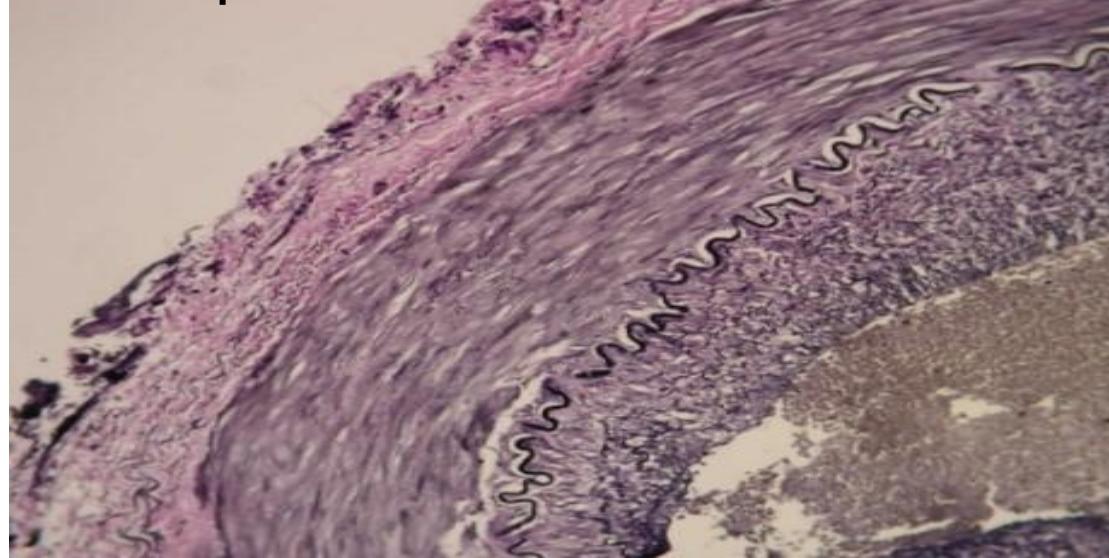


Coloration au rouge Sirius :  
nodules hépatiques  
hyperplasiques régénératifs

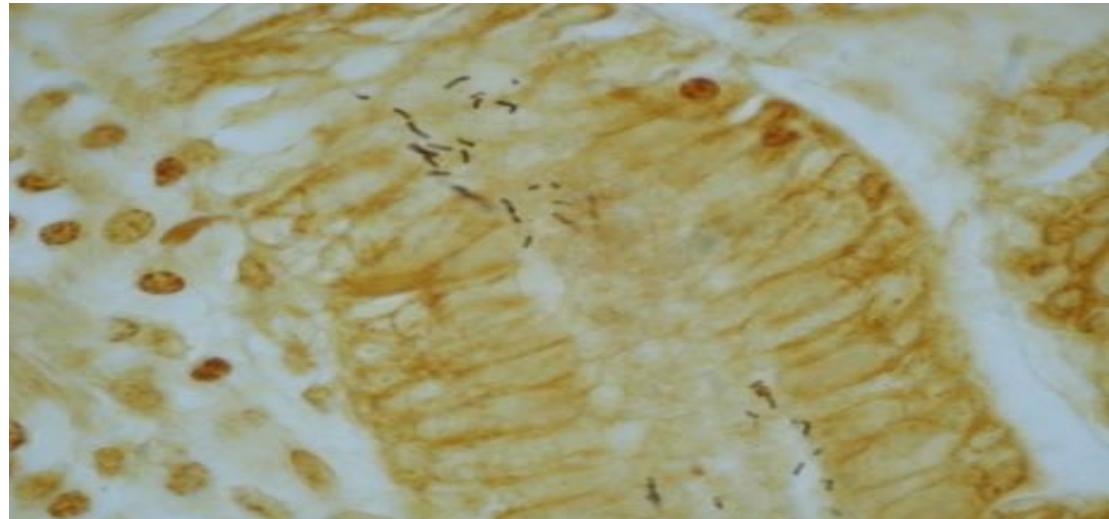
Coloration de Fontana-Masson sur un nœvus nœvocellulaire cutané



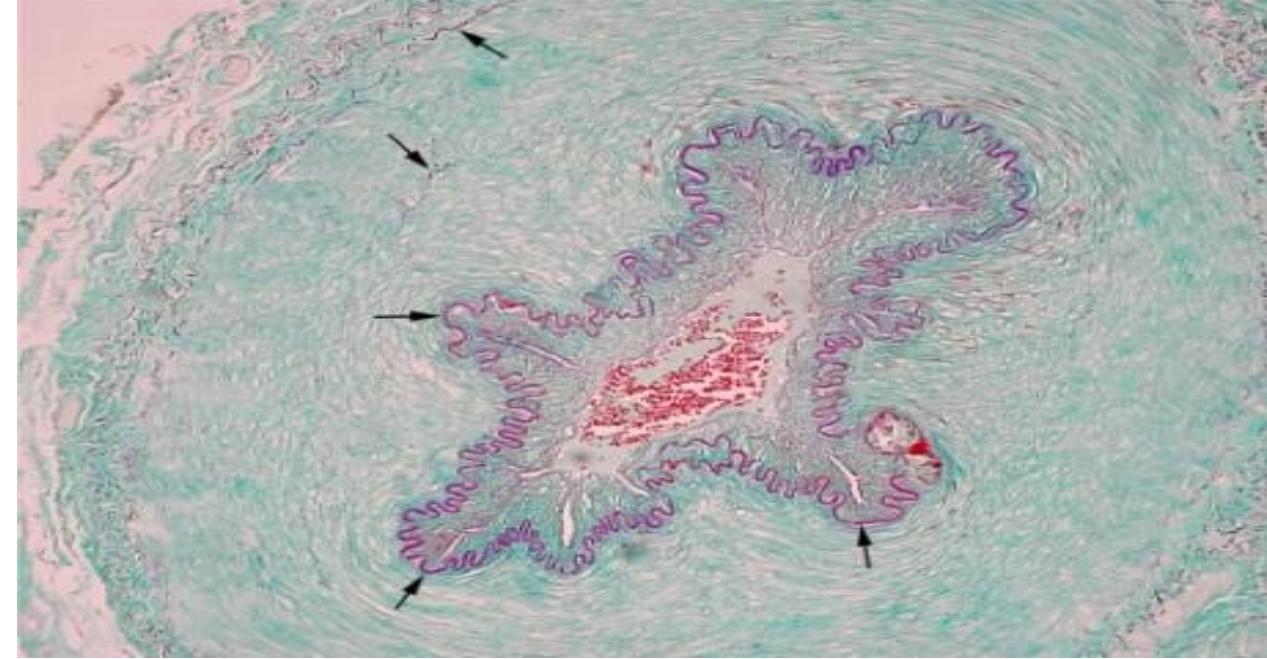
Coloration de Weigert des fibres élastiques d'une artère temporelle



Coloration de Whartin-Starry : bactéries du genre *Hélicobacter Pylori* dans une crypte gastrique, colorées en noir



Coloration de Gomori des fibres élastiques (flèches) d'une artère temporelle

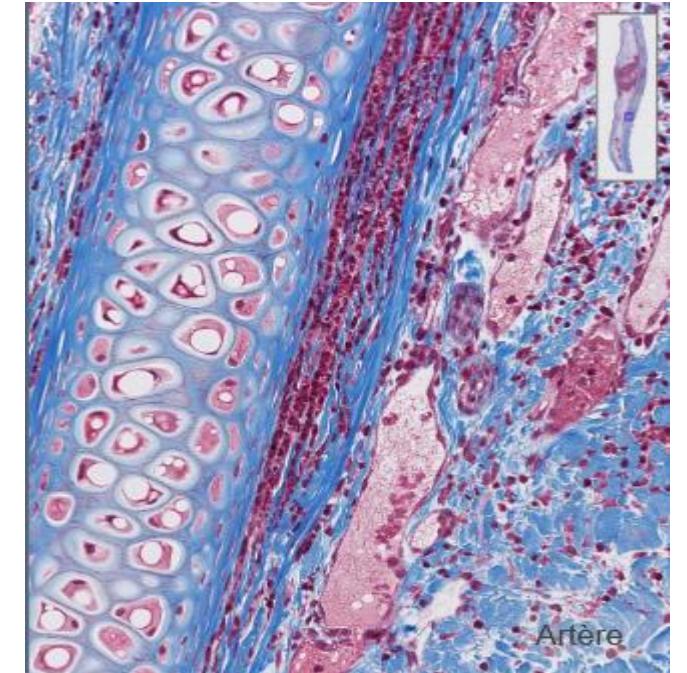


Coloration de Grocott d'un filament fungique (aspergillus)



## • **Coloration de fibre de soutien trichrome de Masson**

- Cette coloration met en évidence les fibres de collagènes. C'est une méthode très populaire. Utile dans l'étude de la pathologie du cœur (infarctus), foie (cirrhose), rein (fibrose glomérulaire) La plupart des techniques colore en rouge la kératine et les fibres musculaires, en bleu ou vert le collagène et l'os, en rouge clair ou rose les cytoplasmes, et en noir les noyaux
- de cellules.
- Noyaux, chromatine et nucléole.....bleu foncé à noir
- Cytoplasme.....rouge
- Globules rouges.....rouge
- Collagène.....Bleu

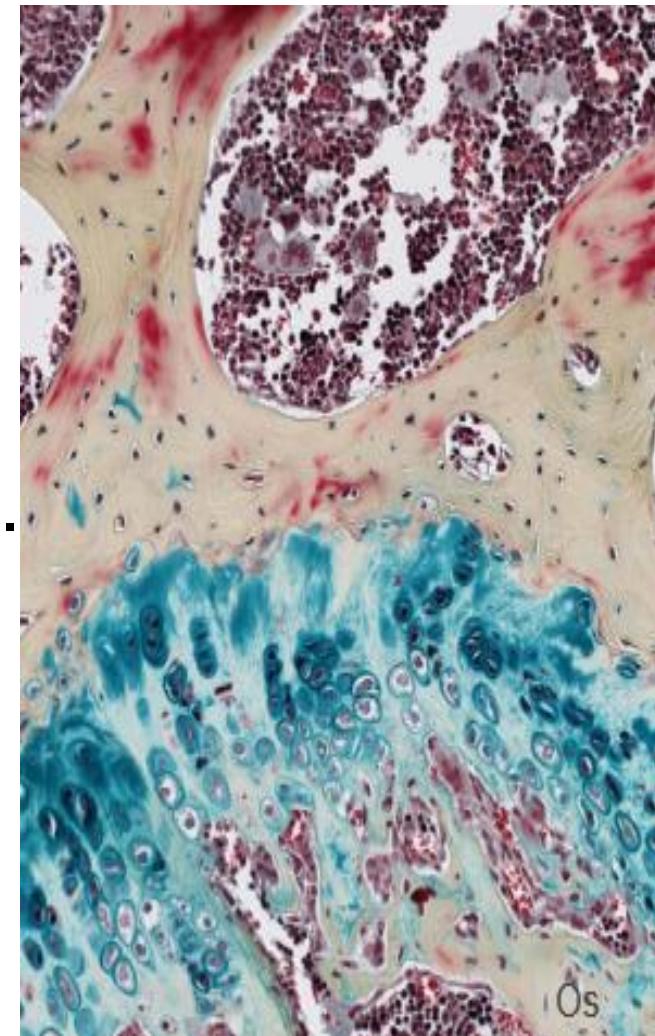


- **M OVAT**

- Cette coloration met en évidence les fibres de collagènes. Elle est parfois demandée en pathologie cardiovasculaire.

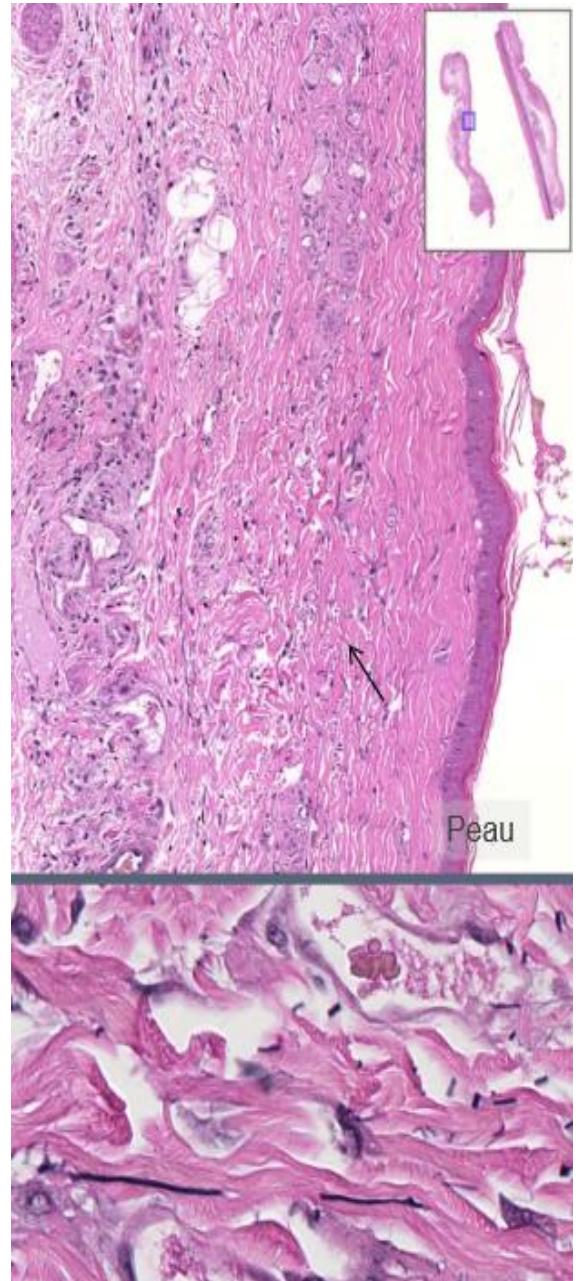
- **M OVAT**

- Noyaux ..... bleu à noir
- Cytoplasme ..... rouge
- Muscle.....
- Collagène et fibres réticulaires ....jaune verdâtre
- Fibrine ..... rouge intense
- Mucine et substance de fond.....bleu limette



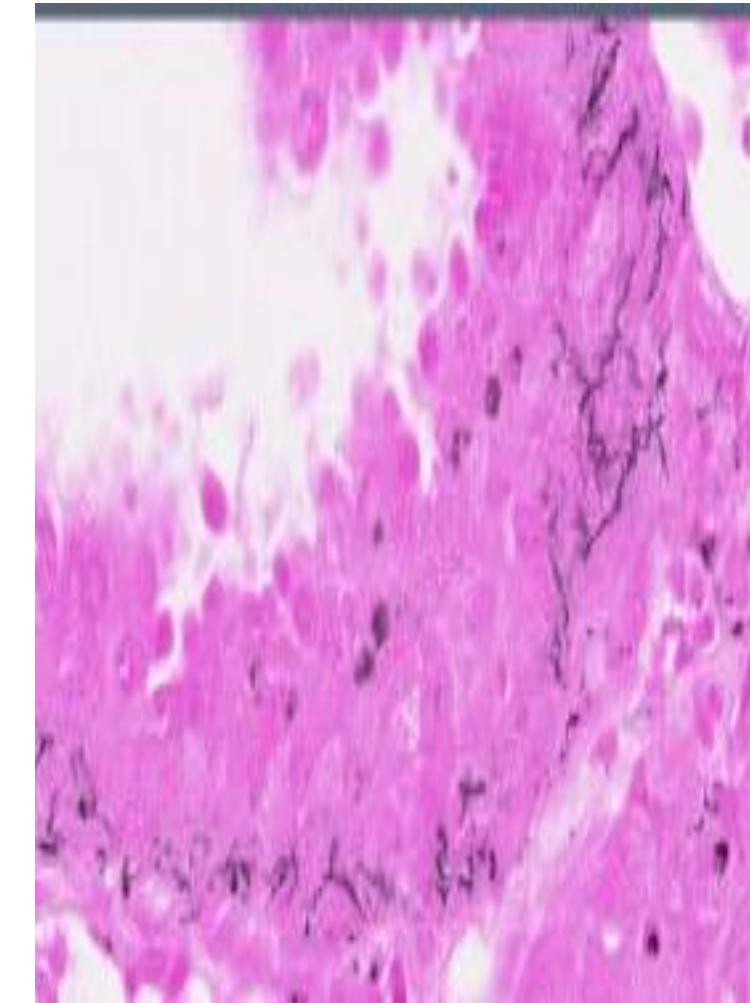
## • Coloration de Verhoeff

- Elle met en évidence le réseau de fibres élastiques. Cette coloration est utile dans le cadre des diagnostics de lésions dégénératives congénitales ou acquises (vergetures, élastose solaire), de vasculite d'artérite temporale. Cette méthode est basée sur la coloration des fibres élastiques par l'hématéine combinée à l'iode et au chlorure ferrique.
- Noyaux.....gris à noir
- Fibres élastiques.....noir
- Cytoplasme.....selon contre coloration
- Globules rouges.....selon contre coloration
- Collagène.....selon contre coloration



- **La Réticuline**

- Cette coloration marque les fibres réticuliniques du stroma et permet de préciser l'architecture des tumeurs (exemple: Architecture folliculaire). elle est très utile dans Les cas où la tumeur est nécrosée. C'est une coloration clé dans l'étude des lésions qui touchent les organes dont la trame est riche en réticuline comme le foie (fibrose, montre le collagène plus jeune), la rate et les ganglions lymphatiques (trame réticulinique constituant le squelette), La Moelle Osseuse (myélofibrose)



- Fibres De réticuline .....noir

- **Recherche du fer : Coloration de Perls**

- Coloration mettant en évidence les complexes
- insolubles contenant du fer (hémosidérine)
- – Macrophages
- – Lors d'une hémorragies
- – Dépôt associé à certaines maladies
- La ferritine et l'hémoglobine ne sont pas révélées par cette méthode
- Méthode en deux étapes:
  - libération du fer contenu dans le tissu
  - réaction in situ produisant un précipité coloré insoluble

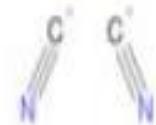
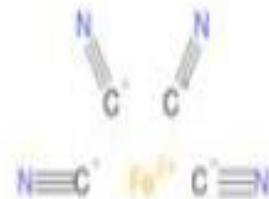
### Principe de la coloration de Perls



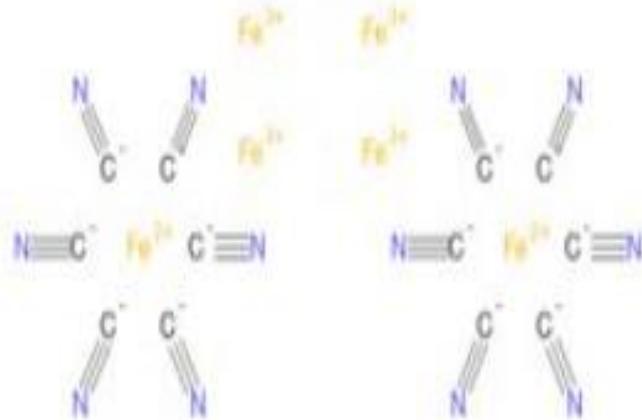
ferrocyanide  
de potassium

Ferrocyanide ferrique  
Insoluble (bleu)

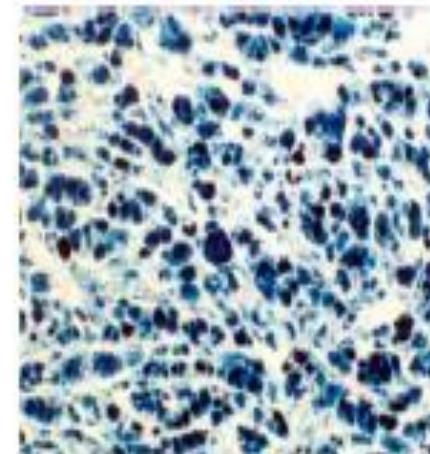
La coloration de Perls est aussi appelée coloration au bleu de Prusse



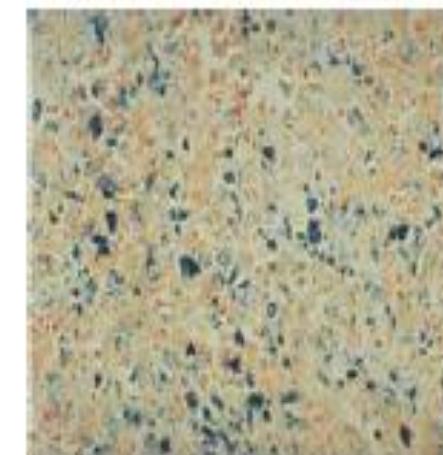
Ferrocyanide ferrique  
= bleu de Prusse



La coloration de Perls: quelques exemples



Corpus luteum (Ovaire)



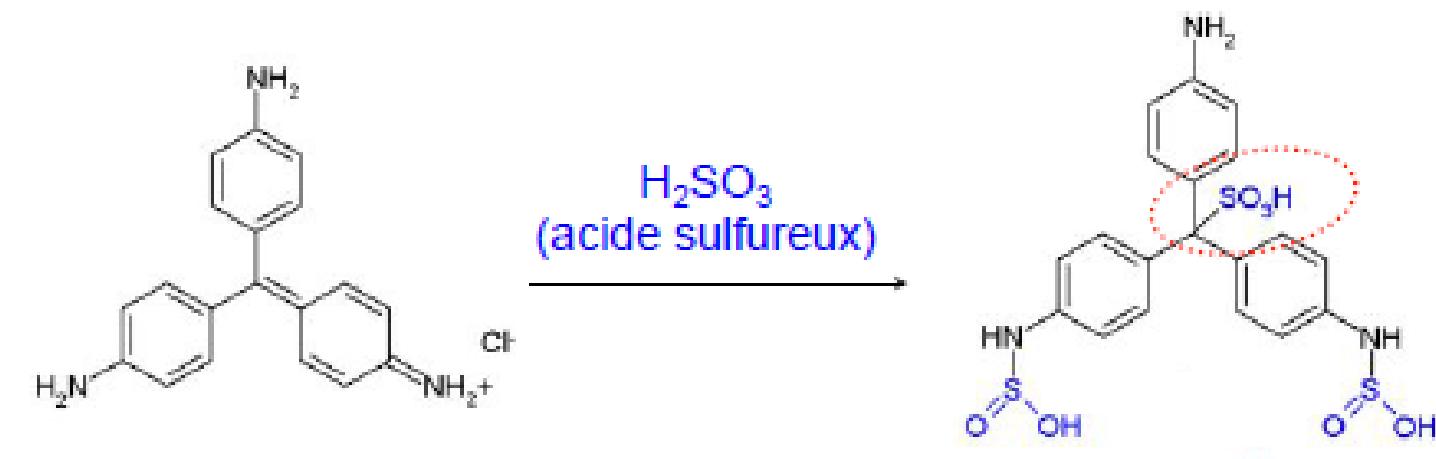
Foie



Ganglions de la base (80 ans)

- Polysaccharides: coloration PAS
- PAS = Periodic Acid-Schiff
- Réaction sur les macromolécules contenant de glucides à groupes glycol 1,2 voisins
- Polysaccharides (glycogène)
- Glycoprotéines (tissu conjonctif, membranes basales)
- Mucines (mucus)
- Glycolipides (membranes cellulaires)
- Méthode en trois étapes:

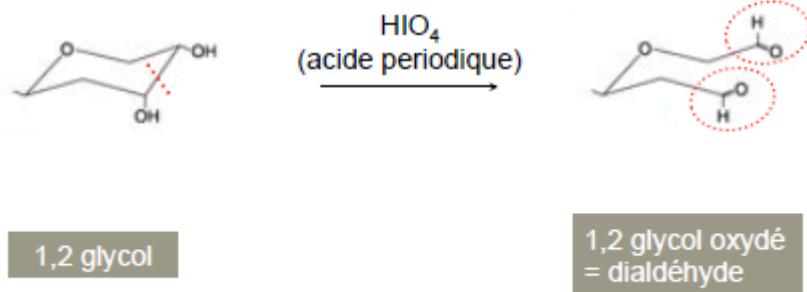
## Génération (décoloration) du réactif de Schiff



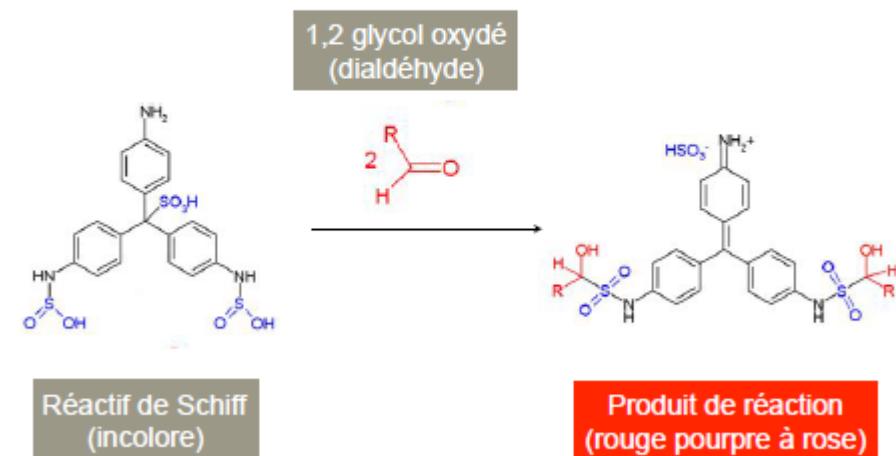
pararosaniline (vert)  
fuchsine (rouge)

réactif de Schiff  
= leucofuchsine  
(incolore)

## Oxydation des glucides (1,2 glycols)



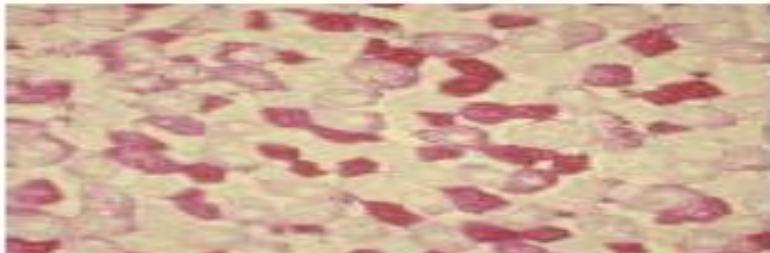
## Coloration des glucides oxydés



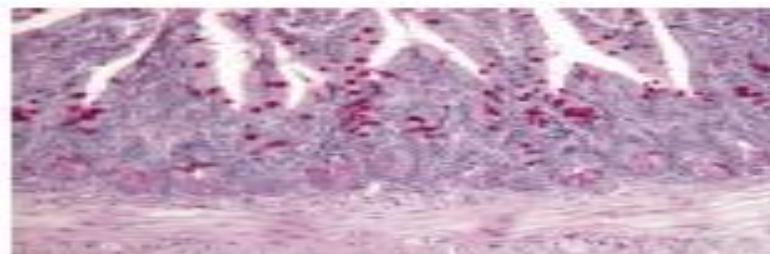
## La coloration PAS: quelques exemples



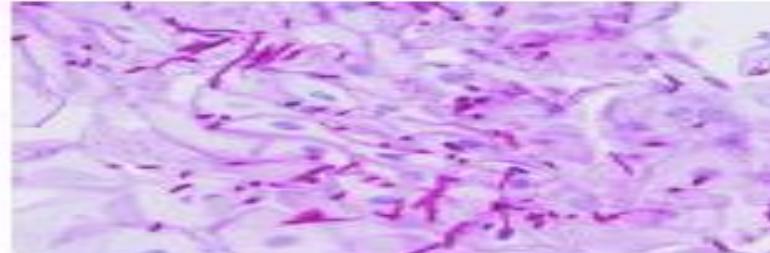
Muscle squelettique



Foie



Tractus digestif (Ileon)



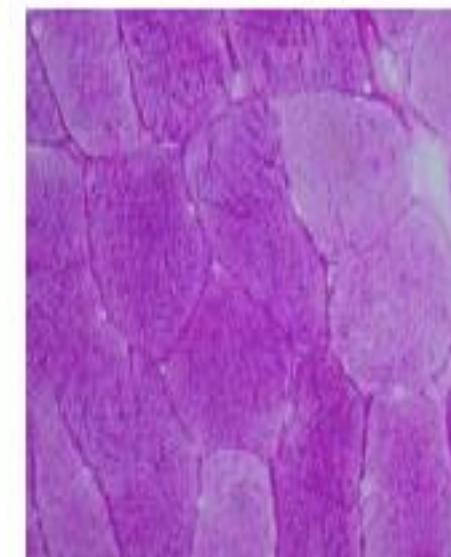
Oesophage (candida albicans)

- **Visualisation d'activités enzymatiques**

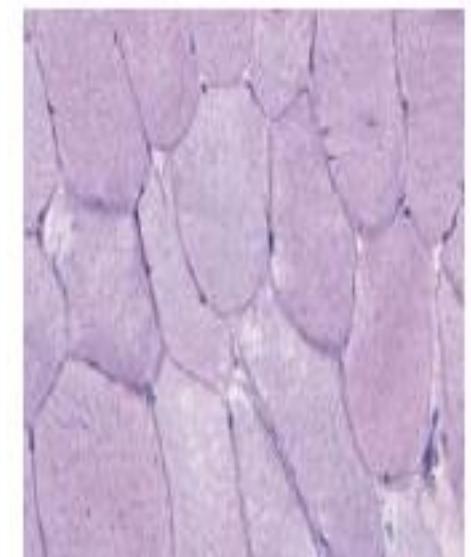
- L'échantillon incubée avec un substrat spécifique de l'enzyme à rechercher
- Le produit de réaction est rendu insoluble et coloré "
- marquage du lieu où se trouve l'enzyme
- Il est important d'utiliser une méthode de fixation, d'enrobage et de coupe adaptées afin de préserver
- l'activité de l'enzyme recherchée
- Exemple de colorations d'enzymes:
  - Peroxydase
  - Phosphatase alcaline
  - B galactosidase

## La coloration PAS-diastase (PAS-D)

- La diastase ( $\alpha$ -amylase) catalyse l'hydrolyse des liaisons  $\alpha$ -1,4-glycosidiques
- Utilisée comme control pour la recherche du glycogène
- L'échantillon est traité à la diastase afin d'éliminer le glycogène (pourpre  $\Rightarrow$  rose pâle)



Muscle squelettique (PAS)

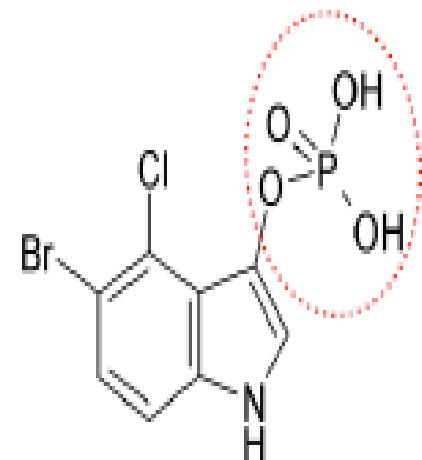


Muscle squelettique (PAS-D)

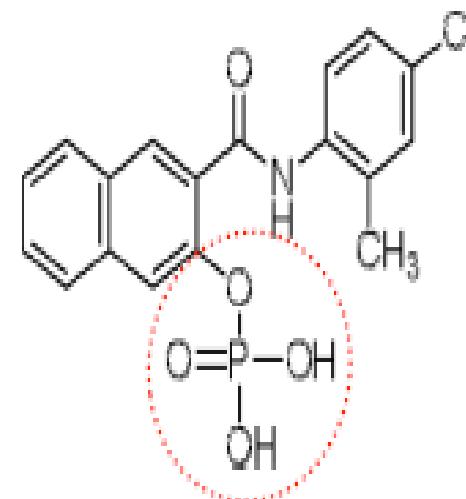
## • Phosphatase alcaline (AP)

- Enzyme catalysant les réactions de déphosphorylation (nucléotides, protéines)
- L'activité de l'enzyme est plus élevée à pH basique
- Présente dans tous les tissus (foie, rein, os,...)
- Enzyme très utilisée en clonage moléculaire
  - SAP (shrimp alkaline phosphatase)
  - CIP (Calf intestine alkaline phosphatase)
- Système de détection très utilisé dans les immunoessais
  - Immunohistochimie
  - Western blot
  - ELISA
  - HYBRIDATION In situ

## Substrats de la phosphatase alcaline

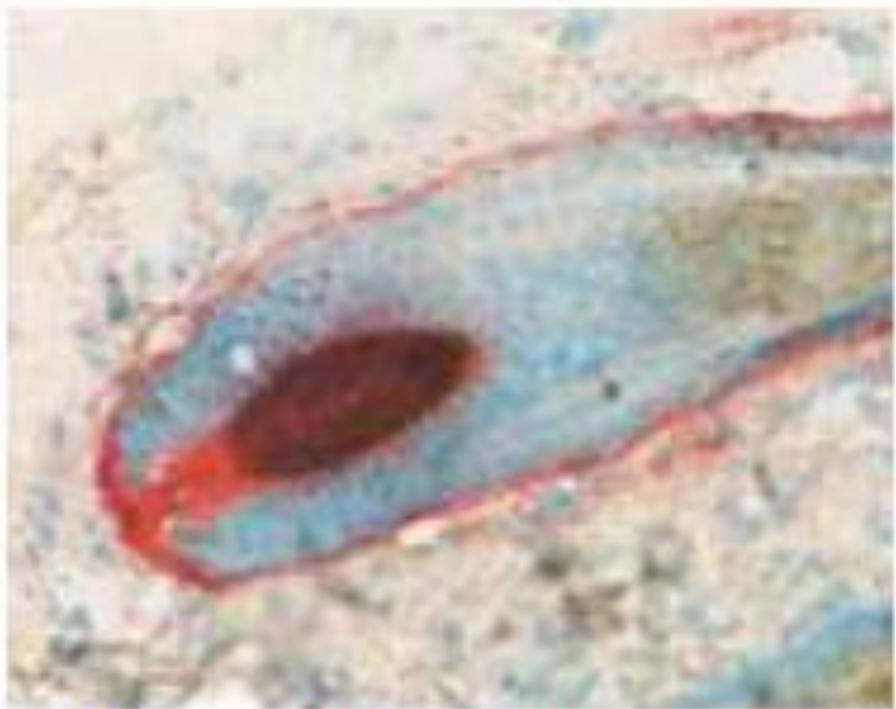


5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate  
(BCIP, X-Phos)



Naphtol AS-TR phosphate

## Phosphatase alcaline: exemples



Bulbe pileux (peau)  
(Naphtol AS-TR/Fast red)



Vaisseaux cortex visuel  
(BCIP/NBT)

Tableau 1.1

## Liste des colorations histochimiques les plus courantes

Nom de la coloration	Nature des principales substances colorées
PAS	Glycogène/mucines neutres/lipopigments/champignons
Bleu Alcian	Mucines acides
Rouge Congo	Amylose
Von Kossa	Sels de calcium
Perls	Hémosidérine (fer ferrique)
Fontana-Masson	Mélanine, lipofuscines
Trichrome de Masson	Collagènes
Picrosirius	Collagènes
Gomori, Weigert, Verhoeff	Fibres élastiques
Gordon-Sweet, Tuzi, Wilder	Fibres de réticuline, membranes basales
Rouge à l'huile	Triglycérides
Ziehl	Mycobactéries
Grocott	Champignons, certains parasites
Whartin-Starry	Certaines bactéries
Gram	Certaines bactéries

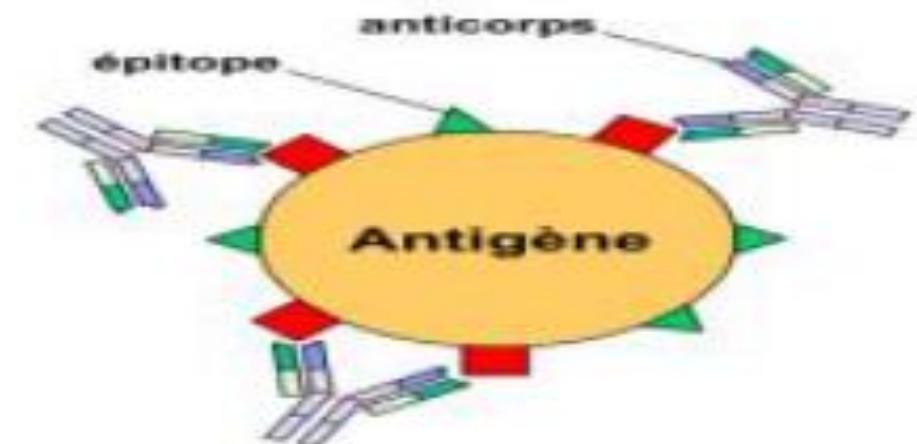
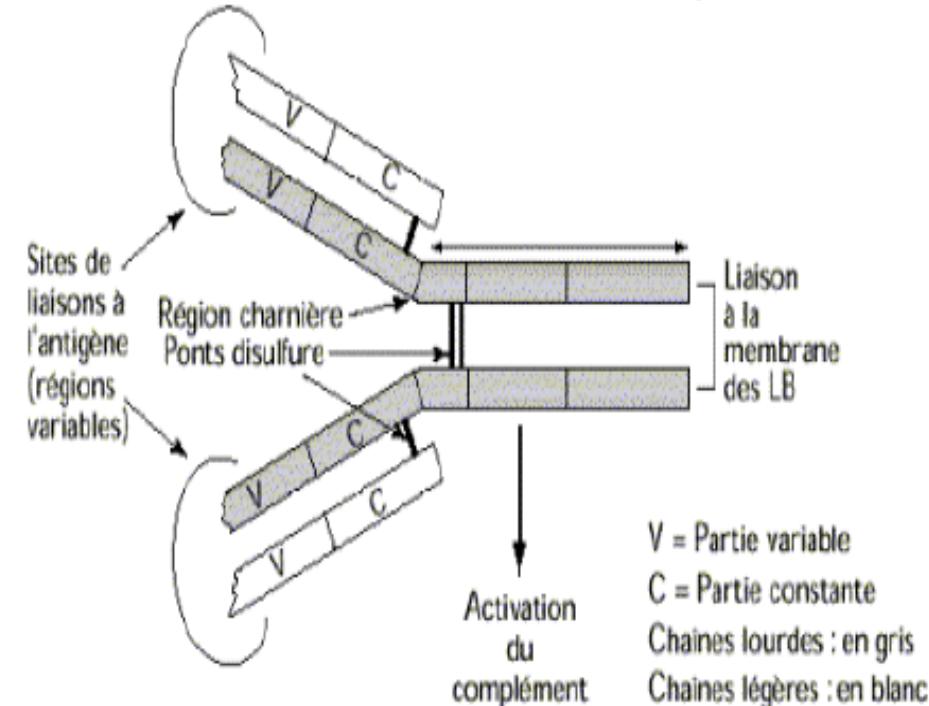
# L'immunohistochimie

- **Intérêt et définitions.**
- L'intérêt de cette technique est de repérer des antigènes (protéines le plus souvent) d'intérêt au niveau cellulaire ou extracellulaire à l'aide d'anticorps spécifiques.
- Un antigène est une molécule capable d'activer le système immunitaire et de conduire à la production d'anticorps.
- Un anticorps est une glycoprotéine, sécrétée par les plasmocytes, capable de se lier spécifiquement à l'antigène.
- On appelle épitope le site de l'antigène où se fixe l'anticorps

## • Immunohistochimie, immunocytochimie

- Ces techniques permettent d'identifier et de localiser des protéines sur une préparation histologique ou cytologique grâce à ses propriétés antigéniques.
- Elles s'effectuent sur des lames non colorées (lames « blanches ») après déparaffinage éventuel.
- Si l'antigène recherché est présent dans le prélèvement, il fixera l'anticorps marqué, et le point précis où se trouve le complexe antigène-anticorps apparaîtra au microscope, soit sous forme d'une zone fluorescente si l'anticorps est lié à un fluorochrome, soit sous forme d'une zone colorée si l'anticorps est couplé à une enzyme révélée par une méthode histoenzymatique.

Schéma 1  
Structure d'une molécule d'anticorps

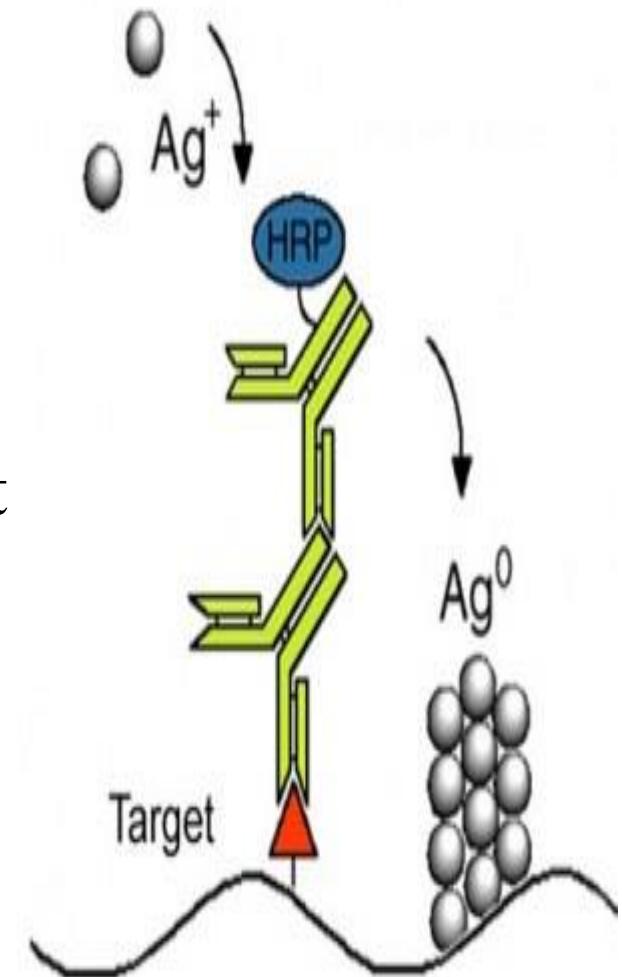


## • Principes de l'immunohistochimie

- 1) exploiter la réponse immunitaire de diverses espèces pour produire des anticorps spécifiques.
- 2) réaliser la liaison antigène-anticorps spécifique.
- 3) détecter (visualiser) le complexe antigène-anticorps.

## • Un antigène possède en général plusieurs épitopes

- En fonction de la configuration de l'antigène, un épitope peut ne pas être accessible à l'anticorps.
- Plusieurs anticorps peuvent se lier à un même épitope avec des affinités différentes.
- Un même épitope peut parfois être présent sur plusieurs antigènes.
- La principale difficulté de l'IHC est de disposer d'un bon anticorps spécifique et pouvant atteindre son épitope sur coupe



## • **Classification**

- On distingue 2 types d'anticorps : **les anticorps polyclonaux et les anticorps monoclonaux.**
- Les anticorps spécifiques polyclonaux peuvent être fabriqués en injectant à plusieurs reprises un échantillon de l'antigène (protéine à détecter) à un animal (le plus souvent, lapin ou chèvre), et en recueillant ensuite le sérum riche en anticorps (antisérum).
- Cet antisérum contient différents anticorps dits polyclonaux, produits par différents plasmocytes, reconnaissant divers antigènes de la protéine d'intérêt.
- **Avantages** : simple, peu couteux.
- **Inconvénients** : - risques de réactions croisées (signal non spécifique) ;
- quantités limitées de sérum

- **Un anticorps monoclonal** correspond à une population d'anticorps identiques dirigés contre le même site antigénique d'une protéine. Ces anticorps sont produits en grande quantité en culture par un clone de lymphocytes B selon la technique des hybridomes.
- les anticorps monoclonaux ou **monoclonal** sont identiques car produits par un clone de cellules spécialisées du système immunitaire (les plasmocytes). La production de ces anticorps in-vitro est très difficile à cause de la faible durée de vie des plasmocytes.

In-vivo, la production de ces anticorps peut être obtenue en injectant chez l'animal un antigène donné puis extraction de ceux-ci dans le sang. Cette méthode est très couteuse et très peu d'anticorps sont obtenus.

- Le principe de la production d'hybridomes repose sur la fusion des lymphoblastes B sécrétant des anticorps mais qui ne se multiplient pas in-vitro, avec des cellules de myélome lymphoïde, qui ont la capacité de se multiplier à l'infini in-vitro dans un milieu de culture.
- **Avantages** : un seul anticorps par clone (limite les réactions croisées) ;
- **Inconvénients** : - long, coûteux, résultats incertains

## Technique

L'application des anticorps peut se faire de deux manières distinctes : **par méthode directe**, c'est-à-dire en liant un anticorps conjugué à un marqueur à sa substance cible, c'est une méthode peu sensible (pas d'amplification du signal) et qui nécessite d'utiliser des Ac couplés à un chromogène fluorescent (Fluorescéine, Rhodamine, Rouge Texas....). Intérêt : permet facilement les doubles marquages et évite les problèmes liés aux peroxydases endogènes. Le marquage est labile dans le temps

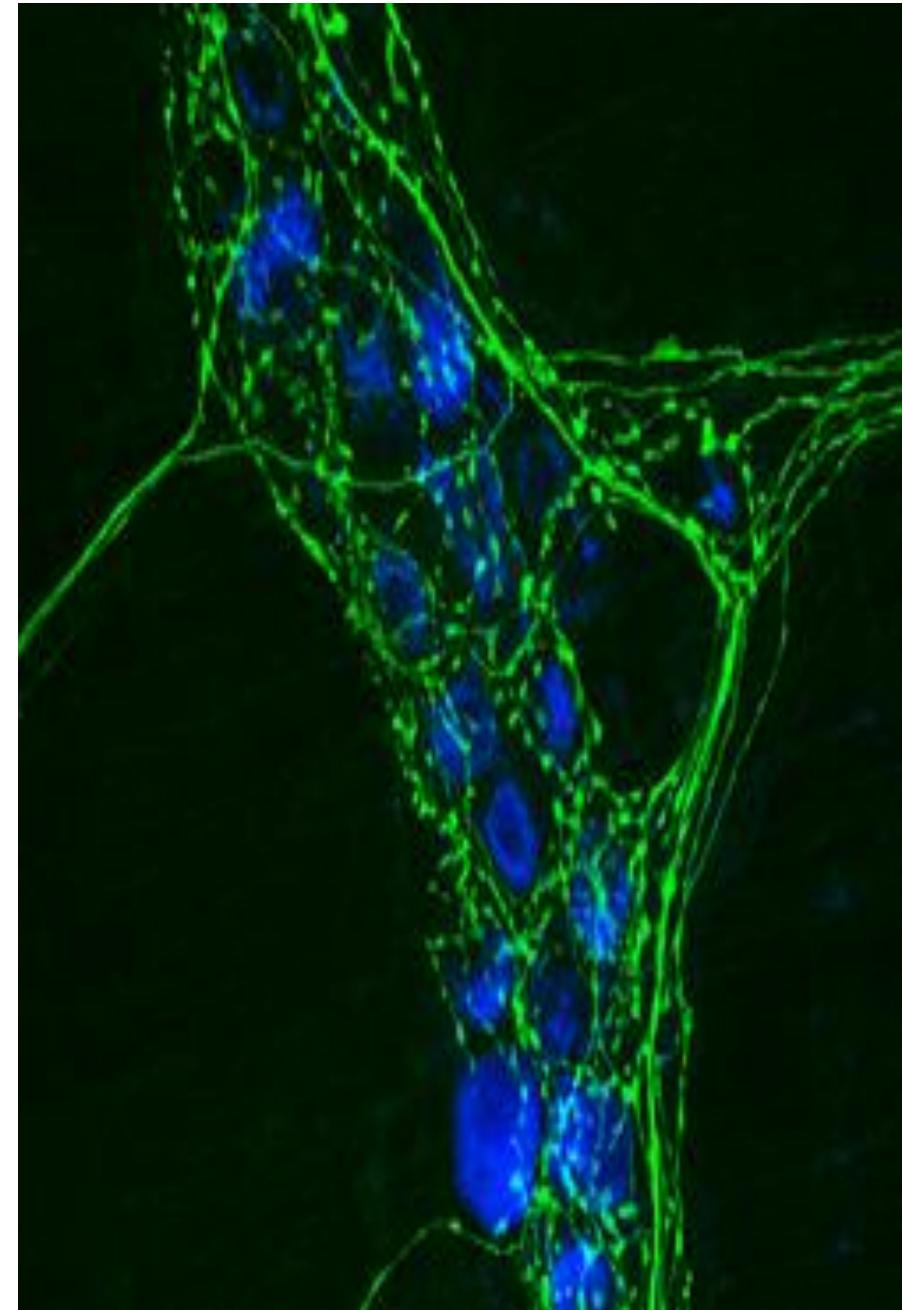
- **Dans les méthodes immunoenzymatiques indirectes** : l'anticorps spécifique primaire est déposé sur le tissu, puis il est révélé par un deuxième anticorps couplé à une enzyme à laquelle on fournit son substrat. Le produit coloré de la réaction enzymatique apparaît au niveau du site des complexes antigène-anticorps (Ag-Ac).

- Après étalement, déparaffinage et séchage des coupes, l'anticorps primaire est déposé directement sur le tissu et reconnaît, s'il existe, le récepteur antigénique recherché.

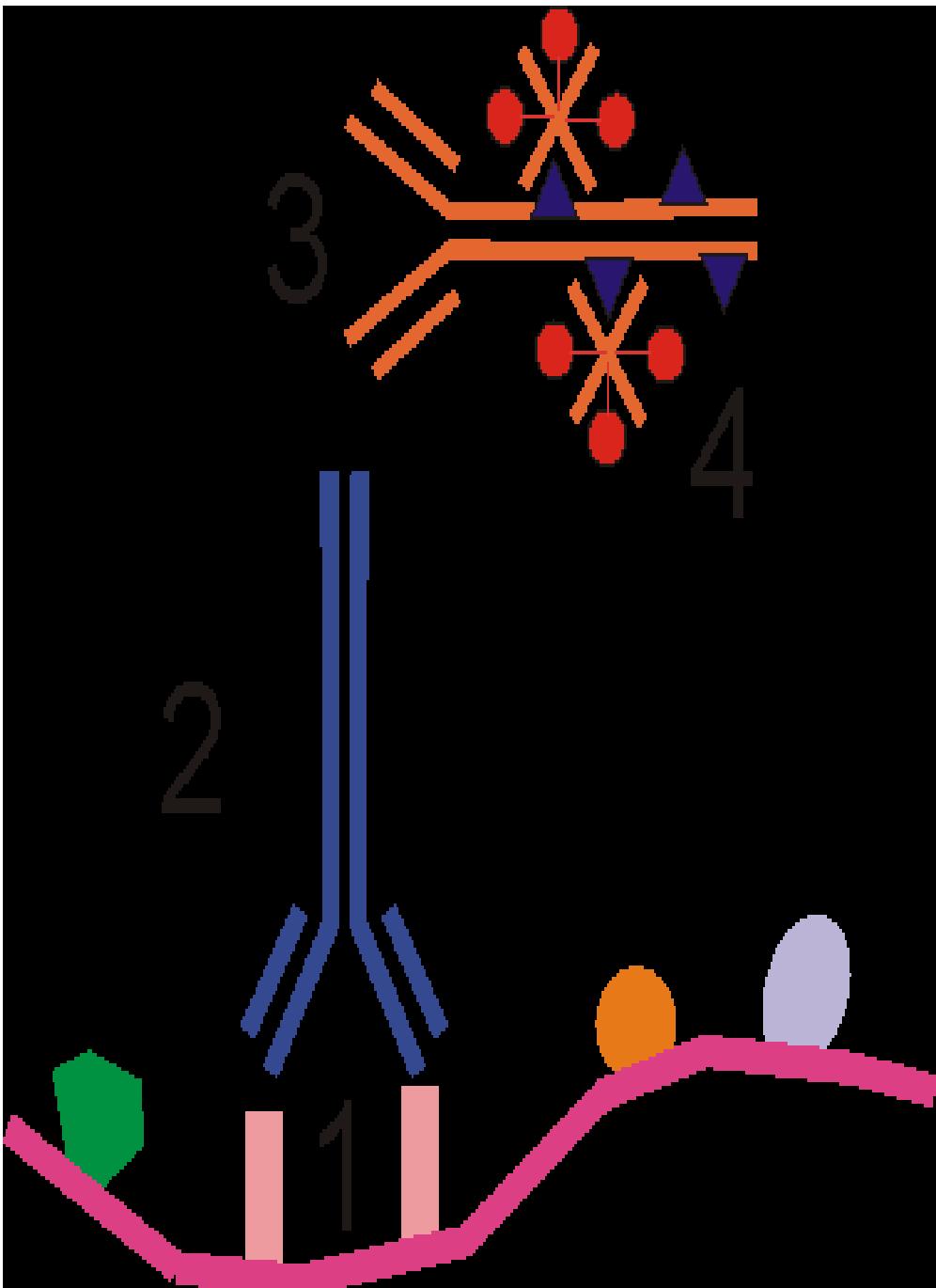
Un deuxième anticorps susceptible de se fixer à l'anticorps primaire et complexé à un système avidine-biotine-peroxydase permettant la révélation est appliqué.

La Diaminobenzidine ou l'Acide Ethynyl-Corbazole révèle la réaction en brun et rouge respectivement.

Une contre-coloration douce avec l'hématoxyline recolore le tissu et rend possible une détermination topographique du marquage.



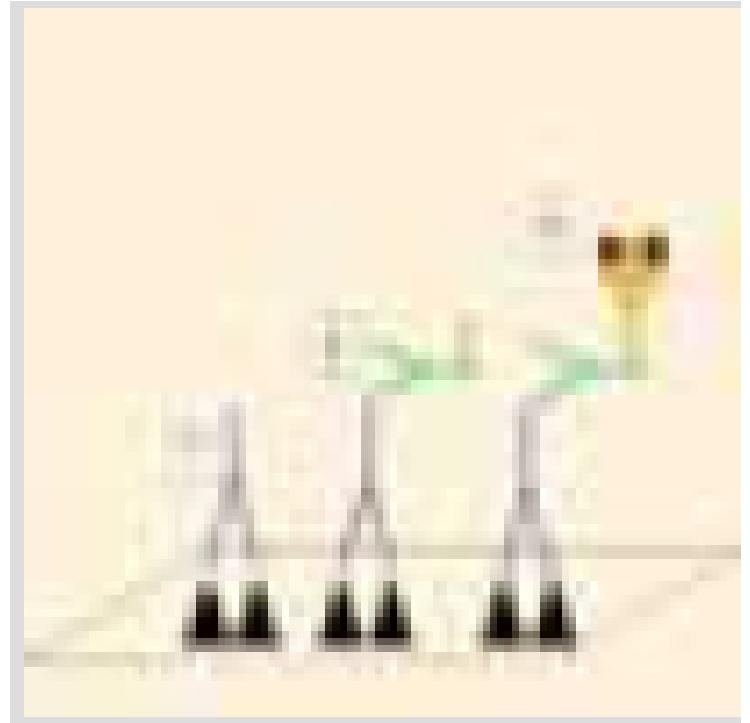
l'immunohistochimie indirecte, les enzymes utilisées sont la peroxydase ou la phosphatase alcaline et les chromogènes sont le plus souvent la diaminobenzidine (réaction de couleur brune) ou l'aminoethylcarbazole (réaction de couleur rouge). Il existe dans la méthode immunoenzymatique indirecte un risque de marquage non spécifique par fixation de l'Ac secondaire sur le récepteur du Fc des immunoglobulines : ces sites de fixation non spécifique doivent donc être bloqués au cours de la technique de l'immunohistochimie



**Méthode immunoenzymatique de type streptavidine-biotine-peroxydase** : 1) l'anticorps primaire(bleu) se fixe à l'antigène ; 2) l'anticorps secondaire (vert) se fixe à l'anticorps primaire et porte une molécule de biotine; 3) la biotine fixe un complexe streptavidine-peroxydase

**Méthode immunoenzymatique avec amplification du signal**

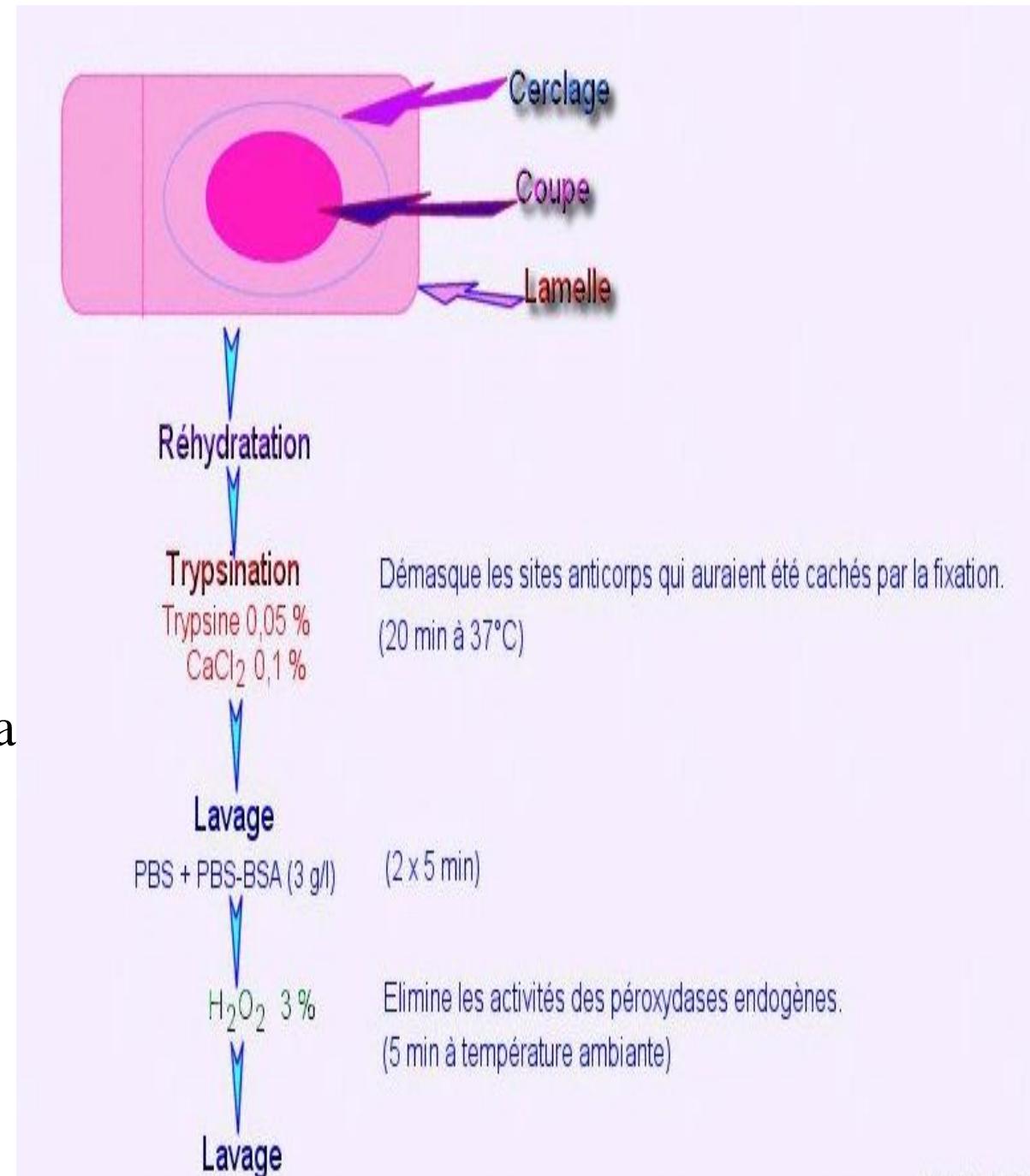
par un polymère : 1) l'anticorps primaire (bleu) se fixe à l'antigène ; 2) l'anticorps secondaire (vert) se fixe à l'anticorps primaire et est couplé à un polymère inerte (ligne noire) qui porte plusieurs molécules d'anticorps secondaire et de peroxydase



- L'utilisation de tissus congelés ou de tissus fixés et inclus en paraffine comporte des avantages et inconvénients :
- **congélation** : nécessité de disposer de tissus frais, d'un système de stockage (au moins à - 80 °C), de pratiquer des coupes au cryostat ; morphologie moins bien conservée que sur des coupes fixées et incluses dans la paraffine. L'intérêt majeur est de pouvoir visualiser des épitopes détruits par des procédés de fixation et d'inclusion. Néanmoins, les indications de l'immunohistochimie sur coupes à congélation tendent à diminuer, d'une part en raison de la fabrication de nouveaux Ac reconnaissant des épitopes résistants à la fixation, d'autres part grâce aux techniques de démasquage antigénique (micro-ondes, autocuiseur, bain-marie) et aux systèmes de révélation ultrasensibles.

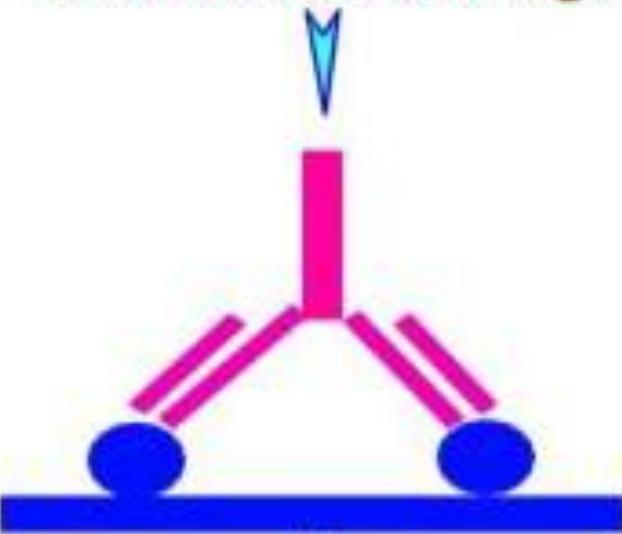
· tissus fixés inclus en paraffine : les avantages sont l'utilisation *a posteriori* quand le tissu a été fixé et la possibilité d'études rétrospectives (sur blocs ou sur lames) ainsi qu'une morphologie bien conservée. Mais certains épitopes sont détruits : pour y remédier, nécessité d'une bonne fixation. Le choix du fixateur est important (en règle préférer le formol tamponné), car certains épitopes sont détruits par certains fixateurs (alcooliques surtout) et l'éventuelle décalcification. Eviter les températures excessives au moment de l'inclusion et du séchage des lames. Nécessité pour de nombreux épitopes d'un démasquage antigénique (prétraitement qui permet de rompre les liaisons moléculaires créées par le fixateur et modifiant la configuration spatiale des épitopes et leur accessibilité aux antigènes) : digestion enzymatique ou plus souvent chauffage des coupes dans un tampon au four à micro-ondes,

- Exemple :
- Un premier anticorps de souris anti-kératines se fixe spécifiquement sur les kératines. La présence de cet anticorps est révélé par la fixation d'un anticorps secondaire biotynilé de lapin anti-souris (kit DAKO LSAB kit, Peroxidase universale K680). Cette méthode utilise la haute affinité de la streptavidine pour la biotine. La streptavidine est couplée à l'enzyme peroxydase et va se fixer sur l'anticorps secondaire biotynilé. L'activité de la peroxydase induira la coloration du chromogène.



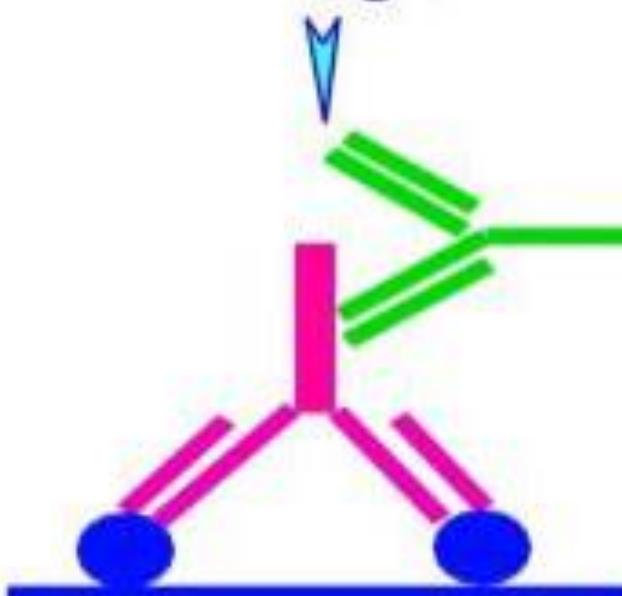
## Réactif de blocage

Bloque les colorations non spécifiques. (3 min)

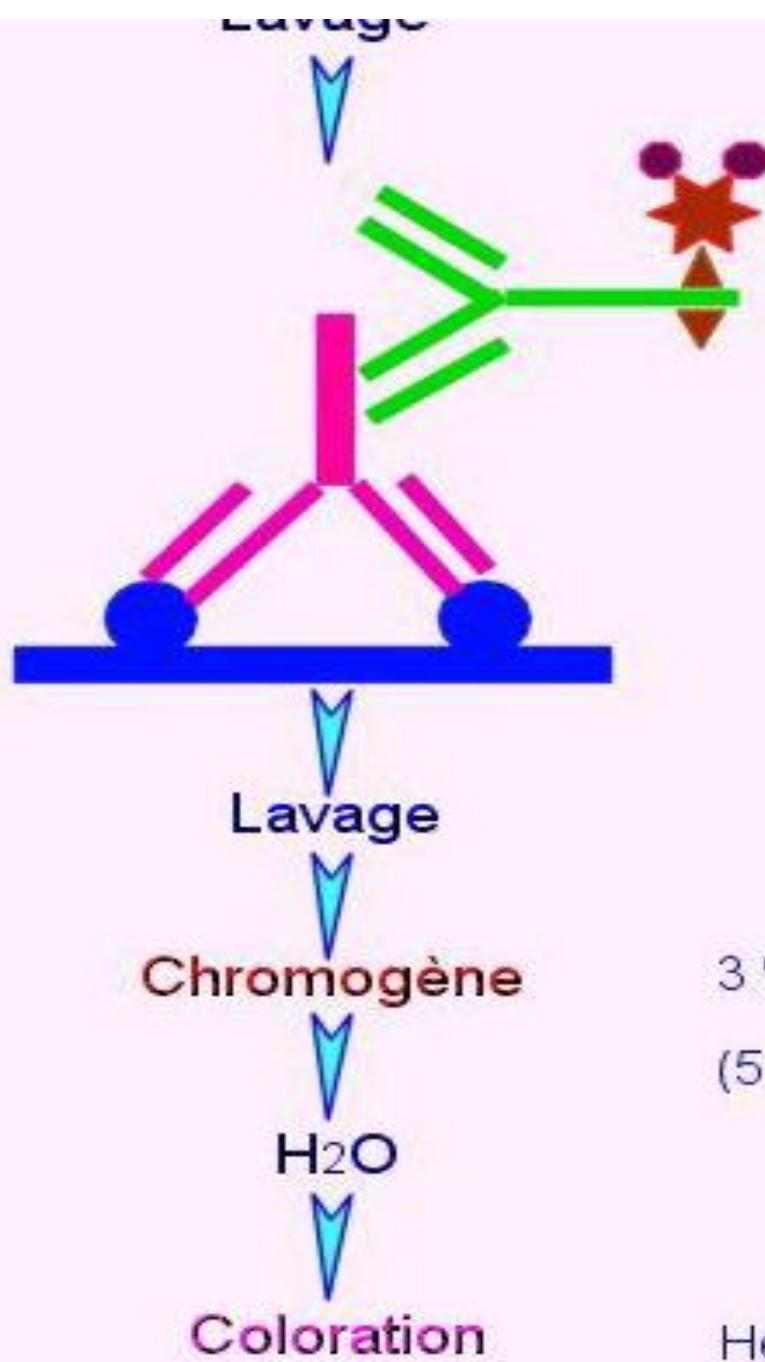


Anticorps monoclonaux anti-kératines de souris (anti-K19 : 20 µg / ml ou anti-K18 : 20 µg / ml ou anti-K13 : 20 µg / ml ou anti-K8 : 20 µg / ml). (1 heure à température ambiante)

## Lavage



Anticorps biotinylés de lapin anti-souris.  
(30 min à température ambiante)

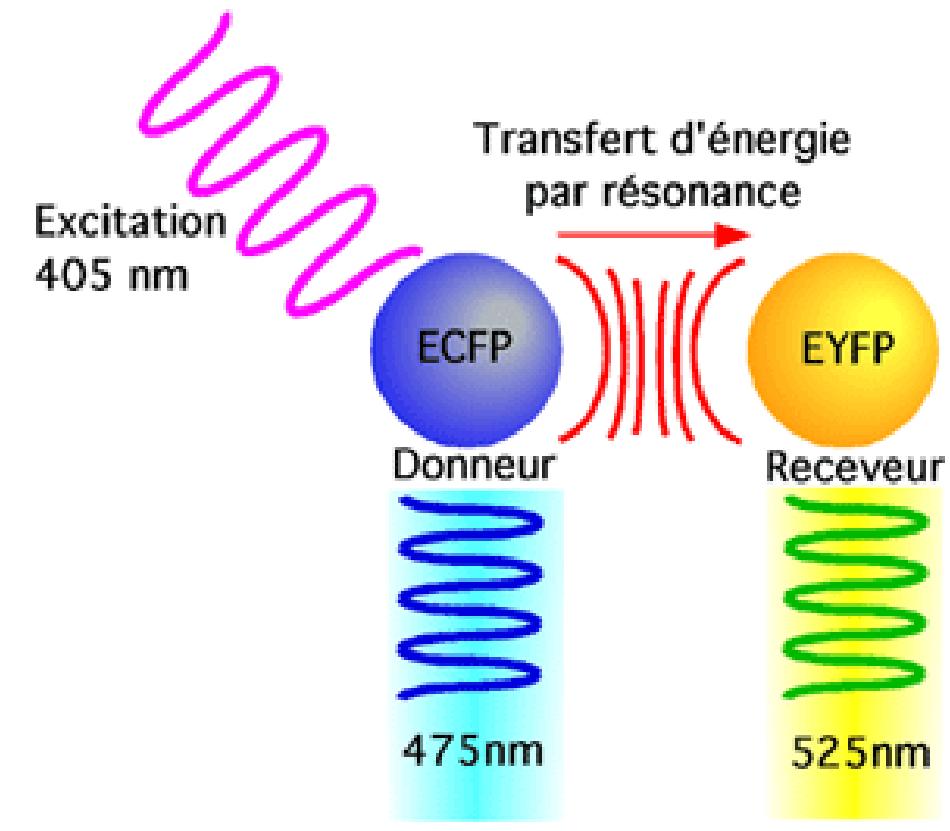


# Interactions protéines-protéines FRET

## Interactions protéines-protéines

### FRET (fluorescence resonance energy transfer)

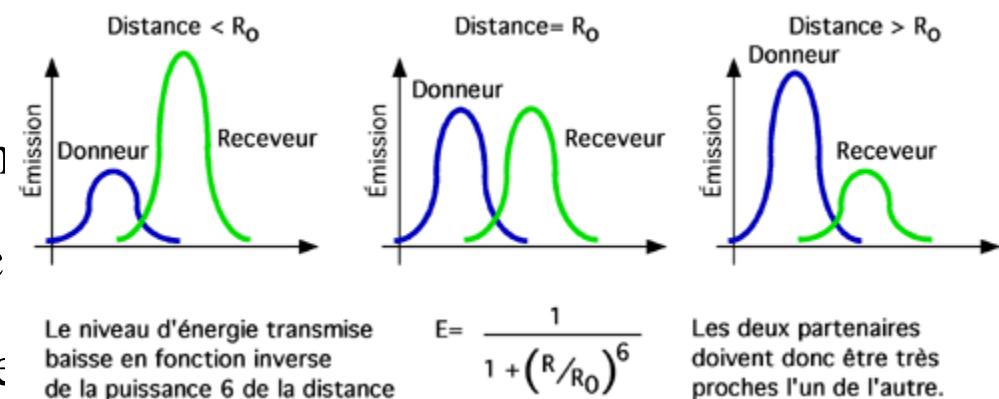
Le FRET est une technique qui permet de détecter la proximité de deux molécules fluorescentes. La première, (dite le "donneur"), est excitée par une longueur d'onde  $\lambda_1$  (dans l'UV, par exemple). Le donneur va libérer des photons de longueur d'onde  $\lambda_2$  (dans le bleu, par exemple), qu'on peut détecter. Il peut aussi transférer par résonance une partie de son énergie d'excitation à la seconde molécule fluorescente (le "receveur") qui libérera aussi des photons, mais à une longueur d'onde qui lui est propre,  $\lambda_3$  (dans le jaune, par exemple). Puisqu'il y a transfert d'énergie entre le donneur et le receveur (et que rien ne se perd, rien ne se crée), plus le transfert d'énergie est efficace et plus le receveur émet de photons par rapport au donneur.



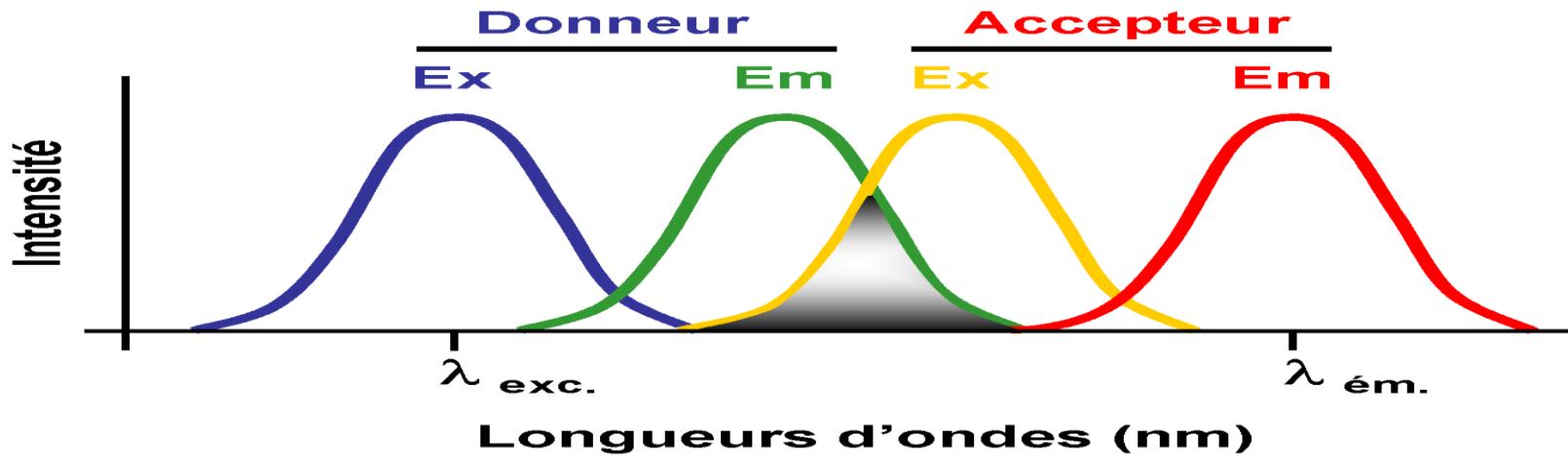
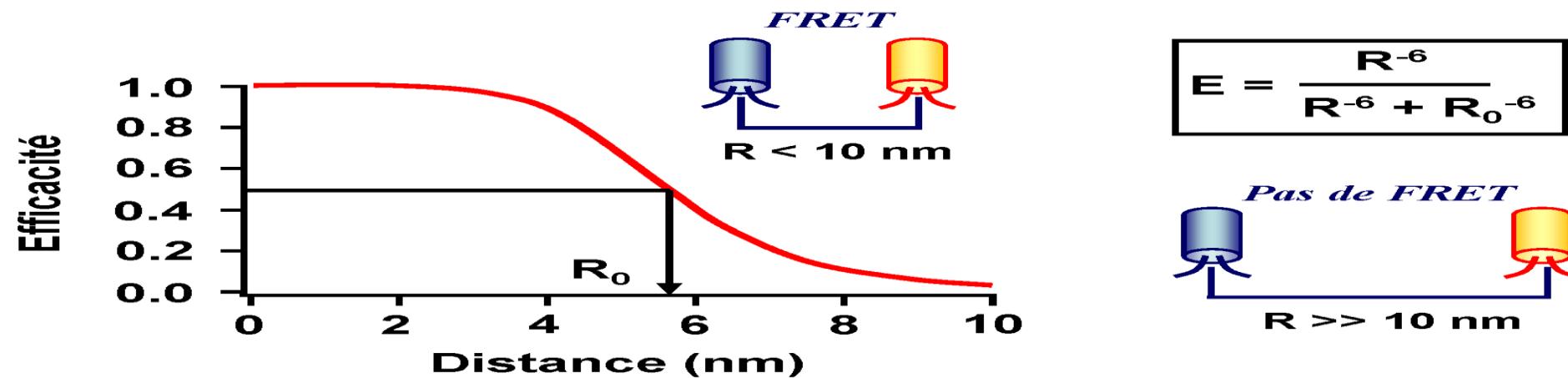
le transfert d'énergie du donneur au receveur, souligné par la détection de l'émission de lumière  $\lambda_3$ , indique que le donneur et le receveur ont été très proches l'un de l'autre car l'efficacité du FRET est proportionnelle à l'inverse de la puissance 6 de la distance entre les deux molécules.

Les deux molécules doivent être séparées par 10-100 Angstrom le spectre d'absorption de l'accepteur doit chevaucher le spectre d'émission du donneur; et les orientations des dipôles du donneur et de l'accepteur doivent être à peu près parallèles.

La distance à laquelle le transfert est efficace à 50% est appelée distance de Förster et varie selon les agents fluorescents utilisés.

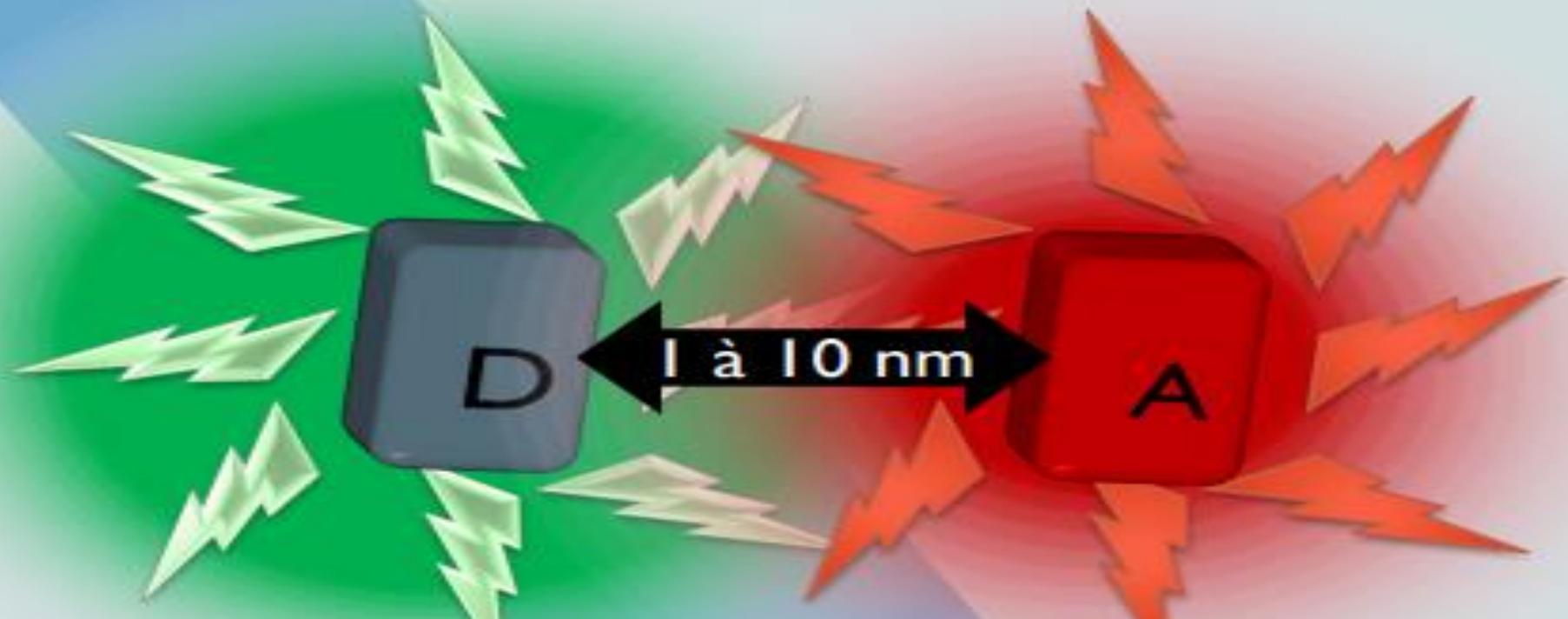


Donneur	Accepteur	Distance de Förster ( $R_0$ ) (Angstroms)
Fluorescein	Tetramethylrhodamine	55 Å
IAEDANS	Fluorescein	46 Å
EDANS	Dabcyl	33 Å
Fluorescein	QSY7 et QSY9	61 Å
ECFP	EYFP	50 Å

**A****B****C**

# Théorie du FRET

Définition : Processus non radiatif par lequel de l'énergie d'un fluorophore donneur à l'état excité est transmis à un fluorophore accepteur à proximité immédiate (1-10nm)

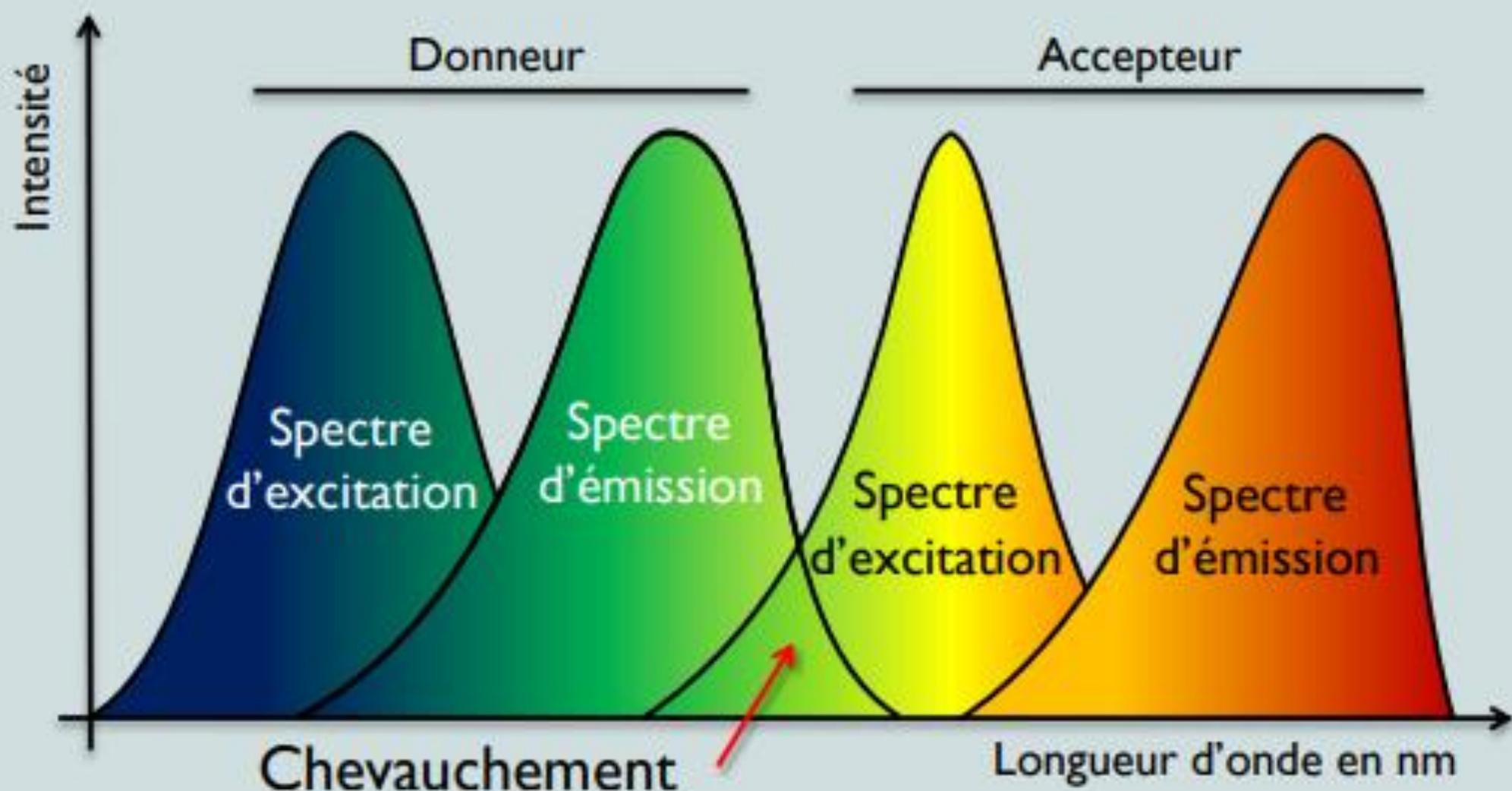


## Les conditions

### I. Excitation du donneur

## Les conditions

### II. Chevauchement du spectre d'émission du donneur et du spectre d'absorption de l'accepteur



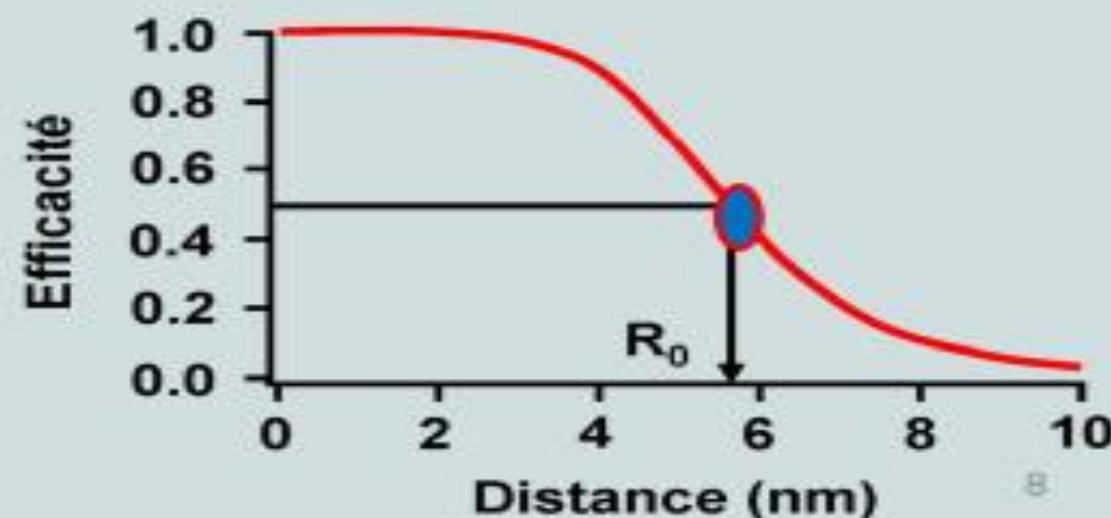
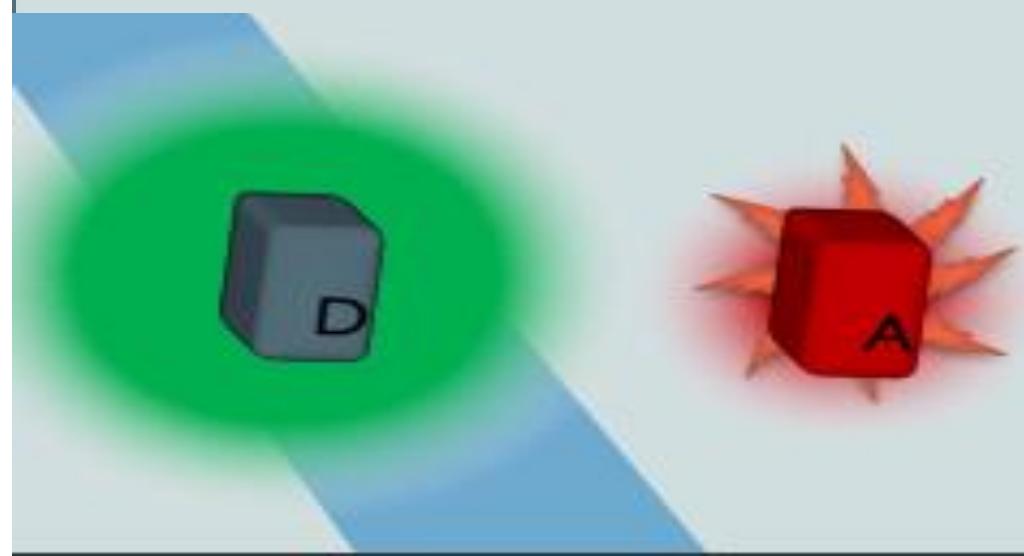
# Les conditions

## III. Distance donneur/accepteur 1-10 nm

Efficacité de transfert  $E = \frac{\text{nb de molécules qui se désactivent par transfert}}{\text{nb total de molécules excitées}}$

$$E = \frac{1}{1 + (R/R_0)^6}$$

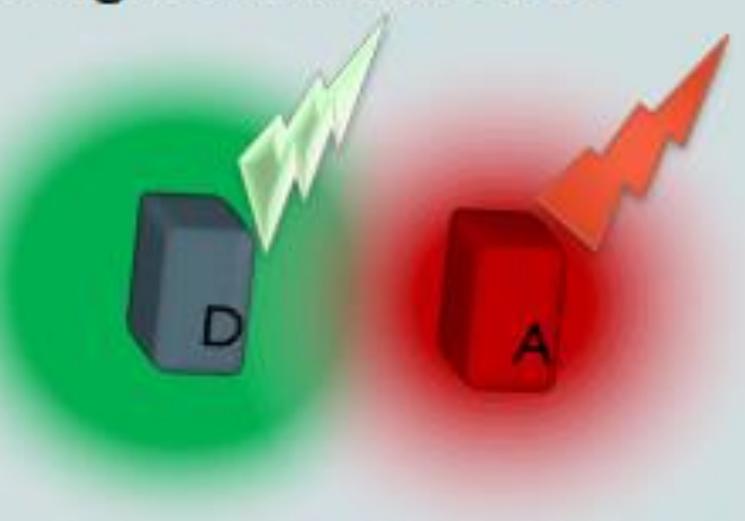
- $R$  : distance effective qui sépare les deux molécules
- $R_0$  : rayon de Förster  
= distance donneur - accepteur pour laquelle l'efficacité du transfert d'énergie est de 50%.



## Les conditions

### IV. Orientation donneur – accepteur favorable

Angle différent de 90°



FRET

Angle égal à 90°

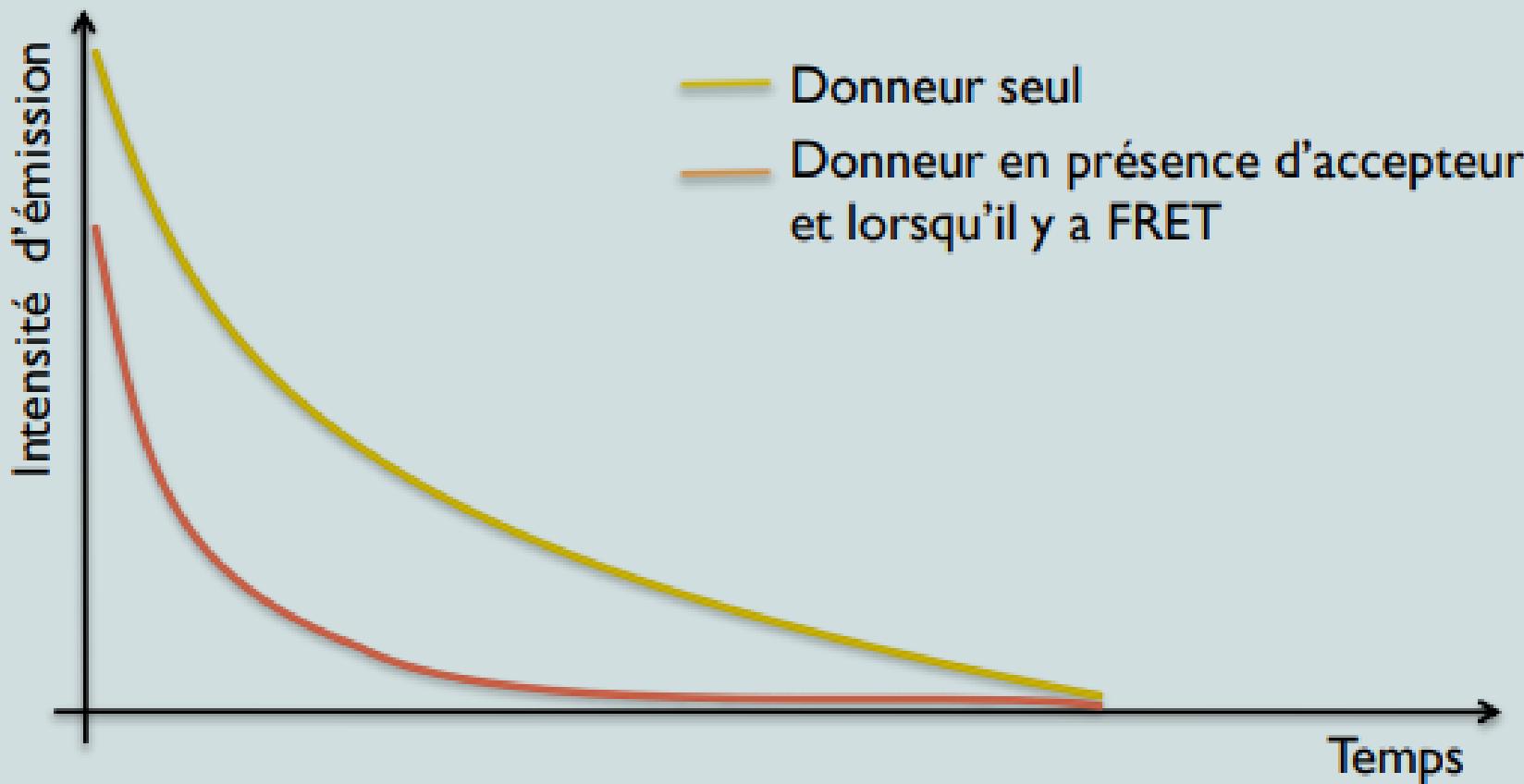


Pas de FRET

Remarque : En Biologie ceci n'est généralement pas un problème car les donneurs et les accepteurs peuvent avoir une certaine liberté de rotation

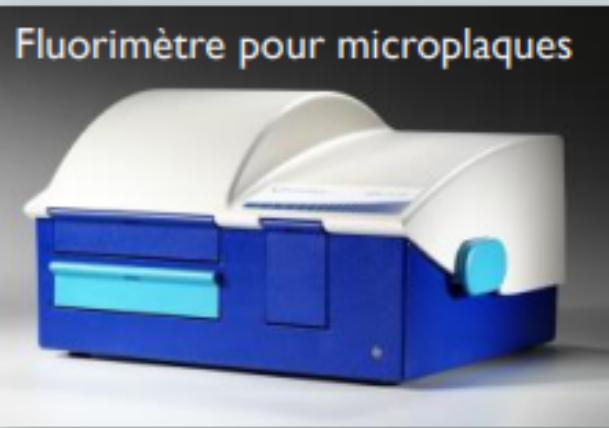
## Les conséquences

- Diminution de l'intensité de fluorescence du donneur et augmentation de l' intensité de fluorescence de l'accepteur
- Diminution de la durée de vie de fluorescence du donneur



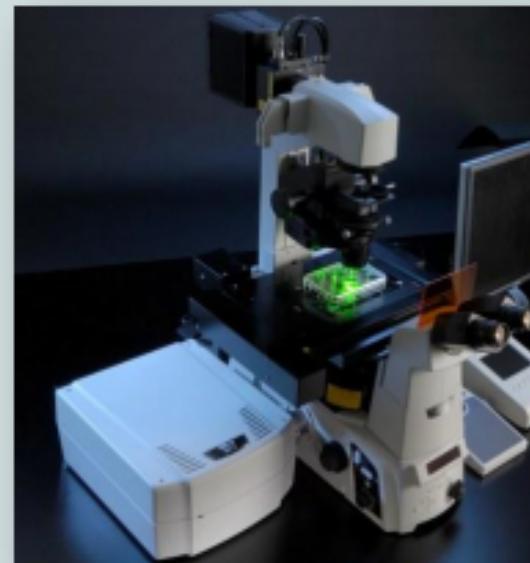
# Visualisation et Mesure du FRET

## Fluorimètre



Appareil qui va permettre de mesurer le spectre de fluorescence d'une molécule en fonction de la longueur d'onde d'excitation et inversement on pourra mesurer la variation de la fluorescence pour diverses longueurs d'ondes d'excitation.

## Microscope



Après excitation du donneur celui-ci va à son tour (s'il y a interaction) exciter le receveur, permettant ainsi la mesure de la fluorescence. En plus de l'information sur l'existence de l'interaction, nous aurons une information de localisation subcellulaire. Act

# Visualisation et Mesure du FRET

## Mesure du FRET par intensité

### Mesure de l'intensité du donneur



Débris

### Mesure de l'augmentation de l'intensité de l'accepteur



Corrections à apporter concernant la fluorescence détectée dans le canal de l'accepteur due au donneur

### Mesure du ratios donneur/accepteur



La stœchiométrie donneur /accepteur doit être constante au cours de l'expérience

## Mesure du FRET par photoblanchiment (pbFRET)

## Mesure du FRET par pbFRET de l'accepteur (DFRAP)

## Mesure du FRET à l'aide de la durée de vie de fluorescence (FLIM)

# Applications du FRET

## Etude d'interactions intermoléculaires

### Protéine - Protéine



Exemple :

- Montrer la dimérisation de récepteurs couplés aux protéines G,
- Analyser la fixation d'un ligand sur un récepteur
- Mettre en évidence l'interaction de canaux ioniques de type L avec la calmoduline .

Act  
Acc

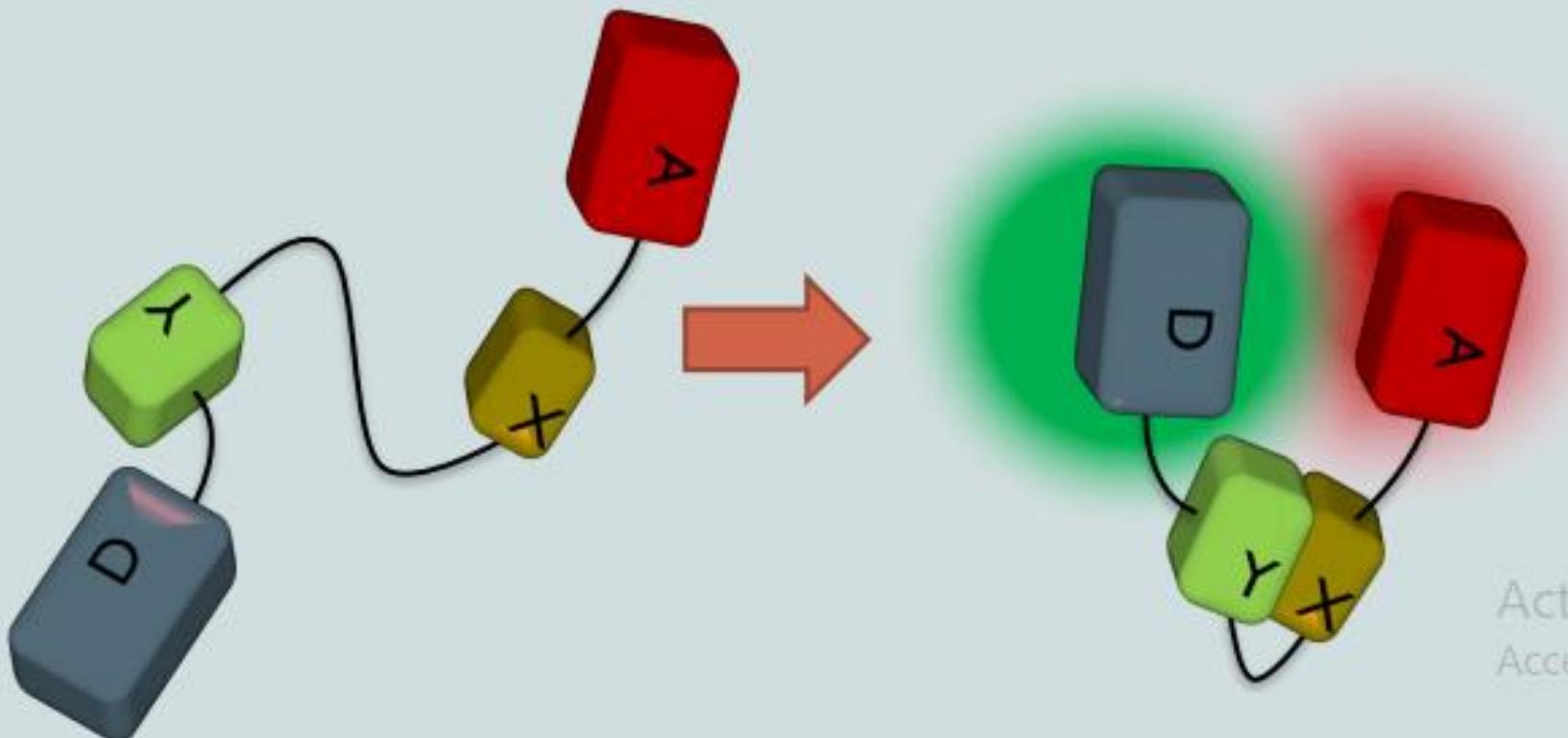
# Applications du FRET

## Etude d'interactions intramoléculaires

Dimérisation de protéines

Caractérisation de complexes macromoléculaires

Changements conformationnels de protéines



# Applications du FRET

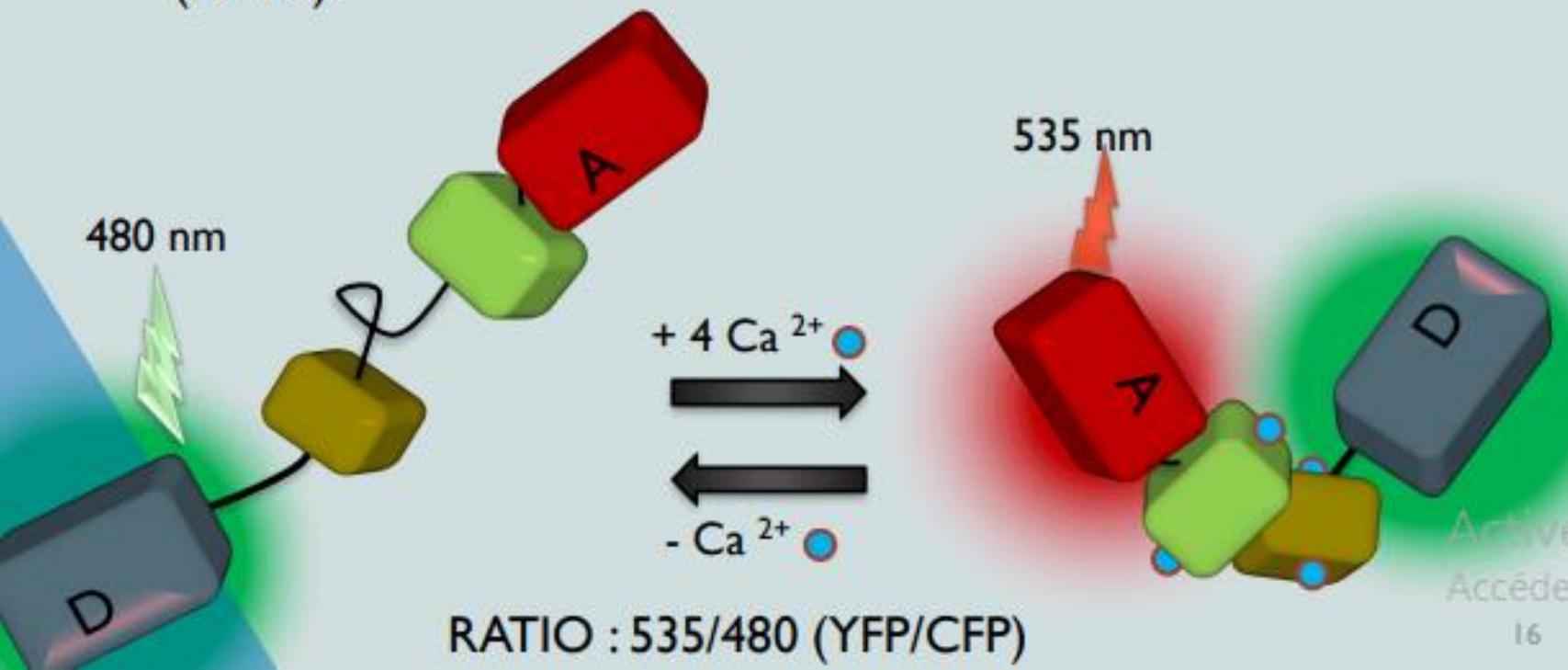
## Etude d'interactions intramoléculaires

Dimérisation de protéines

Caractérisation de complexes macromoléculaires

Changements conformationnels de protéines

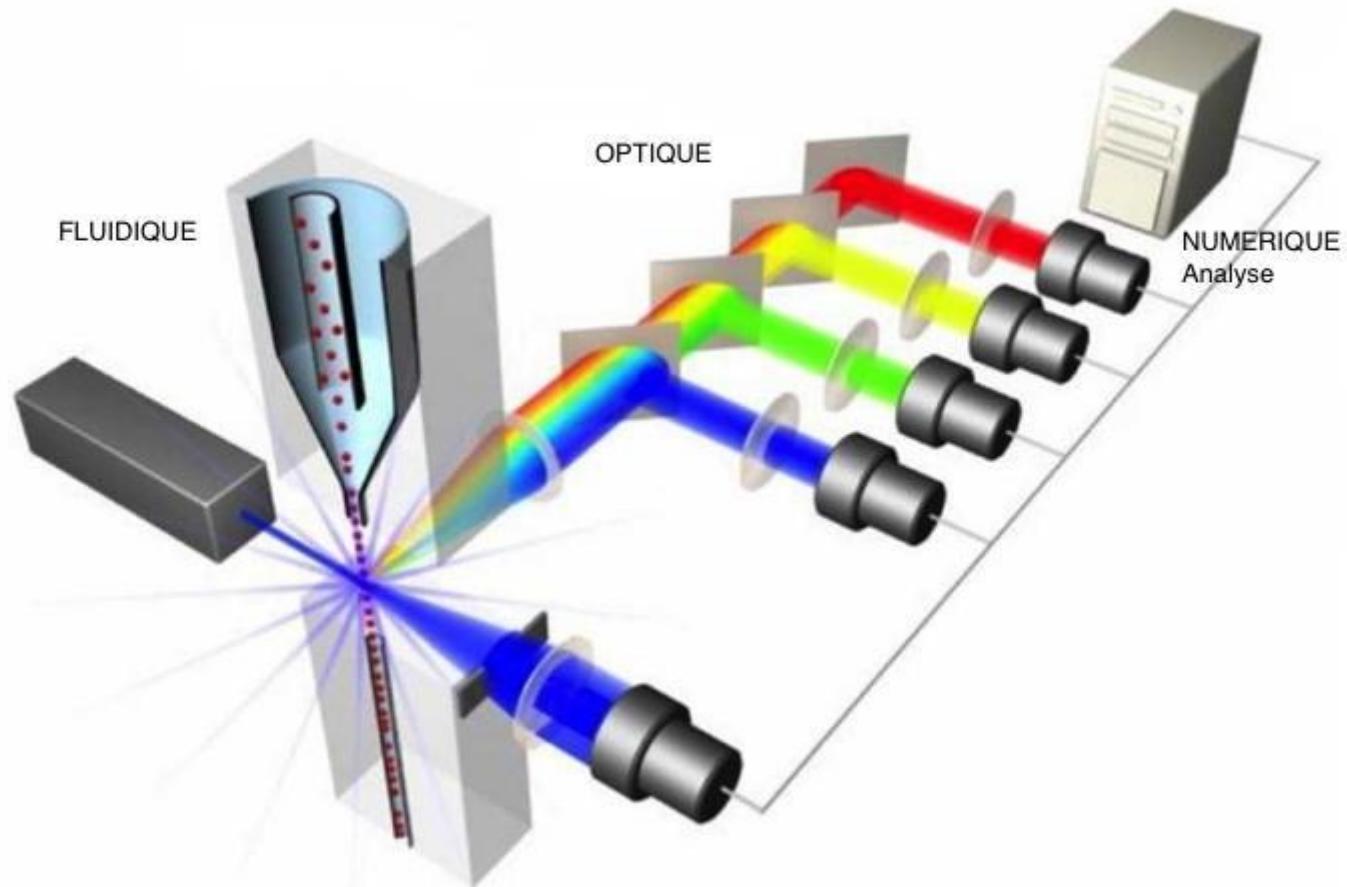
Biosenseurs : applications à l'étude d'activités enzymatiques, à la détermination de concentration d'ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ou de métabolites (AMPc).



- Certains accepteurs ne fluorescent pas, mais en absorbant l'énergie du donneur ils causent une baisse de sa fluorescence qui peut être quantifiée. (Un tel accepteur non-fluorescent, dit "*quencher*" (ou "*éteignoir*"), est utilisé dans le système TaqMan de PCR quantitatif).

Une forme de FRET utilise des *protéines* fluorescentes comme donneur et accepteur; cette approche permet d'utiliser le FRET dans un contexte *in vivo*. On lui donne parfois le nom de BRET pour *Bioluminescent Resonance Energy Transfer*. On s'en sert dans les cellules vivantes en incitant celles-ci à produire des protéines de fusion avec des domaines naturellement fluorescents, comme les variantes de la GFP (*green fluorescent protein*) que sont la ECFP (*enhanced cyan fluorescent protein*) ou la EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*). Le rayon de Förster entre la ECFP et la EYFP est de 50Å.

# Cytometrie en flux



- **Qu'est ce que la Cytométrie en flux?**

C'est une technologie qui permet la mesure simultanée de plusieurs caractéristiques physiques d'une particule (cellule) en suspension.

**Quelles sont les informations sur la cellule apportées par la cytométrie en flux (CMF)?**

Sa taille relative (Forward Scatter),

Sa granularité ou sa complexité interne relative (Side Scatter),

Son intensité relative de fluorescence.

- La CMF est définie comme l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux liquide. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide. Elle consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs:

- aux propriétés optiques intrinsèques des particules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule, à leur structure interne, ou à l'auto fluorescence de certaines cellules comme les végétaux, le phytoplancton...
- aux propriétés optiques induites de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires.

Ces signaux séparés par des filtres optiques sont collectés par des photomultiplicateurs, amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur.

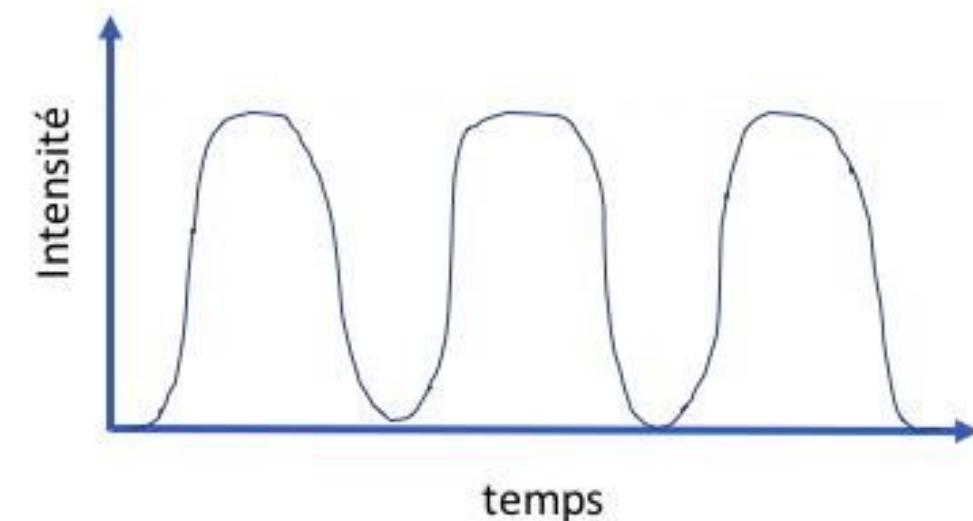
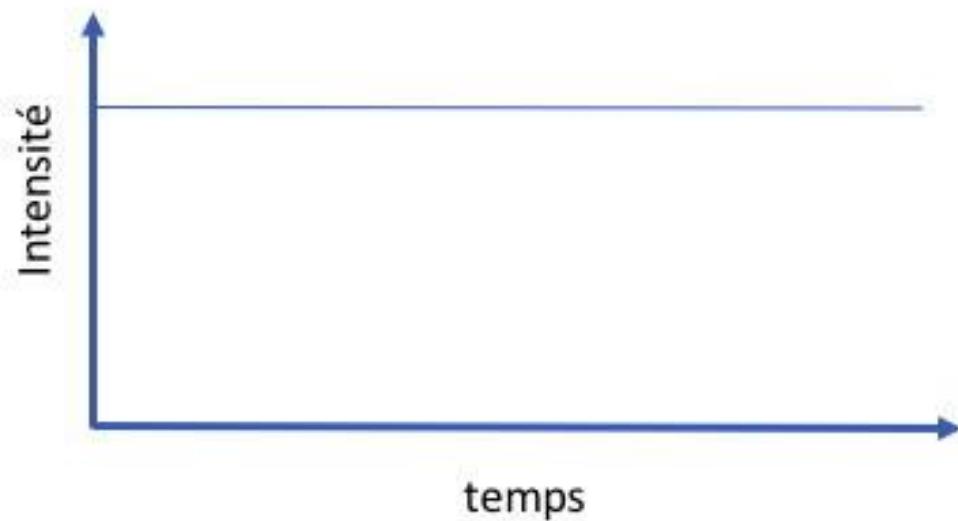
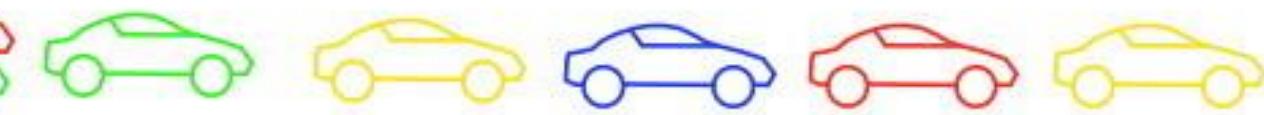
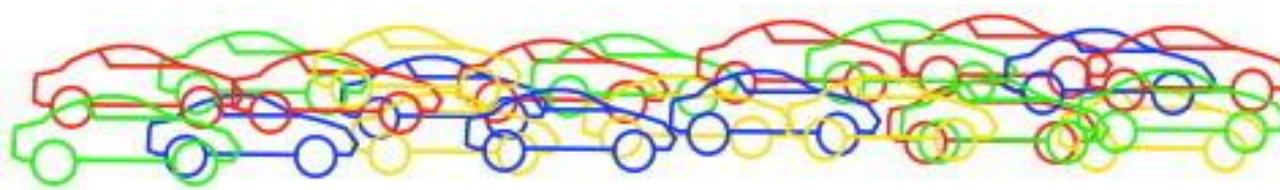
- Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. L'ordinateur calcule les données statistiques associées aux distributions des paramètres mesuré et les représente sous la forme d'histogrammes (1 paramètre) ou de cytogrammes (2 paramètres) sur une ou plusieurs populations dont les propriétés cellulaires sont ainsi évaluées. La fonction tri des cytomètres en flux les plus évolués permet de trier physiquement plusieurs populations cellulaires définies par leurs propriétés optiques.

## • **LES ECHANTILLONS CELLULAIRES**

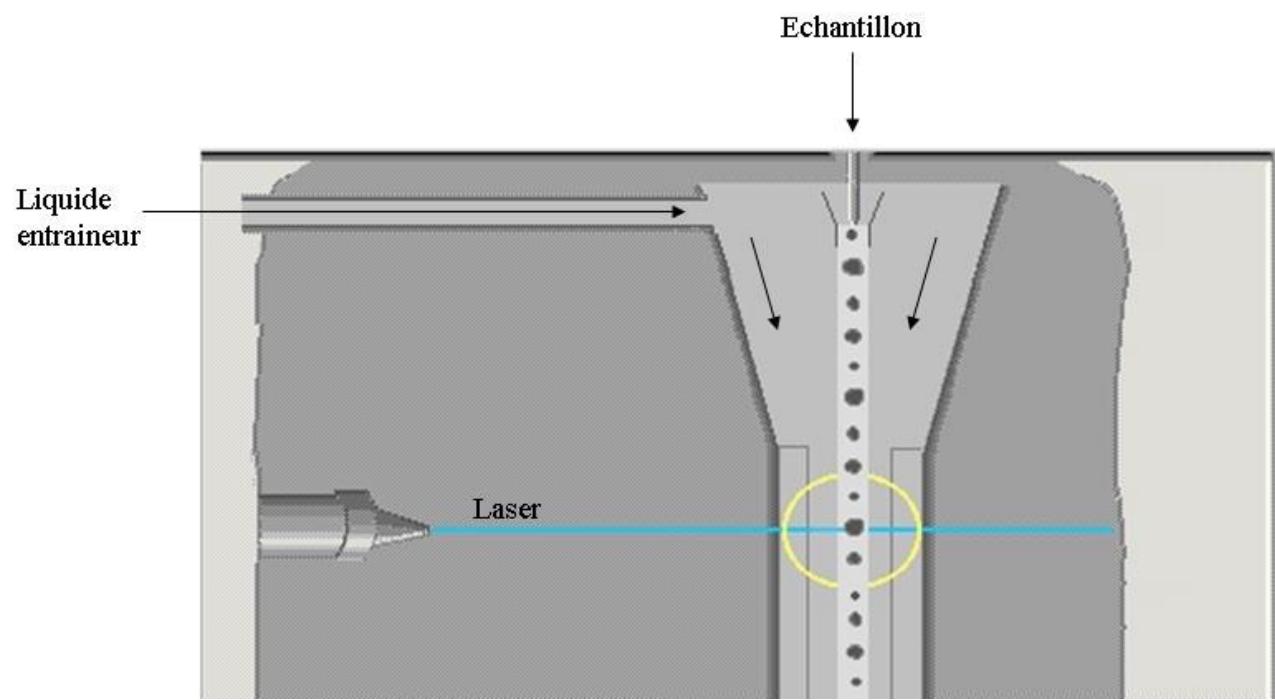
- Les cellules doivent être mises en suspension pour pouvoir être analysées. L'analyse du sang ne pose aucun problème les cellules étant déjà en suspension. Par contre les tissus cellulaires doivent être dissociés et les agrégats éliminés afin de pouvoir être analysés.

## • **LE CENTRAGE HYDRODYNAMIQUE**

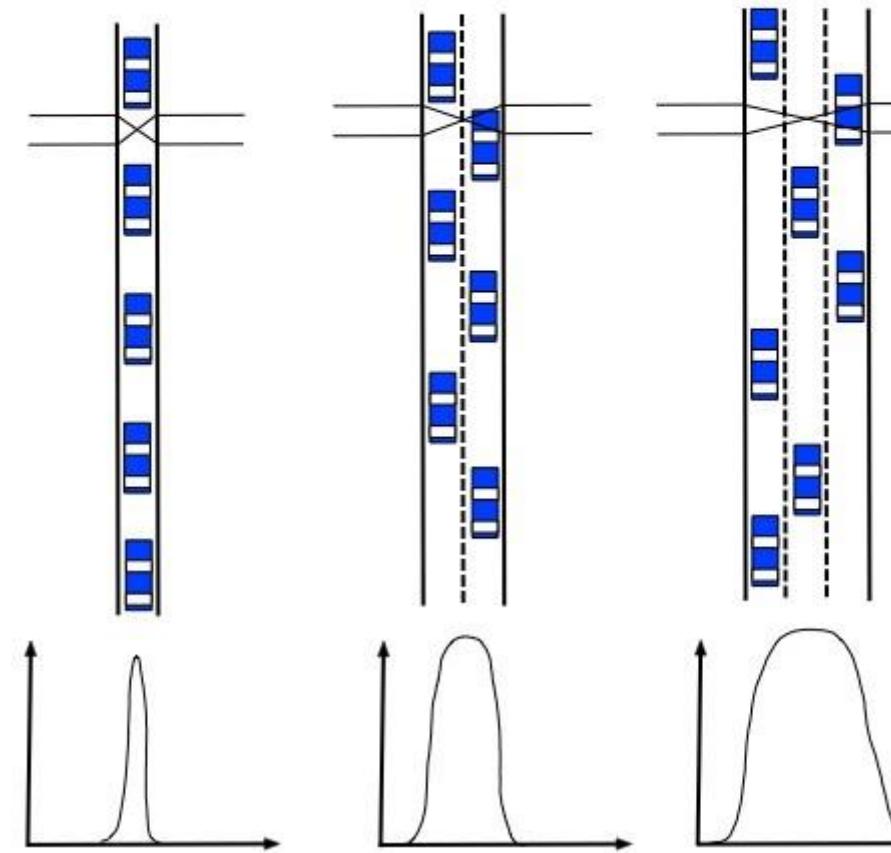
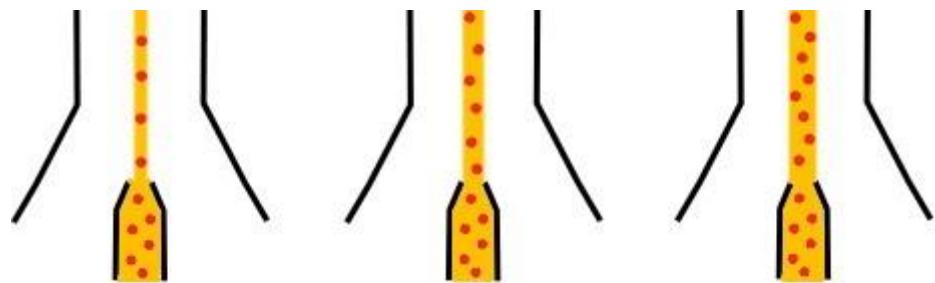
- Imaginez devoir compter, sur une autoroute avec de très nombreuses voies, les véhicules de différentes couleurs. Si la circulation est chargée et toutes les voies utilisées, il vous sera impossible d'effectuer cette tâche. Pour y parvenir, vous devez canaliser les véhicules sur une seule voie et, ainsi, il vous sera possible d'effectuer une analyse précise du nombre de véhicules de chaque couleur.



- Dans un cytomètre en flux il faut procéder de la même façon. Les cellules sont amenées au centre de la buse de mesure et alignées les unes derrière les autres (au moyen du système de centrage hydrodynamique de l'échantillon) afin d'être excitées une par une avec le faisceau lumineux. Le liquide de gaine subit une accélération progressive ce qui entraîne un étirement du liquide échantillon et ainsi aligne les cellules au centre du jet



- lorsque l'échantillon de départ est faiblement concentré, l'utilisateur d'un cytomètre a tendance à augmenter la pression sur celui-ci afin de diminuer le temps d'acquisition. Malheureusement, cela a pour effet de diminuer la précision du centrage de l'échantillon et entraîne une dispersion des mesures puisque les cellules ne passeront pas nécessairement dans la zone de focalisation de la source lumineuse. Cela est facilement visualisé en passant des billes de calibration à différentes pressions, leur pic s'élargit au fur et à mesure de l'augmentation de pression. Il est donc préférable d'augmenter la concentration de l'échantillon plutôt que d'augmenter la pression sur celui-ci. Bien évidemment. De même en augmentant trop la vitesse, on peut se retrouver dans le cas de figure où plusieurs particules passent au même moment devant la source lumineuse compromettant la fiabilité des mesures.



- La lumière diffusée

- La lumière diffusée renseigne sur la morphologie et la structure de la cellule:

Si la diffusion de la lumière est mesurée dans l'axe du rayon incident, l'intensité du signal peut être corrélée avec la taille et la viabilité cellulaire.

Sous un angle de 90°, la mesure correspond à la structure intracellulaire de la cellule (réfringence du cytoplasme, morphologie, rapport nucléo-cytoplasmique).

L'utilisation simultanée de ces deux paramètres permet de distinguer, dans un sang périphérique par exemple, les plaquettes, les lymphocytes, les monocytes et les polynucléaires

pontage moléculaire  
Interactions protéines-ADN *in vivo*

- Le pontage moléculaire sert à déterminer si une protéine donnée lie un fragment précis d'ADN. L'avantage majeur est qu'il s'effectue *in vivo*, c'est-à-dire que l'information tirée de cette expérience provient directement d'une analyse faite sur les cellules vivantes. Ainsi, après la croissance des cellules dans les conditions souhaitées, toutes les protéines qui touchent l'ADN y sont immobilisées par des liens covalents à l'endroit précis de leur interaction grâce à un traitement au formaldéhyde.

• **Classification**

**plusieurs critères**

**5 catégories**

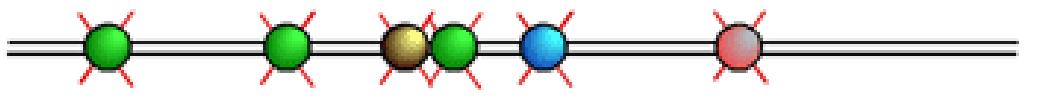


- **ChIP ou Immunoprécipitation de la chromatine**
- La technique du ChIP, en permettant l'analyse des interactions ADN-protéines à l'échelle de génomes entiers. Elle repose sur la combinaison de différentes techniques, parmi lesquelles l'immunoprécipitation, le pontage covalent, et la PCR. le ChIP permet de vérifier la présence d'une protéine donnée à un endroit donné dans le génome.
- **Principe**
- Dans un tel cas, on commence par traiter les cellules avec du formaldéhyde, qui provoque des pontages covalents entre les protéines et l'ADN. ces pontages sont solides mais peuvent être renversés par la chaleur (67°C).

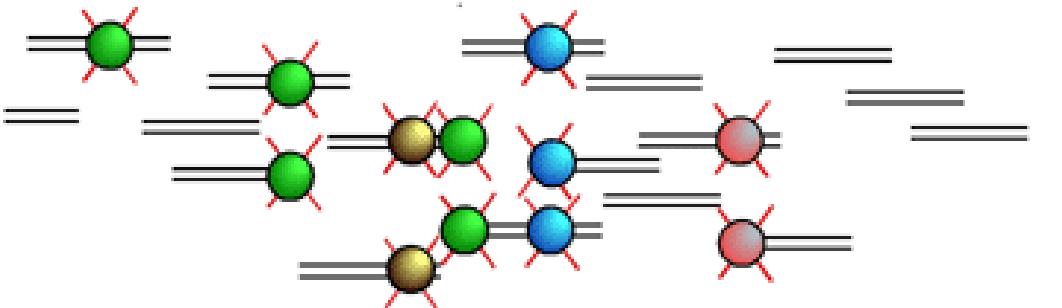
- L'ADN génomique, maintenant ponté avec une grande quantité de protéines, est ensuite brisé pour donner des fragments de petite taille (environ 500 paires de bases). La technique la plus utilisée pour cette fragmentation est la sonication.

Pour récupérer les fragments d'ADN sur lesquels se trouve pontée la protéine qui nous intéresse, on utilise un anticorps spécifique contre cette dernière. L'anticorps sera idéalement biotinylé, ce qui permettra de le retenir contre une bille magnétique couplée à la streptavidine. Le complexe bille magnétique- streptavidine- anticorps- protéine pontée- ADN est retenu au fond d'un tube par un aimant pendant que tous les autres complexes ADN-protéines sont éliminés par lavage.

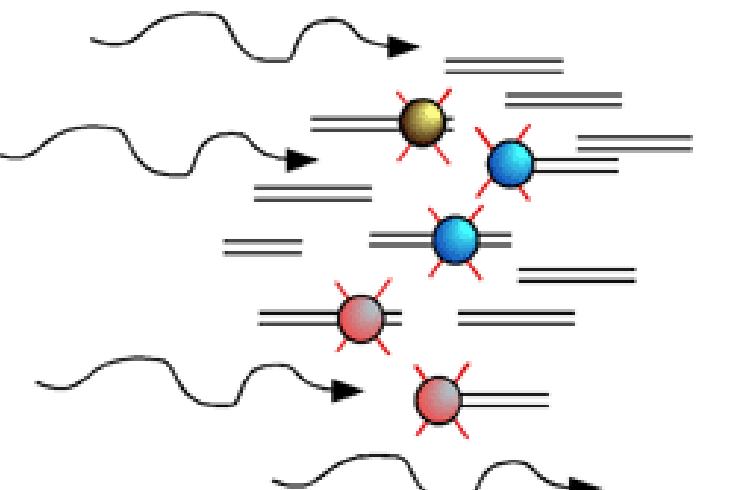
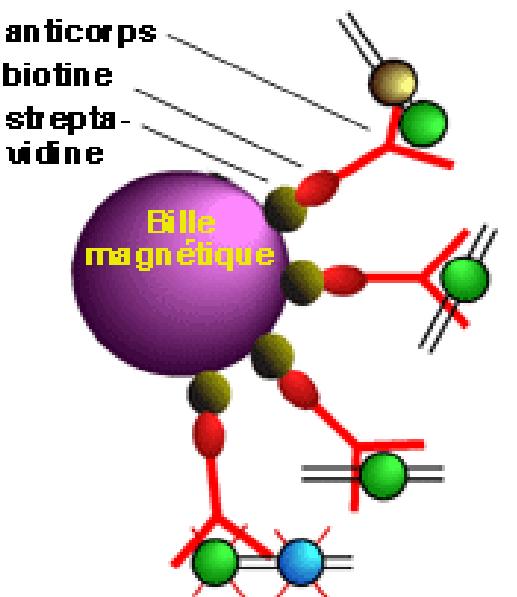
## Pontage des protéines à l'ADN à l'aide de formaldéhyde.



Fractionnement de l'ADN en petits morceaux  
(par sonication, par exemple).



Capture de la cible protéique pontée à l'ADN avec un anticorps spécifique biotinylé;  
capture du complexe anticorps-protéine-ADN avec une bille magnétique streptavidine



Lavage de ce qui n'est pas retenu  
par l'anticorps

- Après les lavages, la bille magnétique a permis de retenir tous les fragments d'ADN avec lesquels la protéine d'intérêt a une interaction assez importante pour permettre le pontage au formaldéhyde.

On commence par chauffer le complexe à 67°C pour renverser le pontage au formaldéhyde. Cela permet la libération des fragments d'ADN, qui sont récupérés et purifiés.

- **ChIP on chip ou ChIP<sup>2</sup>**

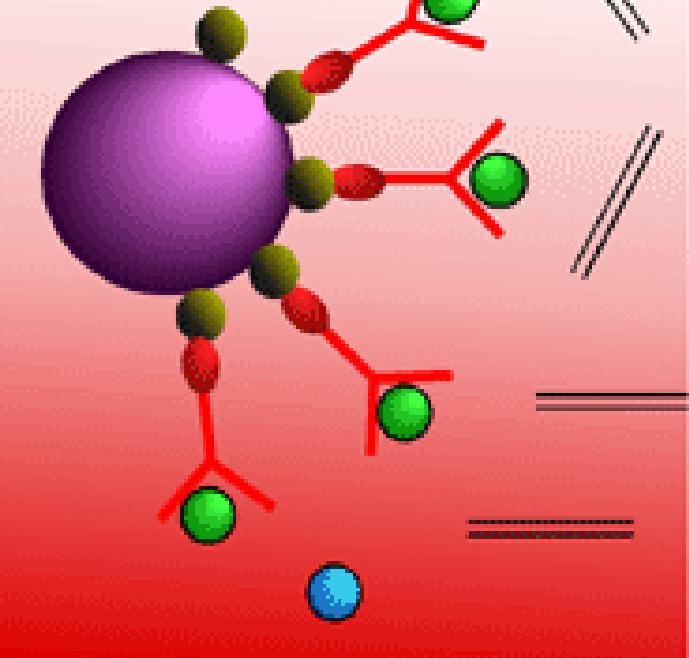
Plutôt que de se limiter à une seule région lors de la réaction de PCR, on a aussi l'option (plus coûteuse!) d'analyser la présence de notre protéine partout dans le génome.

- **Principe**

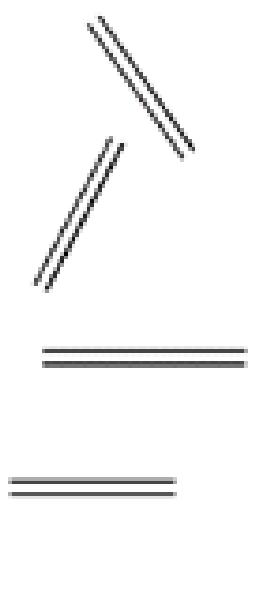
on commence par une ligation d'adaptateurs aux extrémités des fragments d'ADN purifiés lors du ChIP. On utilise ces adaptateurs pour pratiquer une réaction de PCR amplifiant tous les fragments présents. Cette amplification se fait en présence d'un nucléotide associé à une substance fluorescente, du genre Cy3 ou Cy5.

- Pour identifier et démêler tous les fragments obtenus, on les hybridise ensuite sur une micropuce d'ADN (aussi appelée "DNA chip", d'où le nom de "ChIP on chip"). Plus la micropuce contient de séquences, et plus celles-ci sont courtes, plus la résolution obtenue est élevée en termes de localisation des protéines dans le génome. (le résultat sera plus intéressant si la micropuce contient non seulement des séquences codantes, comme c'est le cas pour les puces de cDNA, mais aussi des séquences intergéniques qui contiennent des régions de contrôle. L'idéal serait une puce portant des séquences couvrant le génome entier).

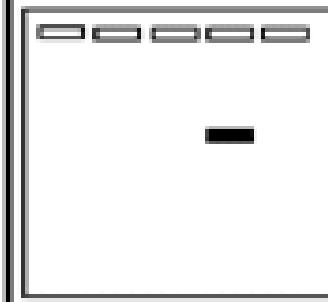
Renversement du pontage par la chaleur



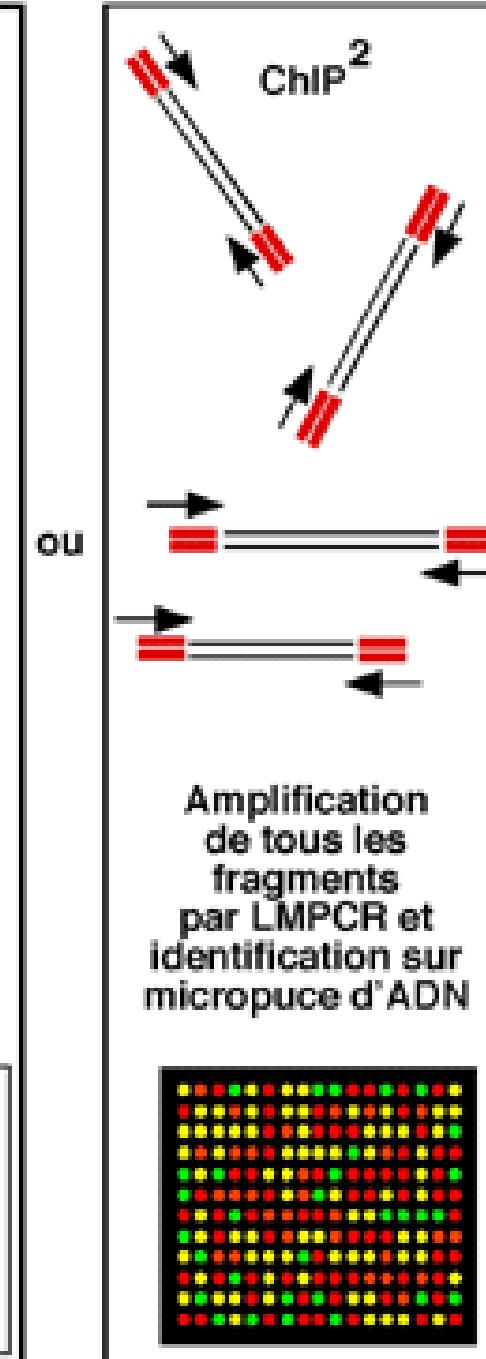
Récupération et purification de l'ADN



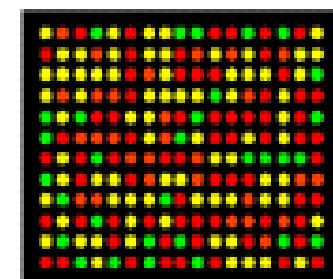
Amplification d'une région spécifique par PCR



ChIP<sup>2</sup>



Amplification de tous les fragments par LMPCR et identification sur micropuce d'ADN



# ChIPPET

- technique publiée dans Wei et al. (2006) Cell 124, 207-219.
- La technique du ChIPPET (*Chromatin immunoprecipitation Paired End diTags*) s'utilise pour les analyses à grande échelle, Elle utilise d'abord une immunoprécipitation, mais va ensuite remplacer l'étape d'hybridation sur une micropuce par une technique de séquençage, on ne va pas cloner chacun des fragments de chromatine immunoprécipités dans un vecteur pour ensuite les séquencer un par un! Ce serait bien entendu beaucoup trop long et finalement pas moins cher que d'utiliser une hybridation sur puce d'ADN.

- Le ChIPPET essaie de résoudre deux problèmes associés à l'immunoprécipitation de chromatine. Le premier est que la fragmentation de la chromatine par sonication donne des fragments de taille inégale (on vise ~500 pb, mais il s'agit là d'une valeur d'une moyenne). En outre, on immunoprecipitera toujours une certaine part de fragments par erreur; ce seront de faux positifs.

Après l'étape de ChIP, le ChIPPET demandera qu'on clone les fragments immunoprecipités dans des vecteurs entre deux sites Mme I. Cet enzyme coupe en dehors de son site de reconnaissance : TCCRAC,20,18. Le clonage de tous ces fragments donnera donc une banque de plasmides qu'on appellera une librairie de ChIP.

- On va ensuite couper notre librairie de ChIP avec l'enzyme *Mme* I avant de refermer les plasmides avec de la ligase. Cette étape enlève la majeure partie des fragments immunoprécipités et n'en laisse que deux bouts par plasmide, soit les 18 pb en 5' de l'insert et les 18 pb en 3' de l'insert. Ces deux fragments de 18 pb recollés ensemble forment une étiquette (le *diTag*) qui est caractéristique d'une position dans le génome. La librairie de vecteurs ainsi coupés et religués est appelé *librairie de PETs*.

La librairie de PETs est ensuite coupée avec un autre enzyme présent dans le site de clonage multiple, l'enzyme *BseR* I, qui lui aussi coupe en dehors de son site de reconnaissance (GAGGAG, 10,8). En raison de sa position par rapport au site *Mme* I du vecteur original, *BseR* I causera la formation d'un fragment d'environ 40 pb ayant cette allure générale :

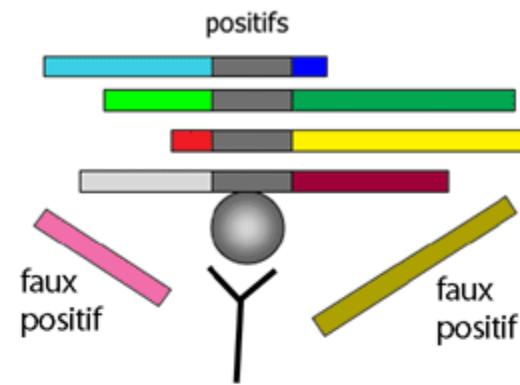
- CGAC - DiTAG de 36 paires de bases - GTC  
AGGCTG - DiTAG de 36 paires de bases - C

- chacun de ces inserts correspond à un fragment immunoprecipité, dont la position dans le génome peut être déterminée en cherchant par homologie de séquence un endroit où les deux TAGs de 18 pb seraient à environ 500pb l'un de l'autre.

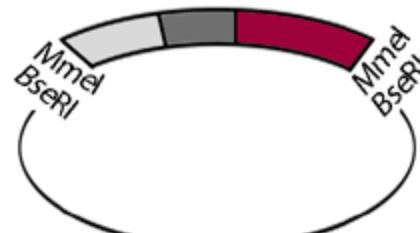
Tous ces inserts sont liés ensemble dans des vecteurs, formant une troisième librairie, la librairie de ChIPPET dont chaque composante sera séquencée séparément. Chaque réaction de séquence identifiera un grand nombre de fragments grâce à ses diTAGs.

En outre, les faux positifs générés lors de l'amplification des différentes librairies se trahiront par leurs séquences identiques; ils auront tous les mêmes bouts. Ce problème peut aussi se manifester lors du ChIP utilisant le PCR; certaines séquences s'amplifient mieux que d'autres, donnant l'impression qu'elles ont été plus souvent immunoprecipitées. Ici, les vrais positifs donneront des diTags voisins mais pas identiques, puisque la sonication ne brise pas la chromatine de manière précise.

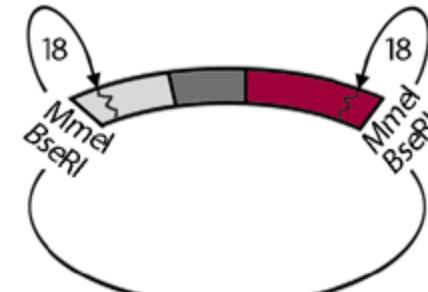
## Immunoprécipitation de chromatine



Clonage



Transformation pour faire une banque de fragments de ChIP

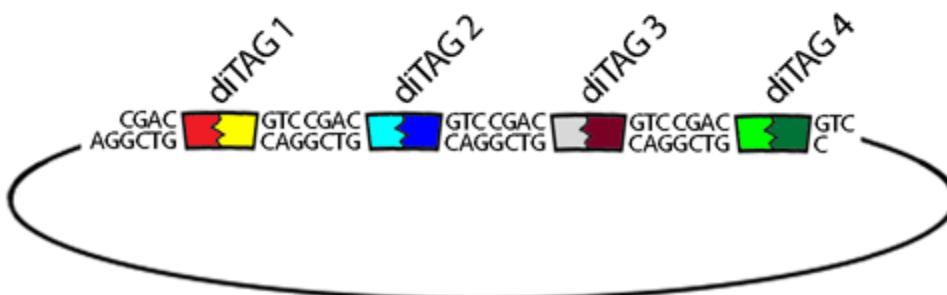


Religation

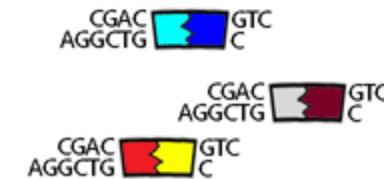


Librairie de diTAGS (ou librairie de PETs)

Coupe *BseRI*  
Récupération des PETs



Ligation



Librairie de ChIPPETs prêts à la séquence; chaque GTCCGAC signale qu'un nouveau diTAG commence.

# ChIPSeq

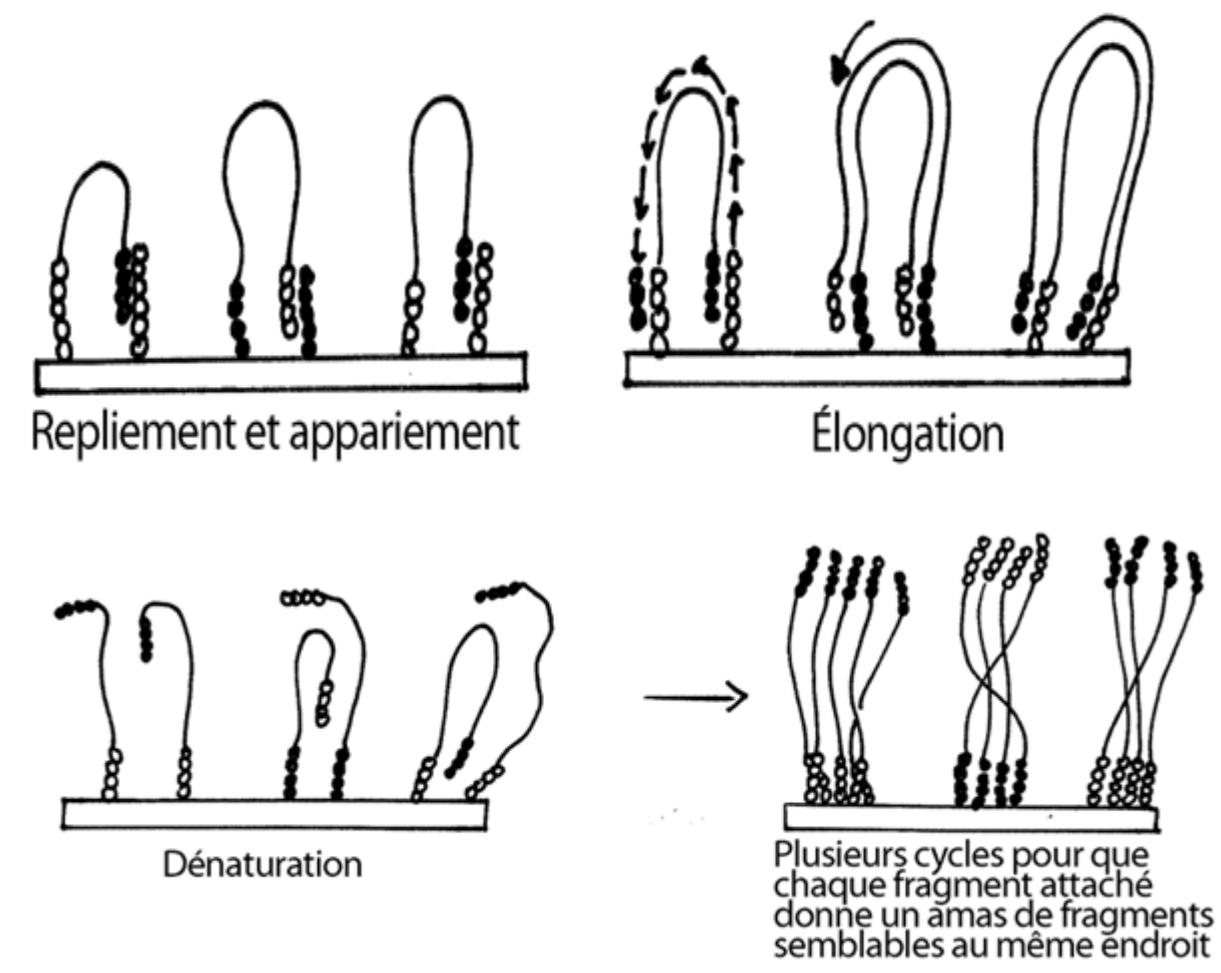
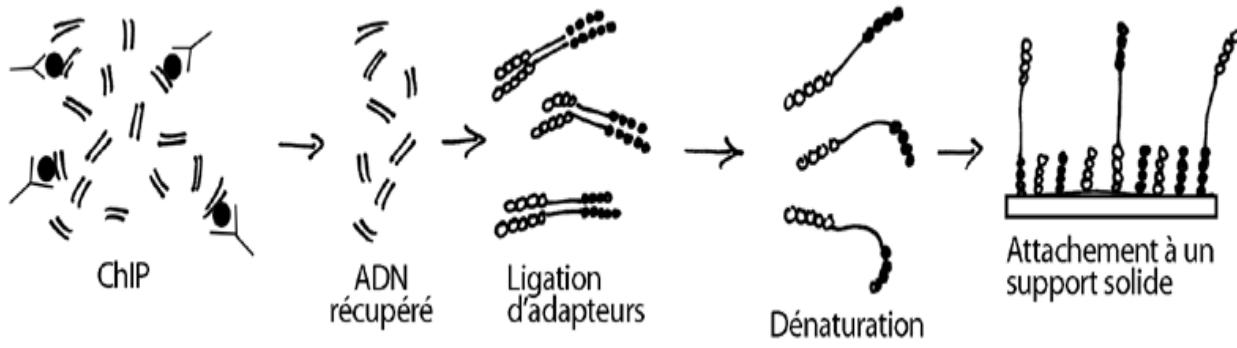
Cette technique vise à immunoprecipiter des fragments de chromatine et à en purifier l'ADN, puis à les séquencer directement sur une puce. Comment séquence-t-on de l'ADN collé sur une puce?. Supposons qu'on veuille séquencer le génome du biturong, un mammifère asiatique. À partir de cellules de l'animal, la technique demande qu'on en purifie l'ADN et qu'on le fragmente ensuite en petits morceaux en laissant des bouts francs. L'ADN passera par les étapes qui suivent :

- 1- Ligation d'adaptateurs double-brin (A et B) aux deux bouts des fragments
- 2- Dénaturation de l'ADN et attachement des fragments simple-brin sur une surface solide ressemblant à une lame de microscope (grâce aux adaptateurs, qui portent une modification à cet effet) . Les fragments s'attachent au hasard sur la surface de la plaque. Une très grande quantité d'adaptateurs simple-brin (qui sont donc des amorces potentielles) se trouve aussi attachée sur le support solide, tout autour des plus grands fragments d'ADN.

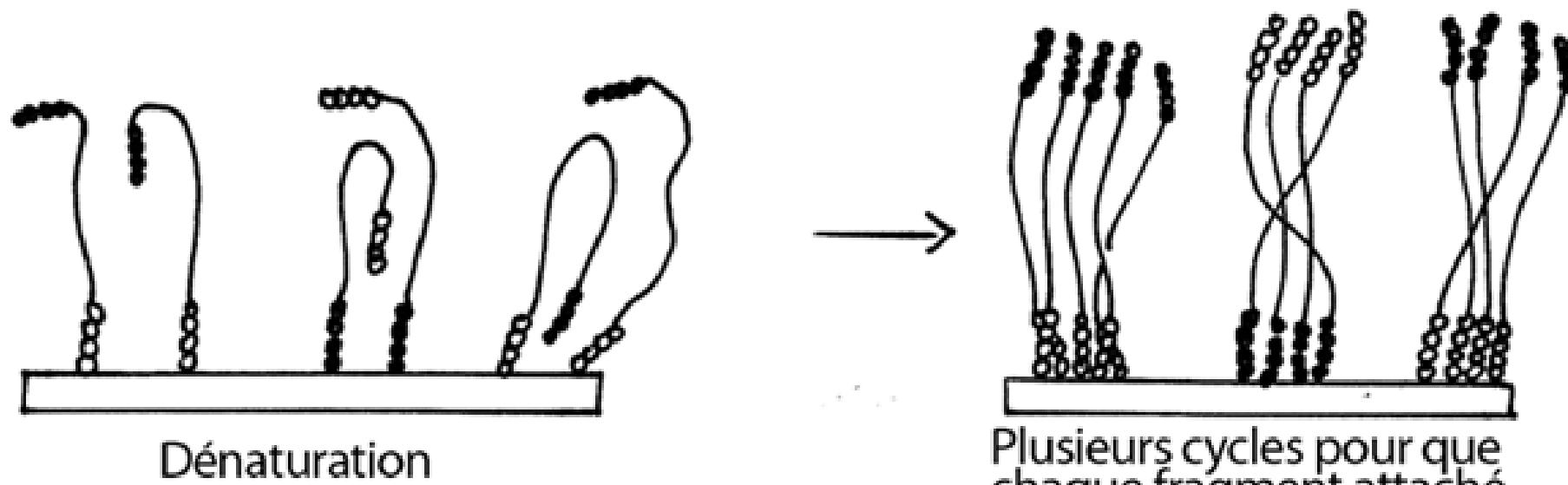
Les longs fragments se replient et leur extrémité libre (qui porte un des brins de l'un des adaptateurs) s'apparie aux courtes amorces complémentaires collées sur le support solide.

4- L'ajout de nucléotides ordinaires et d'ADN polymérase permet l'élongation des amorces qui auront réussi à s'annéliser sur les longs fragments, ce qui redonne un fragment double-brin.

Dénaturation de ces fragments double-brin; chaque brin reste attaché par son amorce fixée au support solide.

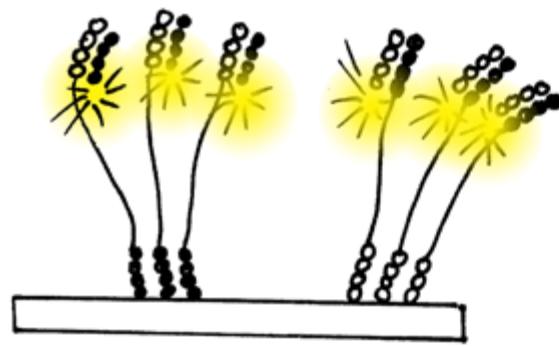


- Nouveau repliement des fragments simple-brin (maintenant deux fois plus nombreux) et nouvel appariement aux amorces qui se trouvent en grande quantité dans le voisinage. Nouvelle élongation. On répète ce cycle plusieurs fois, jusqu'à ce que chaque fragment initialement collé au support donne naissance à un amas de fragments semblables.

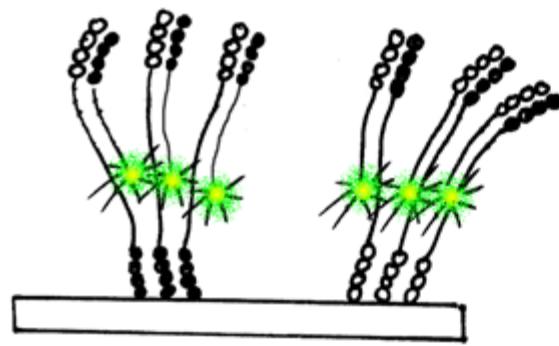


- Ajout d'un nucléotide terminateur fluorescent, d'amorces et de polymérase. Un seul nucléotide est ajouté à chaque fragment, au bout de l'amorce de séquençage. L'appareil enregistre la position de chacun des points sur le support solide. Il identifie aussi le nucléotide qui a été ajouté à la position 1 pour chaque point, en raison de sa couleur spécifique.

- Les réactifs sont lavés, le groupement qui bloque le bout 3' du premier nucléotide est coupé chimiquement, le fluorophore du premier nucléotide est coupé chimiquement, et un deuxième nucléotide est rajouté. Comme ci-dessus, l'appareil enregistre quel nucléotide s'est ajouté à quel point. On répète ainsi les cycles base par base, en enregistrant la séquence de chacun des points.

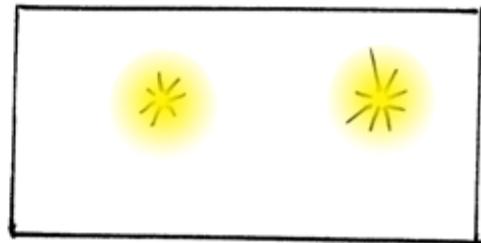


Ajout d'un nucléotide terminateur fluorescent



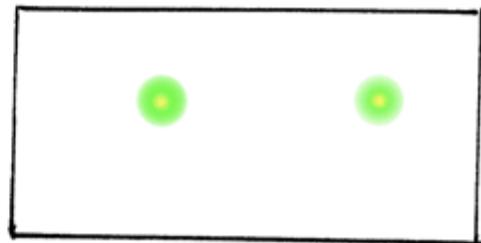
Ajout d'autres nucléotides

Support vu du haut



Localisation des points et identification du 1er nucléotide de chaque point

Support vu du haut



Enregistrement des séquences pour chaque point

- ChIC & ChEC
- Ces deux méthodes procèdent de la même idée, et augmentent la résolution des expriences de ChIP .

Le ChIC (*Chromatin ImmunoCleavage*) utilise une fusion entre la protéine A et la nucléase micrococcale (on l'appelle pA-MN). On procède à une fixation des protéines sur l'ADN comme dans un ChIP normal. On purifie ensuite les noyaux grossièrement, juste pour les rendre accessibles aux anticorps. Un premier anticorps est ajouté, visant la protéine dont nous voulons déterminer la position. Un deuxième anticorps (anti-lapin, anti-souris) est ensuite utilisé pour augmenter le recrutement de pA-MN au site occupé par le premier anticorps.

- La partie pA de pA-MN reconnaît et se fixe à la partie Fc des anticorps, ce qui amène sa partie MN dans le voisinage de l'ADN. L'ajout de  $\text{Ca}^{2+}$ , un cofacteur essentiel de la nucléase micrococcale, permet alors à cette dernière de couper l'ADN très près du site de liaison de la protéine étudiée. La résolution obtenue est de l'ordre de 100-200 pb, alors qu'un ChIP normal est plutôt du genre 500 pb.

Dans le ChEC (*Chromatin Endogenous Cleavage*), on produit directement une protéine de fusion entre la protéine d'intérêt et la nucléase micrococcale. En présence de calcium, cette protéine de fusion va couper l'ADN juste à côté de son site de liaison; la résolution en est augmentée encore plus.

# Marquage radioactif

# Marquage radioactif

- **Marquage et suivi des acides nucléiques**

Le marquage est principalement employé dans toutes les techniques qui utilisent une sonde (hybridation, Northern, .....). On distingue le marquage dit 'chaud' utilisant des isotopes radioactifs, et les marquages 'froids' qui utilisent des molécules aux propriétés fluorescentes, luminescentes. Ces dernières sont de plus en plus employées car plus pratiques.

## Marquage radio-actif

On distingue plusieurs méthodes selon la localisation du marquage (extrémités ou interne à la molécule) et selon la nature de la séquence marquée (simple ou double brin).

Le Phosphore 32 est le radioisotope le plus utilisé. Incorporé dans la sonde enzymatique au moyen d'un ou plusieurs nucléotides triP radiomarqués

- Il existe des sondes mono ou double brins Soufre 35, H 3 utilisés plutôt pour le séquençage et hybridation *in situ*. On peut aussi réaliser un marquage en 5' : avec la T4 polynucléotide kinase. La radioactivité est aussi utile pour le marquage des oligonucléotides de synthèse

- **Les sondes double brins**

### **Marquage par amorçage au hasard (Random Printing) :**

il permet d'obtenir des activités spécifiques plus élevées, nécessaires pour détecter un gène sur quelques mg d'ADN génomique.

- Dans cette technique de marquage, les deux brins d'ADN de la sonde sont préalablement séparés par chauffage suivi d'un refroidissement brutal.
- Puis, on ajoute un mélange d'oligonucléotides (hexanucléotides) de synthèse correspondant à toutes les combinaisons mathématiquement possibles (soit  $4^6 = 4096$  nucléotides).
- Ces oligonucléotides vont s'hybrider avec la sonde pour une partie d'entre eux. Ces oligonucléotides fixés vont servir d'amorces au fragment de Klenow de l'ADN polymérase I qui va reconstituer l'intégrité des deux fragments en présence de désoxynucléosides triphosphates marqués au  $^{32}P$ .
- Des ADN polymérasées par exemple dérivée du phage T7 sont actuellement les plus utilisées.

- Marquage en 3' :

- \* avec une ADN pol. : fragment de Klenow, T4 ADN pol., Taq pol., transcriptase reverse.
- \* avec une exonucléase
- \* avec une terminal transférase

L'ADN peut être marqué à son extrémité 5' à l'aide d'une kinase, par exemple, la T4 polynucléotide kinase extraite d'E. coli infecté par le bactériophage T4. En présence d'ATP avec du  $^{32}\text{P}$  en position g ou  $[^{32}\text{P}]g\text{-ATP}$ , il est possible d'échanger le groupement 5'-phosphate présent sur le fragment d'ADN avec le phosphate radio-actif en position g sur l'ATP. Cette méthode est générale. Elle est plus efficace si les extrémités 5'- sont préalablement déphosphorylées, par exemple par l'action d'une phosphatase alcaline.

- Marquage par translation de coupure (Nick Translation) :

Utilisation de 2 enzymes :

- \* DNasel dans des conditions ménagées pour générer quelques coupures simple brin dans le fragment d'intérêt

- \* DNA pol.I pour dégrader l'ADN dans sens 5'-3' au niveau de ces coupures et repolymériser en présence d'un nucléotide chaud.

l'ADN double brin traité par la Dnase I clivé au hasard. La réparation des coupures réalisées par la Dnase I nécessite l'action de l'ADN polymérase I en présence de désoxynucléosides triphosphates marqués au phosphore radioactif ( $^{32}\text{P}$ ). Les désoxynucléosides triphosphates utilisés sont marqués en position alpha au  $^{32}\text{P}$ . Cette technique est appelée "Technique de Nick Translation".

# CULTURE DE CELLULES ANIMALE

- Ce sont des cultures in vitro de cellules, de tissus et d'organe dans un milieu artificiel de composition connue.
- Ces techniques ont pour but d'étudier des phénomènes physiologiques, des mécanisme biochimiques sans avoir recours à l'expérimentation in vivo.
- **Exemples d'application :** - Etude du mécanisme d'infection par un virus tel que le HIV,
- -Etude de la différenciation cellulaires et des mécanismes des cancers,
- -Pharmacotoxicologie : test de substances pharmacologiquement active sur des cellules,
- -Biotechnologie : production de substances par les cellules, telle que l'insuline, des hormones, des vaccins...
- Ces techniques sont délicates car les cellules animales sont fragiles (pas de paroi), les contamination sont fréquentes (bactéries, champignons et surtout levure).

- **CULTURE DE CELLULES**
- On distingue 2 types de cellules dans l'organisme :
- **-les cellules circulantes ou libres**, telles que les cellules sanguines,
- **-les cellules des tissus solides**

Les premières sont récupérées facilement par centrifugation différentielle, alors que les secondes peuvent être récupérées selon 2 procédés :

- migration cellulaires à partir d'explant
- dissociation du tissu avec libération des cellules.

La culture de cellules obtenues à partir d'organe ou de tissu est appelée primoculture ou culture primaire.

- **Evolution des cellules en culture**
- - **Courbe de croissance d'une population cellulaire**
- On distingue 3 périodes : phase d'adaptation ; phase exponentielle ; phase stationnaire.
- Lorsque les cellules arrivent à confluence elles arrêtent de se diviser : inhibition de contact. Il faut alors procéder à un repiquage ou passage, c'est à dire, redistribuer les cellules dans plusieurs flacons ou bien en jeter une partie et rajouter du milieu neuf . A partir du premier repiquage on parle de lignée cellulaire.
- lorsque les cellules sont mises dans un milieu de culture, il s'opère une sélection entre les cellules viables et les cellules mortes. D'autre part, il existe une compétition entre les cellules viables. Celles qui prolifèrent le plus vite envahissent la boîte jusqu'à faire disparaître les autres types cellulaires. On observe des changements de la culture dans le temps.

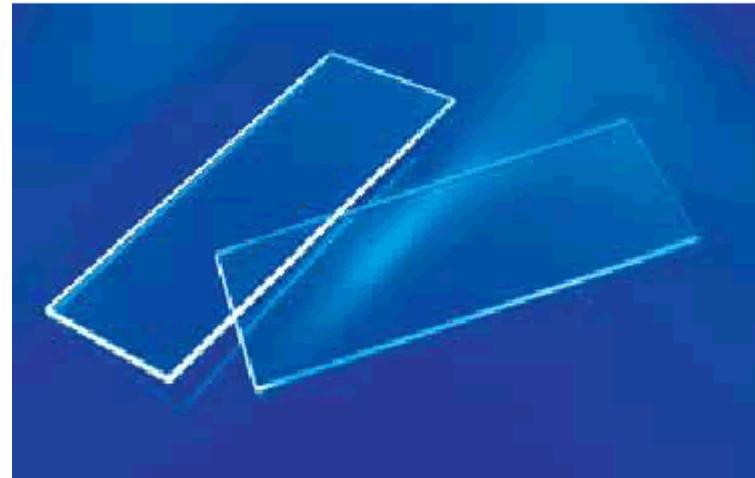
- - **Longévité d'une culture cellulaire**
- On rencontre 2 cas :
- - Cultures normales ou définies : les cellules ne se multiplient que pendant un nombre limité de générations (30 à 50 repiquages) puis meurent : leur vie et leur mort est programmée. On observe alors une diminution de leur vitesse de prolifération, phase de sénescence.
- - Culture continue ou lignées transformées ou immortelles. La vitesse de multiplication ne diminue pas, ce qui permet un nombre de repiquage indéfini. Les cellules constituant ces cultures :
  - - perdent l'inhibition de contact et se cultivent en amas ou multicouche
  - - changent de morphologie (s'arrondissent)
  - - les cellules adhérentes perdent leur besoin d'ancrage et peuvent être cultivées en suspension.

- Les milieux de culture : On distingue 2 principaux types de milieux :
- **Les milieux empiriques** composés : - **d'une base** (sels minéraux, glucose, aa, vit, tampon, indicateur de pH :rouge de phénol) -**de sérum** de 2 à 20 % du volume, sérum de veau fœtal. Il apporte des facteurs favorisant la multiplication cellulaire : facteurs de croissance, protéines d'adhésion, protéines de transport, oligo-éléments. Il contient des inhibiteurs de protéases (inactive la trypsine utilisées lors de repiquage). - **ATB** : pénicilline, streptomycine -des antifongiques.
- **Les milieux définis** : ils contiennent les mêmes constituants que les milieux empiriques mais tout est quantifié. cependant ils sont chers car tous les constituants sont hautement purifiés. La majorité des cellules survive dans un intervalle de pH compris entre 6,8 et 7,6. Toutes modifications du pH extracellulaire entraîne un blocage métabolique. Pour suivre les variations de pH du milieu, on ajoute dans le milieu un indicateur de pH le rouge de phénol. 6

- **Le matériel**

- - **Les locaux (la chambre)** La culture cellulaire nécessite des conditions de stérilité absolues, toute contamination microbienne entraîne la lyse des cellules. De plus lorsque l'on fait de la production, le produit obtenu doit être stérile. C'est pourquoi on manipule dans des sales réservées à cet effet, isolées par des sas et dans laquelle les mouvements sont réduits. On utilise de hottes à flux laminaires équipées de système de filtration d'air et permet d'obtenir une zone de manipulation stérile.

- **Le support**
- On utilise des supports pour les cellules adhérentes : boîte stériles en polystyrène : elles ne présentent pas de toxicité pour les cellules et permettent d'observer parfaitement les cellules en microscopie optique. On peut aussi utiliser des lames de verre ou des microplaques.
- Les cellules non adhérentes sont cultivées dans les mêmes conditions mais se développent en suspension.



- - **Les étuves d'incubation**
- Les cellules sont cultivées dans des étuves thermostatées (37°C pour les cellules de mammifères), avec 5% de CO<sub>2</sub> sous forme gazeuse. Ces étuves doivent être décontaminées régulièrement.



## Besoins nutritifs des cellules

<b>Eau</b>		
<b>Sels minéraux</b>	$\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Cl}^-$  $\text{Cu}$ , $\text{Zn}$ , $\text{Co}$ , $\text{Fe}$	Maintien de la PO Cofacteurs enzymatiques Rôle de facteurs d'adhésion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) Oligoélément
<b>Source d'énergie</b>	glucose glutamine	Principale source d'énergie <i>in vitro</i> elle alimente la néoglucogénèse
<b>Acides aminés</b>	Gln, Leu, Thr, Lys, Trp, Phe, Val, Met, lieu, Tyr, Cys, Arg, His	Indispensables car ils ne peuvent pas être synthétisés <i>in vitro</i>
<b>Vitamines</b>		Coenzyme Précursore des bases puriques et pyrimidiques
<b>Facteurs de croissance</b>	cf cours	Hypertrophie (augmentation de taille) Hyperplasie (augmentation de la population cellulaire) Différenciation cellulaire
<b>Facteurs d'adhésion</b>	glycoprotéines calcium dépendante ou non fibronectine (fibroblaste) chondronectine (chondrocytes) collagène (toutes les cellules)	Adhésion des cellules au support
<b>Protéines de transport</b>	Albumine Transferrine	Transport des AG Transport du fer

# Hybridation in situ

- **Principe:**

- L' hybridation in situ fait appel à deux propriétés de la molécule d'ADN, la possibilité de la dénaturer c'est à dire de séparer les deux hélices la constituant la complémentarité des bases des deux brins et leur tendance à se réassocier lorsqu'ils sont séparés.

La dénaturation permet d'obtenir des molécules monocaténaires ou simples brins qui auront tendance à se réassocier une fois remplacées dans des conditions physiologiques. Si des molécules d'ADN dénaturées sont placées dans un milieu contenant des molécules simple brin d'ADN ou d'ARN de séquence connue, celles-ci auront tendance à s'associer avec les portions des ADN dénaturés qui leur sont complémentaires.

- Cette méthode repose donc, comme les Southern et Northern blots, sur l'hybridation d'une molécule simple brin d'ADN (sonde) avec une séquence complémentaire, dénaturée, de préparation cytologique (chromosomes métaphasiques ou noyaux interphasiques).
- Le principal intérêt de l'HIS est qu'elle s'effectue sur une coupe histologique de tissu, apportant ainsi des informations précises sur la localisation des acides nucléiques étudiés (les Southern et Northern blots se faisant sur des broyats de tissus).

- **Les sondes utilisées**
- Les **sondes** utilisées sont le plus souvent de l'ADN (double brin ou plus rarement monobrin) ou un ARN-messager (riboprobes) ou des oligonucléotides synthétiques (de 20 à 50 nucléotides). Pour pouvoir être visualisées, ces sondes doivent être préalablement marquées. On distingue donc quatre types de marquages:

Marquage	Révélation
Isotopes radioactifs (tritium H <sup>3</sup> , P <sup>32</sup> ou S <sup>35</sup> ).	Autoradiographie
Produits fluorescents, on parle alors de FISH;	Microscopie à fluorescence
Haptènes: biotine dioxygénine	Avidine et streptavidine Anticorps marqués par un enzyme
Enzymes (p.e. phosphatase alcaline)	Anticorps ou chromogènes

- L'HIS est également réalisable en microscopie électronique en utilisant un marquage à l'or colloïdal avec plusieurs tailles de grains possibles (0.8 à 20 nm).
-

- Le marquage des sondes peut être réalisé par des isotopes radio-actifs ("sondes chaudes" : tritium H3, phosphore P32 ou P33, soufre S35) ou par des produits non radio-actifs (sondes dites "froides") soit fluorescents (FISH) soit non-fluorescents comme la biotine ("sondes biotynilées"), la digoxigénine ou des enzymes (phosphatase alcaline par exemple). Le mode de révélation varie en fonction de la nature du marquage, autoradiographies en cas de sondes radioactives, microscopie à fluorescence en cas de FISH, avidine ou streptavidine pour la biotine, anticorps marqués par un enzyme et/ou par l'or colloïdal pour la digoxigénine, anticorps ou chromogènes pour les enzymes. Le comptage des grains d'argent sur les autoradiographies permet une étude quantitative (ou plutôt semi-quantitative).

## Le FISH

Le FISH est une variante d'HIS mais contrairement à la plupart des autres techniques utilisées pour étudier les chromosomes, qui exigent que les cellules soient en division, le FISH peut aussi être exécuté sur les cellules interphasiques.

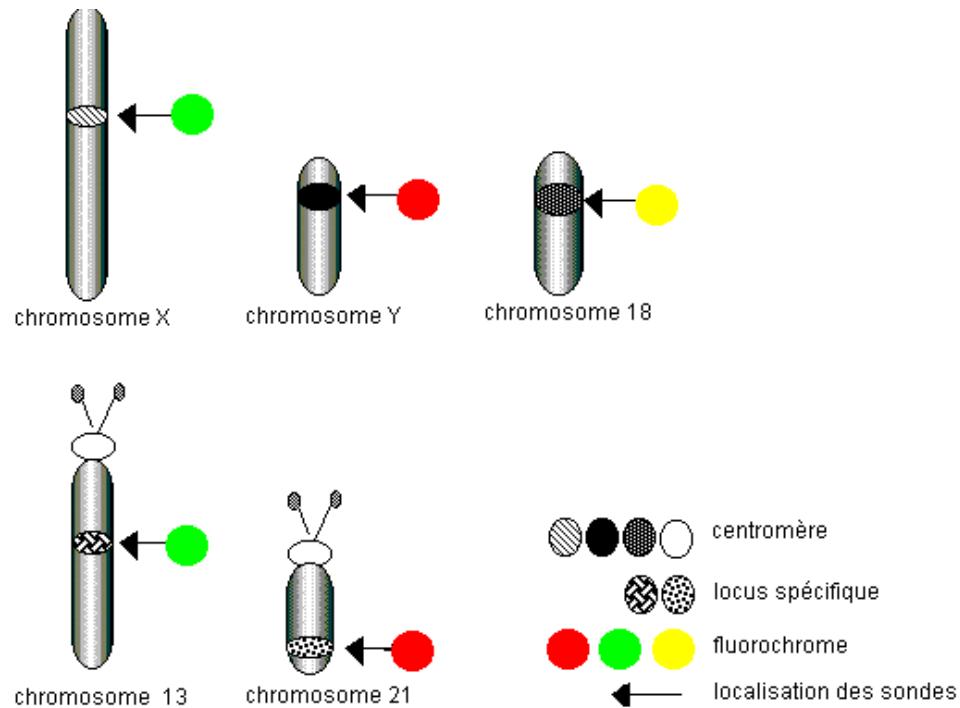
### Principe

Le FISH implique la préparation de séquences courtes d'ADN simple brin, appelées sondes , qui sont complémentaires des séquences d'ADN que les chercheurs veulent examiner. Ces sondes s'hybrident aux portions d'ADN qui leur sont complémentaires et étant marquées avec des molécules fluorescentes, elles permettent aux chercheurs de voir l'emplacement de ces séquences d'ADN.

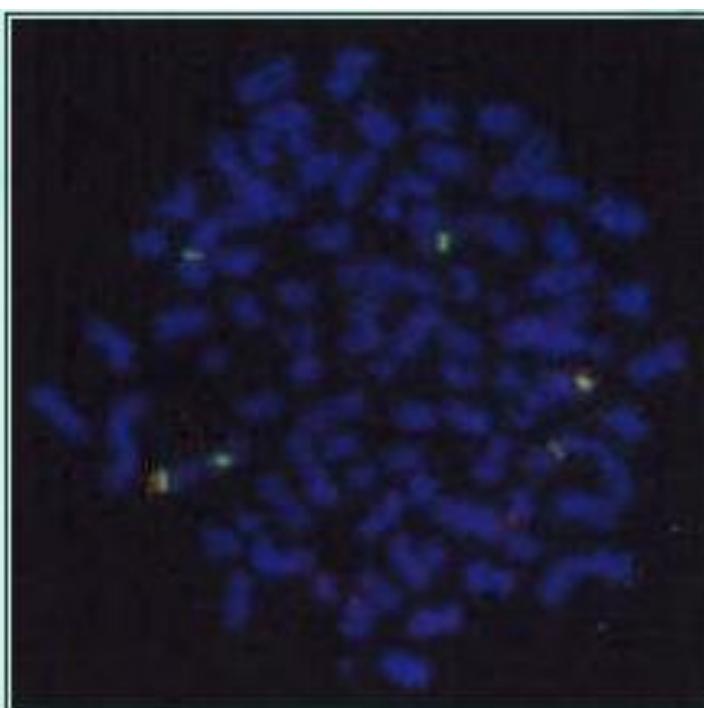
## Utilisations

Les scientifiques utilisent trois types différents de sondes de FISH, chacune ayant une application différente:

- Caryotypage: numération et identification des chromosomes homologues.
- Localisation de gène, identification de translocations et d'inversions.
- Analyse des chromosomes: identification des anomalies chromosomiques.



Ci-contre un exemple de marquage avec des sondes fluorescentes, l'ensemble des chromosomes étant marqués en bleu tandis que certaines portions de certains chromosomes sont marquées en vert ou rouge.



## **Le caryotypage spectral ou SKY**

- Le caryotypage spectral ou SKY (Spectral Karyotyping) est une technique de laboratoire qui permet aux scientifiques de visualiser les 23 paires de chromosomes humains en une fois, chaque paire de chromosomes étant peinte d'une couleur fluorescente différente.

## Principe de la technique SKY

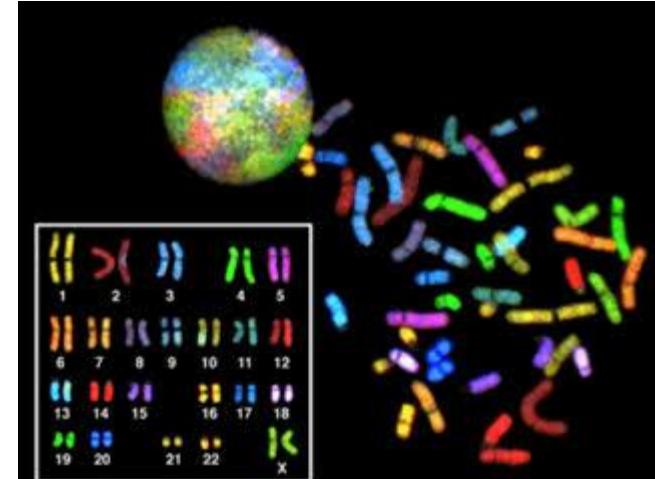
La technique SKY, basée sur les techniques d'hybridation, nécessite la préparation d'une grande collection de séquences courtes d'ADN simple brin appelées sondes.

Chacune des sondes individuelles dans cette bibliothèque d'ADN est complémentaires d'une unique région d'un chromosome, l'ensemble des sondes étant complémentaire de tous les chromosomes du génome humain.

Après hybridation, chaque chromosome sera apparié avec un grand nombre de sondes.

Chaque sonde est étiquetée avec une molécule fluorescente. Ainsi chaque chromosome sera hybridé avec un jeu de sondes qui lui donneront une couleur (fluorescence) particulière identifiée par analyse spectrale.

- **exemple,**
- les sondes qui sont complémentaires du chromosome 1 sont étiquetées avec des molécules jaunes, tandis que celles qui sont complémentaires du chromosome 2 sont étiquetées avec des molécules rouges, alors que d'autres seront hybridées avec des sondes portant des molécules fluorescentes différentes.
- A chaque chromosome correspondra un jeu de fluochromes. Les scientifiques effectuent alors une analyse spectrale des chromosomes peints à l'aide d'ordinateurs et peuvent ainsi déterminer si l'un d'entre eux présente des translocations ou d'autres anomalies structurales. Plus les sondes sont de petite taille plus la précision de l'analyse sera grande.



- Les utilisations
- Un grand nombre de maladies sont associées à des anomalies chromosomiques particulières. Par exemple, les chromosomes dans les cellules cancéreuses (tumeurs solides) présentent fréquemment des aberrations chromosomiques de type translocation.
- le caryotypage traditionnel permet aux scientifiques d'analyser le jeu complet de chromosomes humain en fonction de l'alternance des bandes sombres et claires (G-banding) et d'identifier les anomalies mettant en jeu de grandes portions de l'ADN. Il n'est cependant pas possible d'identifier des anomalies plus fines en utilisant seulement ce type de caryotypage.
- En utilisant la technique SKY, ils peuvent voir facilement les translocations fines, ce qui se traduit par un chromosome, peint dans une couleur, auquel est attaché un petit morceau d'un chromosome différent, peint dans une autre couleur.

- Les ARNi

- **Définition**
- L'interférence ARN ("*RNA interference*") ou RNAi est une voie de régulation du taux d'ARN messagers traduits ou plus précisément de l'expression post-transcriptionnelle des gènes.

- **Le mécanisme de l'interférence ARN :**
- a été sélectionné pour prémunir les cellules contre l'introduction de gènes (en particulier de virus ou de transposons). Il permet également de nettoyer la cellule d'ARN messagers (ARNm) non fonctionnels.
- s'est avéré très utile pour décrypter la fonction de gènes chez le nématode puis chez d'autres organismes, notamment les mammifères

Deux types de petits ARN jouent un rôle central dans le mécanisme de l'interférence ARN:

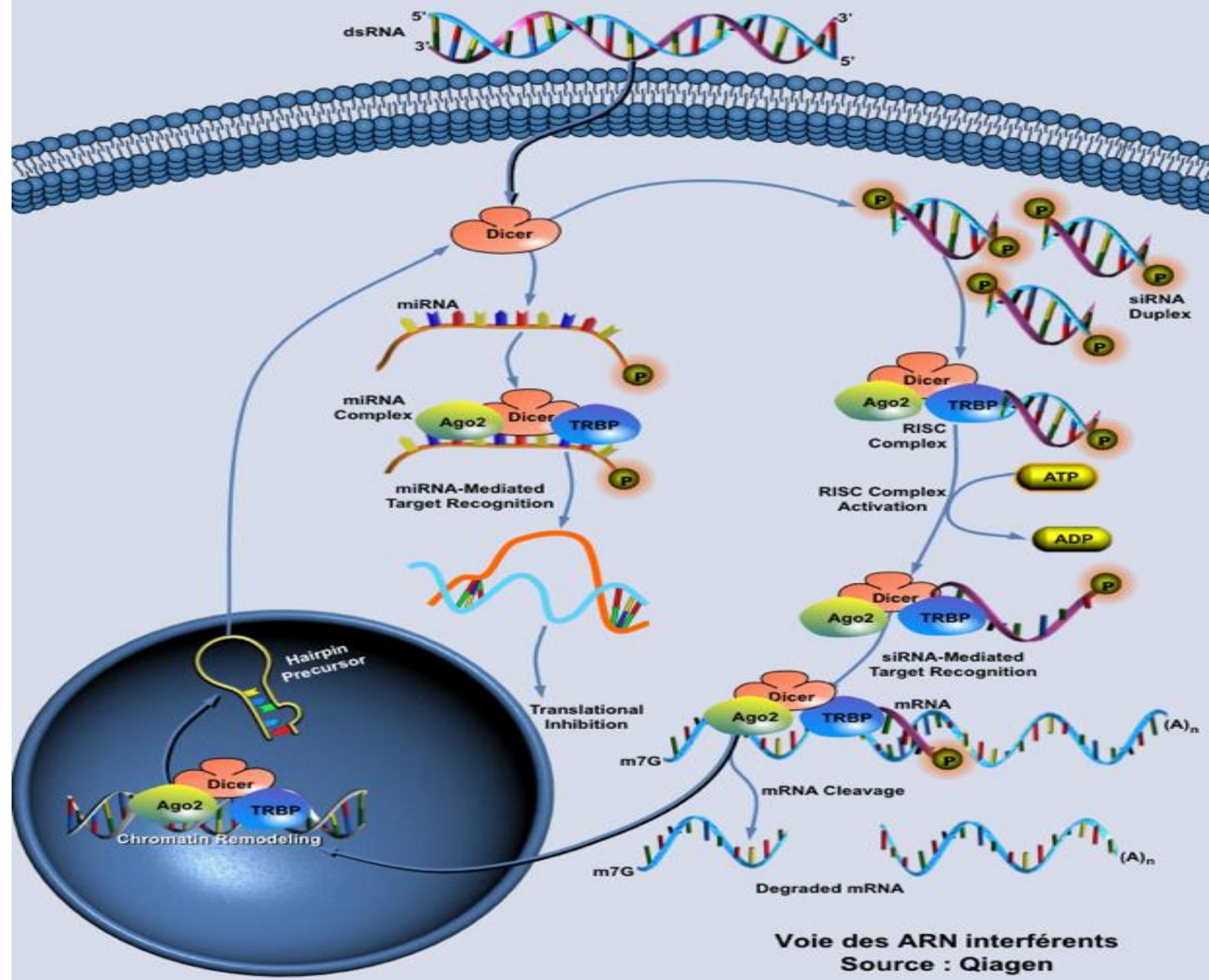
- **1) Les siRNA ("small interfering RNA") ou petits ARN interférents :**
- ils sont soit d'origine externe à la cellule cible (ARN double brin exogène de [virus](#)), soit propres à la cellule (ARN double brin endogène).
- ils sont impliqués, entre autre, dans le contrôle de la mobilité des transposons.
- ils ont une complémentarité parfaite avec la séquence de l'ARNm cible :
- ils induisent une inhibition (répression) de la transcription par [modification de la chromatine](#) ou ils induisent le clivage de l'ARNm cible.

- D'autres types de petits ARN interférant jouent des rôles importants dans la régulation de l'expression des gènes. On peut citer :
- les pi-RNA ("*PIWI-associated RNA*"),
- les nat-siRNA ("*Natural antisense short interfering RNA*"). Ils sont générés à partir d'ARN messagers complémentaires puis transformés en siRNA.
- d'autres petits ARN, dont certains ont des structures plus complexes ou sont issus de la conception assistée par ordinateur ("*design*") :
  - si-siRNA ("*small internally segmented siRNA*")
  - dg-siRNA ("*double-guide siRNA*")
  - ta-siRNA ("*trans-acting siRNA*")
  - hc-siRNA ("*heterochromatic siRNA*")
  - ra-siRNA ("*repeat-associated siRNA*")
  - e-siRNA ("*enzymatically prepared siRNA*")
  - a-iRNA ("*asymmetric interfering RNA*")
  - [a-miRNA](#) ("*artificial miRNA*") et [ss-siRNA](#) ("*single-stranded short interfering RNA*") : voies prometteuses pour des applications cliniques de l'interférence ARN

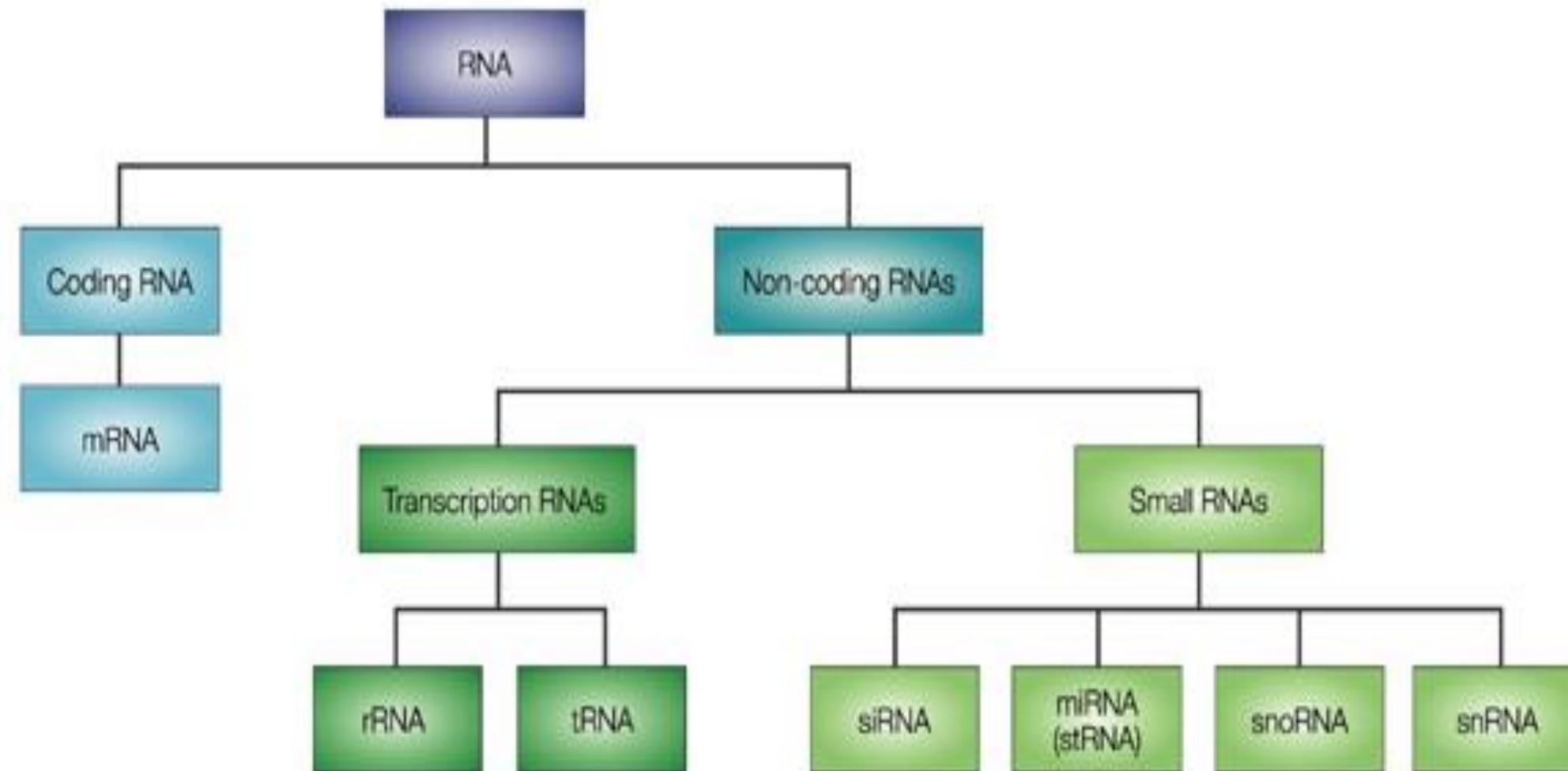
- **2) Les miRNA ("micro RNA") ou micro ARN :**
- ils sont codés par le propre génome de la cellule (ARN non-codant endogène).
- ils sont impliqués dans la régulation de la transcription des gènes au niveau post-transcriptionnel. Chez l'homme, on estime que au moins 30% des gènes sont régulés par des miRNA.
- si ils ont une complémentarité parfaite avec la séquence de l'ARNm cible : ils induisent une inhibition (répression) de la transcription ou ils induisent le clivage de l'ARN messager cible.
- si ils ont une complémentarité imparfaite avec la séquence de l'ARNm cible : ils induisent une inhibition (répression) de la traduction de l'ARNm cible.

- Schéma ci-centre : ensemble des mécanismes qui aboutissent à l'interférence entre un ARN simple brin dit interférant (ARNi) avec un ARN messager (ARNm) spécifique.

- On aboutit à 2 cas de figure :
- soit la traduction de l'ARNm cible est inhibée
- soit l'ARNm est dégradé
- Dans les 2 cas, le taux de protéine synthétisée est diminué.
- 

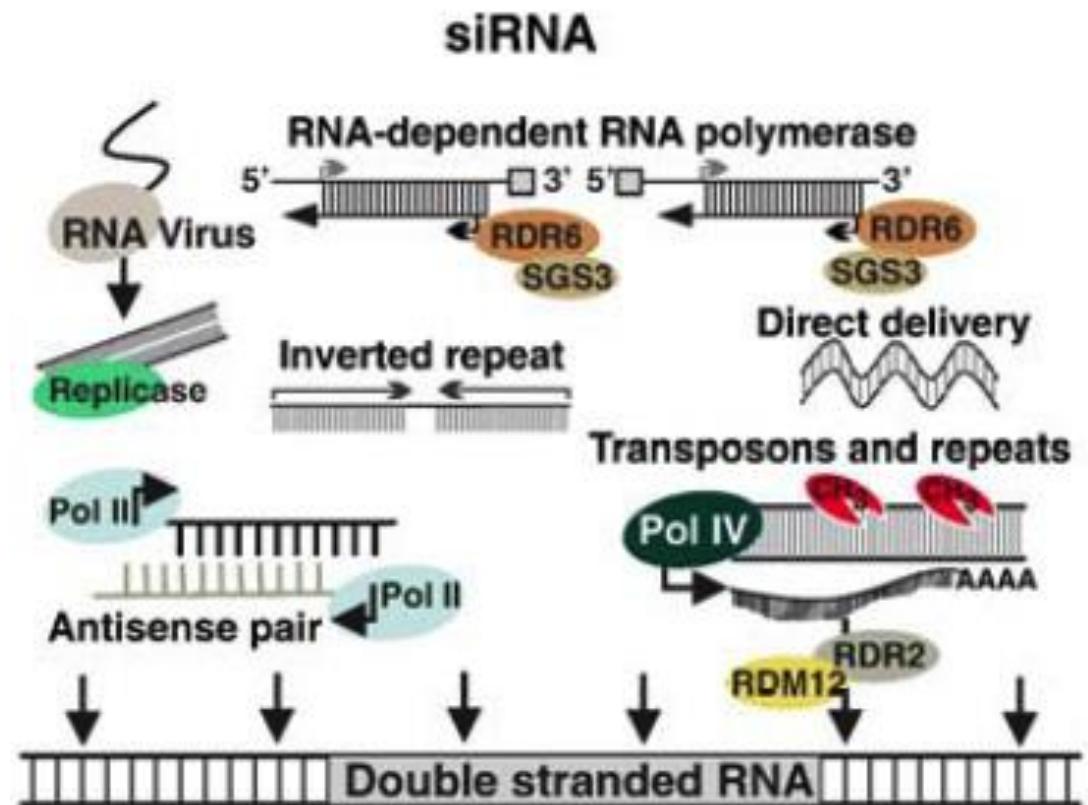


- Les ARN et les petits ARN ("small RNAs" : snRNA, snoRNA, siRNA, miRNA, piRNA, ...) de 20 à 30 nucléotides. Ils participent à divers mécanismes génétiques, physiologiques et métaboliques.

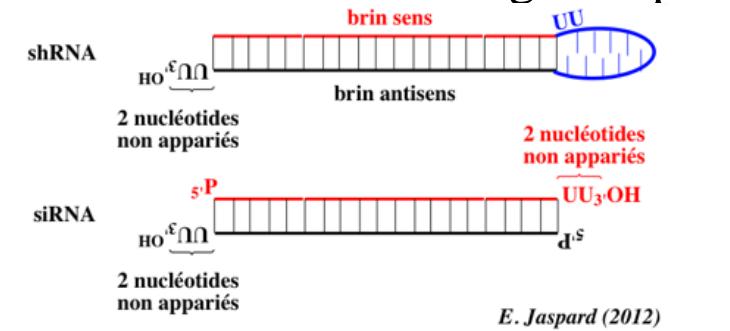


- [sRNAdb](#) : small non-coding regulatory RNAs database for gram-positive bacteria
- [BSRD](#) : Bacterial Small Regulatory RNA Database
- [PsRobot](#) : A web-based plant small RNA meta-analysis toolbox

- Les siRNA ("small interfering RNA")
- Précurseurs des siRNA
- a. Les long dsRNA ("long double-stranded RNA") : longs ARN double brin parfaitement complémentaires de plus de 200 nucléotides.
- Ils peuvent avoir pour origine des séquences répétées - inversées, être issus de la transcription de transgènes ou de transposons.
- A l'inverse, ils peuvent être synthétisés par des RNA polymérases RNA-dépendantes qui copient les ARN simple brin.

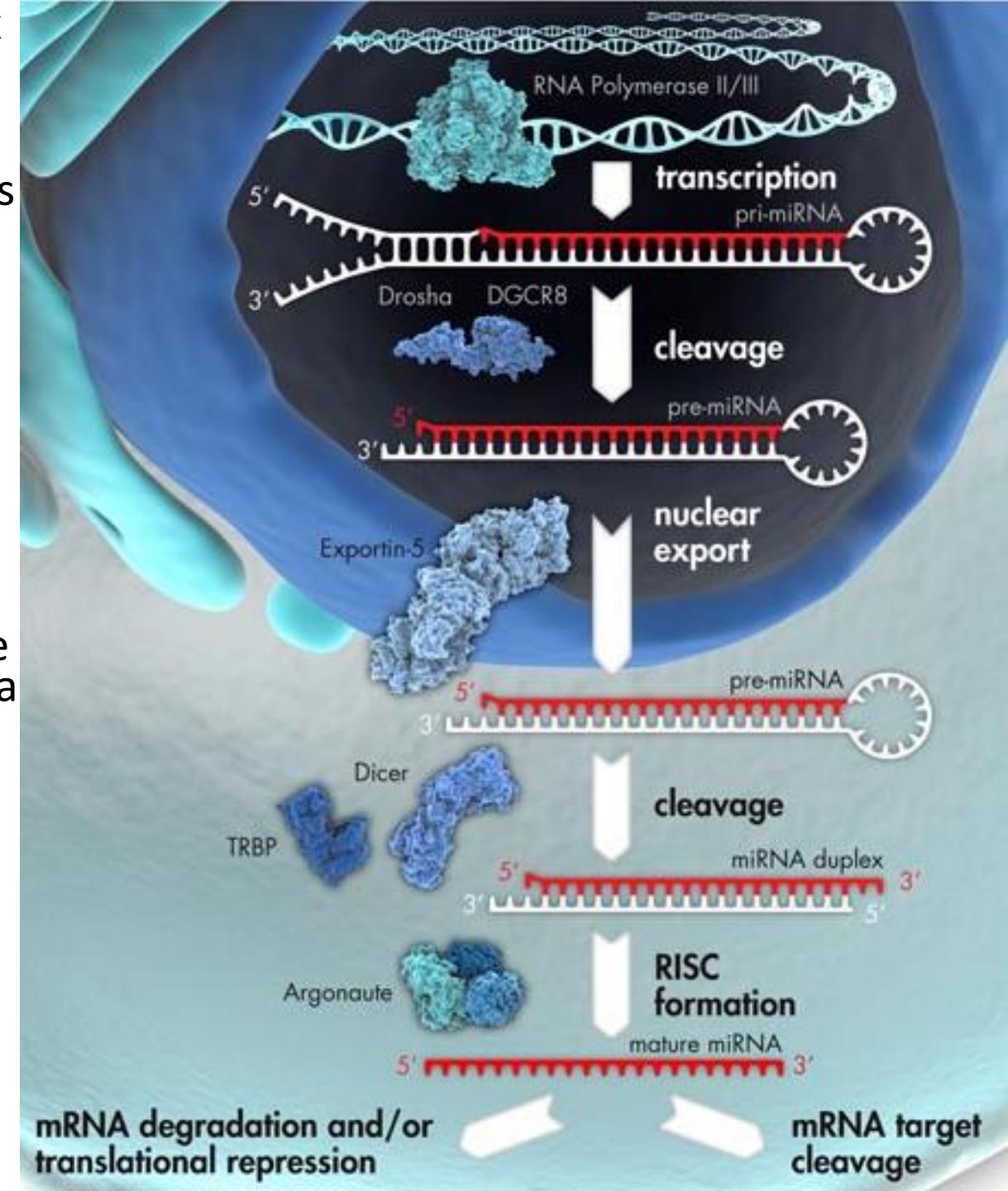


- **b- Les shRNA** ("short hairpin RNA") sont exprimés dans la cellule après transfection par des vecteurs viraux. Ces précurseurs sont clivés tous les 21 à 25 nucléotides par une ribonucléase de type III appelée DICER ("éminceuse").
- Les courts fragments dsRNA obtenus sont appelés petits ARN interférents ("small interfering RNA" - siRNA).
- La ribonucléase DICER transfère les siRNA à un complexe multienzymatique : "RNA-Induced Silencing Complex" - RISC.
- le brin sens du siRNA appelé passager est clivé en 9 + 12 nucléotides
- le brin antisens appelé guide dirige le complexe RISC vers les ARNm possédant une séquence complémentaire du brin guide.
- si le siRNA et l'ARNm cible sont parfaitement complémentaires, le complexe RISC hydrolyse l'ARNm qui n'est plus traduit en protéine.
- si la complémentarité est partielle, l'ARNm n'est pas hydrolysé mais il y a inhibition de la traduction.

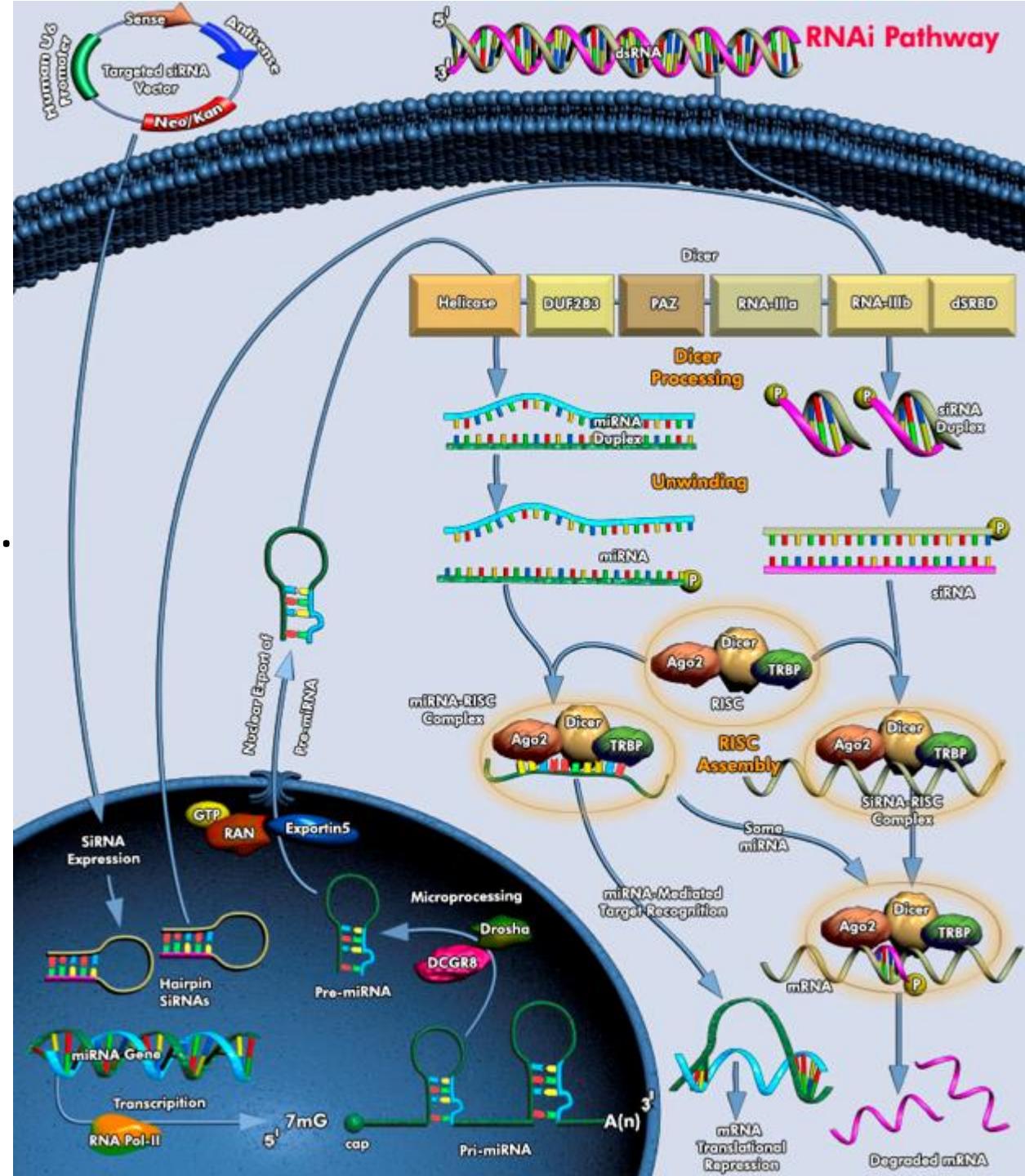


- **Les miRNA (micro-RNA)**
- Les miRNA sont d'origine endogène : ils sont synthétisés dans le noyau sous forme de pri-miRNA ("primary-miRNA") à partir des gènes (poly-cistrons) miRNA transcrits par l'ARN polymérase II ou III.
- Les pri-miRNA ont une longueur de 500 à 3000 nucléotides.
- Ils ont une coiffe en 5' comme l'indique l'existence d'un site de fixation à eIF4E. Le facteur eIF2C2 ("Eukaryotic Translation Initiation Factor-2C2") participe aussi à ce processus.

- Les pri-miRNA ont une structure en épingle à cheveux ("hairpin").
- Les extrémités 3' et 5' des pri-miRNA sont alors clivées par un complexe enzymatique formé par Drosha (ribonucléase de type III) et DGCR8 ("DiGeorge syndrome critical region 8").
- Les fragments formés (environ 60 à 70 nucléotides - structure en épingle à cheveux) sont appelés pre-miRNA.
- Les pre-miRNA sont alors exportés dans le cytoplasme via les exportines 5 (chez les animaux) complexées à la guanine triphosphatase (GTPase) Ran.
- La structure de la machinerie d'export [pré-miRNA / exportine 5 / RanGTP] a été obtenue en 2009.
- Dans le cytoplasme, les pre-miRNA sont clivés par le complexe DICER/TRBP et la boucle de l'épingle est enlevée.



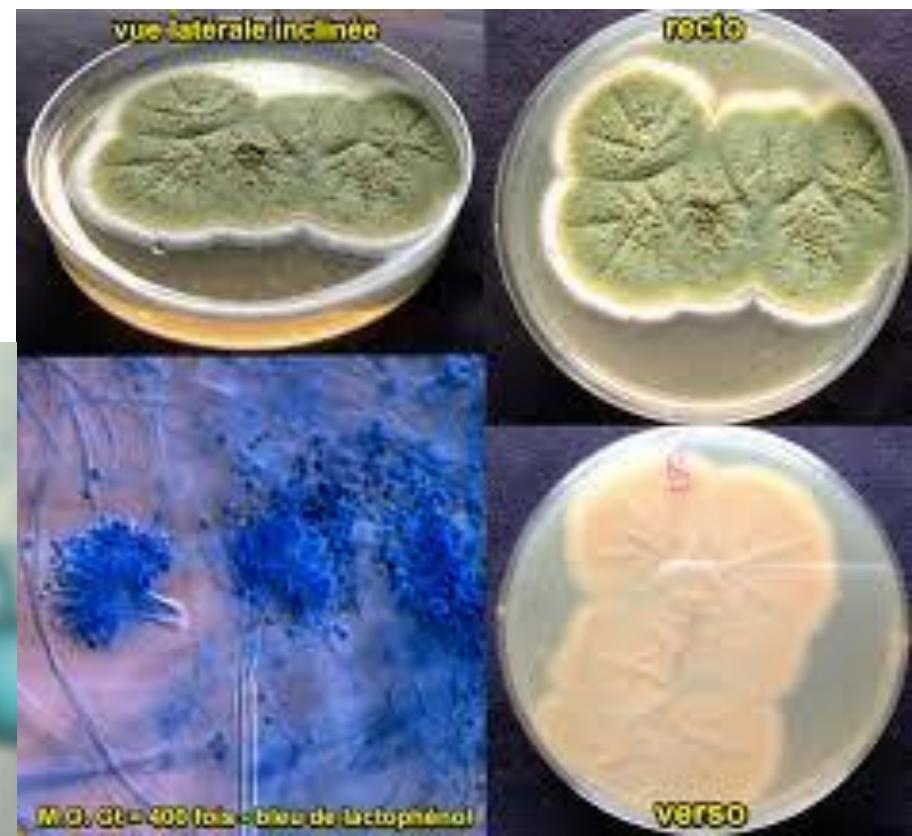
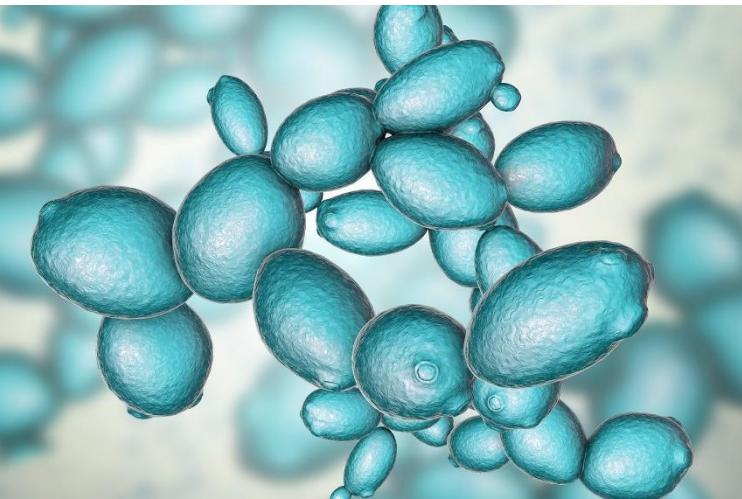
- Des protéines de type hélicase associées à DICER dissocient le dsRNA en deux ARN simple brin.
- On aboutit aux miRNA (21 à 24 nucléotides) qui ont une séquence partiellement complémentaire de la région 3' UTR ("UnTranslated Region") de l'ARNm cible.
- Les miRNA ont 2 bases non appariées à l'extrémité 3'.
- Le brin fonctionnel ou brin guide des miRNA est chargé sur le complexe RISC auquel s'associe la protéine Argonaute.



- Les miRNA ont été identifiés dans tous les règnes (mammifères, drosophile, *C. elegans*, plantes ...).
- plus de 1000 gènes codant des miRNA ont été identifiés chez l'homme ([bioinformatique](#), approche génétique, [séquençage en masse des petits ARN](#) dans la cellule).
- 60% des gènes codant des protéines contiendraient des séquences cibles de miRNA à l'extrémité 3'UTR.

- technique de culture des levures

- **Mycètes : Les levures**
- **Caractères morphologiques**
- – Mycètes unicellulaires haploïdes ou diploïdes,
- – De forme sphérique, ovoïde, (parfois cylindrique, triangulaire ...)
- – Taille très variable : 2-3µm à 20-50µm de long, 1-10µm de large



- Les levures, cellules diploïdes, forment des spores, cellules haploïdes, par méiose. À partir d'une cellule diploïde, on obtient 4 spores (ou ascospores) contenues dans un sac ou asque. Après éclatement de l'asque, les ascospores peuvent se multiplier pour donner d'autres cellules haploïdes. Elles peuvent également se transformer en gamètes de forme caractéristique, sous l'effet de phéromones sexuelles. La fécondation entre 2 cellules de signes sexuels opposés donne un zygote, à l'origine de la phase diploïde.

- **La chlamydosporulation**
- Certaines espèces, telles que *Candida albicans*, sont caractérisées par la formation de spores particulières: les chlamydospores. Ce sont des spores rondes ou ovales à double contour, très réfringentes et grosses (6 à 12 $\mu$ m). Elles sont produites sur des milieux riches en polyosides, contenant des substances défavorables à, la multiplication végétative et en semi anaérobiose. Le milieu utilisé pour la synthèse des chlamydospores est le Milieu PCB: Pomme de terre, Carotte, Bile

- **Caractères culturaux**
- **Conditions de culture**
- – Température optimale de croissance : 20 à 28°C.
- – pH optimal: 4,5 à 6,5
- – Obtention de colonies: 24 à 48 heures

#### *Milieux d'isolement*

Milieux non sélectifs	Milieux sélectifs
Gélose Sabouraud	- Ajout d'antibiotiques (= anti-bactériens): chloramphénicol, pénicilline, streptomycine
Milieu PDA (Pomme de terre – Dextrose - Agar)	- Ajout d'antifongiques (= anti-champignons): actidione (C. albicans est résistant)
Milieu au malt	
Milieu au moût de raisin	

- **Technique d'isolement**
- = **Stries en surface par la méthode des cadrans.**
- **Démarche d'identification des levures** Le soucis d'identification des levures correspond à une préoccupation médicale, où elles sont responsables de mycoses superficielles ou profondes. La plupart des infections humaines provoquées par des levures sont dues aux espèces du genre *Candida*, champignons pathogènes opportunistes.
- *Candida albicans* est l'espèce la plus pathogène pour l'Homme et elle est responsable d'atteintes cutanées, de lésions muqueuses et de septicémies. La démarche d'identification repose donc d'abord sur la recherche de 3 caractéristiques de l'espèce *Candida albicans*: les blastospores et les chlamydospores, ainsi que les tubes germinatifs. Mais on peut également rencontrer des *Cryptococcus* (levure capsulée responsable d'infections pulmonaires), des *Geotrichum* (présente des formes filamenteuses à arthrospores).

- **Examen macroscopique**
- → Colonies de 2 mm de Ø souvent blanches, crèmeuses, lisses et brillantes, parfois d'aspect filamentueux
- . **Examen microscopique** (Coloration de Gram ou au bleu de méthylène + coloration à l'encre de Chine) → Cellules ovoïdes de 10-12 $\mu$ m de long; formes filamentueuses ou non, présence ou non d'une capsule.



- Recherche des blastospores et des chlamydospores, caractéristiques de *Candida* et de *Candida albicans*.
- Test de blastèse (ou test de germination): mise en évidence des tubes germinatifs caractéristiques de *Candida albicans*.
- Si ces premières observations conduisent à une orientation autre que *Candida albicans*, il faut poursuivre l'identification.
- Auxanogramme du carbone: Recherche de l'utilisation d'un glucide, en aérobiose, comme seule source de carbone.
- Zymogramme du carbone: Recherche de la fermentation d'un glucide, en anaérobiose.
- Réduction du tétrazolium
- Résistance à l'actidione



- **La microscopie électronique**

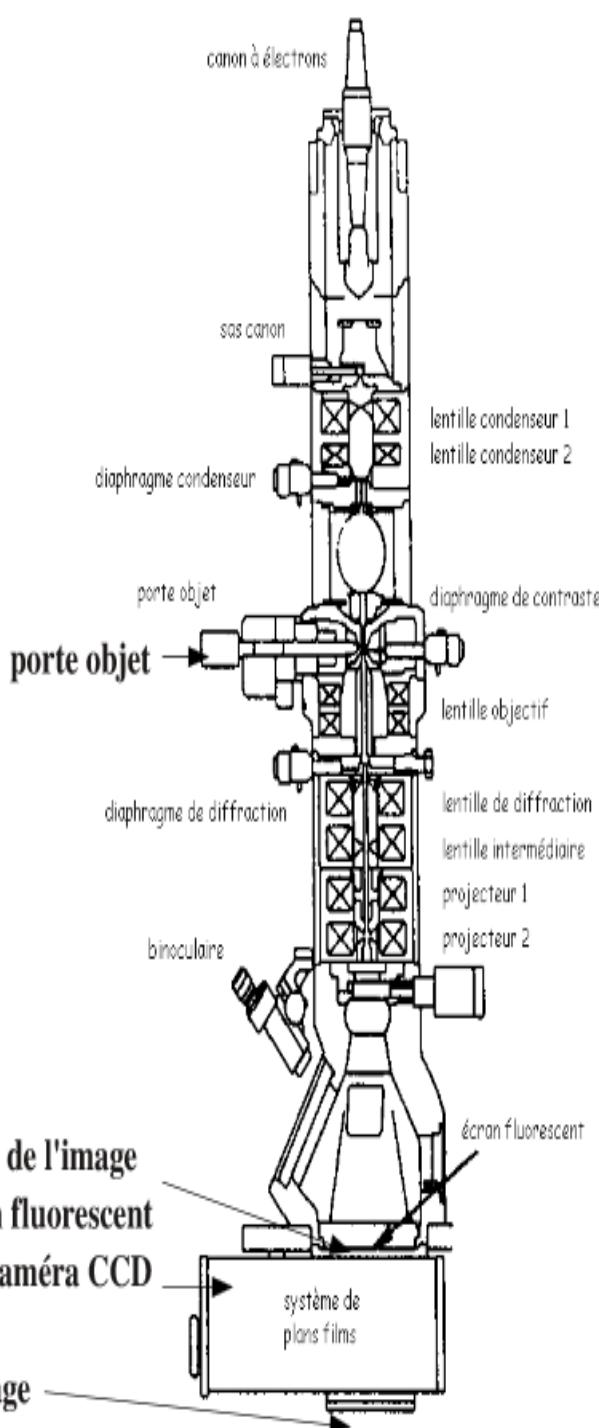
- La microscopie électronique est une technique de microscopie où un faisceau d'électrons est « transmis » à travers un échantillon très mince. Les effets d'interaction entre les électrons et l'échantillon donnent naissance à une image, dont la résolution peut atteindre 0,8 Angströms. Les images obtenues ne sont généralement pas explicites, et doivent être interprétées à l'aide d'un support théorique. L'intérêt principal de ce microscope est de pouvoir combiner cette grande résolution avec les informations de l'espace de Fourier, c'est-à-dire la diffraction. Il est aussi possible d'étudier la composition chimique de l'échantillon en étudiant le rayonnement X provoqué par le faisceau électronique.

## • Microscopie électronique

- Cette technique, par l'utilisation de coupes tissulaires très fines (moins de 100 nm) et de grandssements très importants, permet une étude à l'échelon cellulaire (analyse des constituants d'une cellule, des jonctions intercellulaires, d'éventuels dépôts, inclusion etc.), des fixateurs spéciaux doivent être utilisés (glutaraldéhyde, puis acide osmique le plus souvent) avant l'inclusion dans une résine. Des techniques d'immunohistochimie peuvent être adaptées au microscope électronique

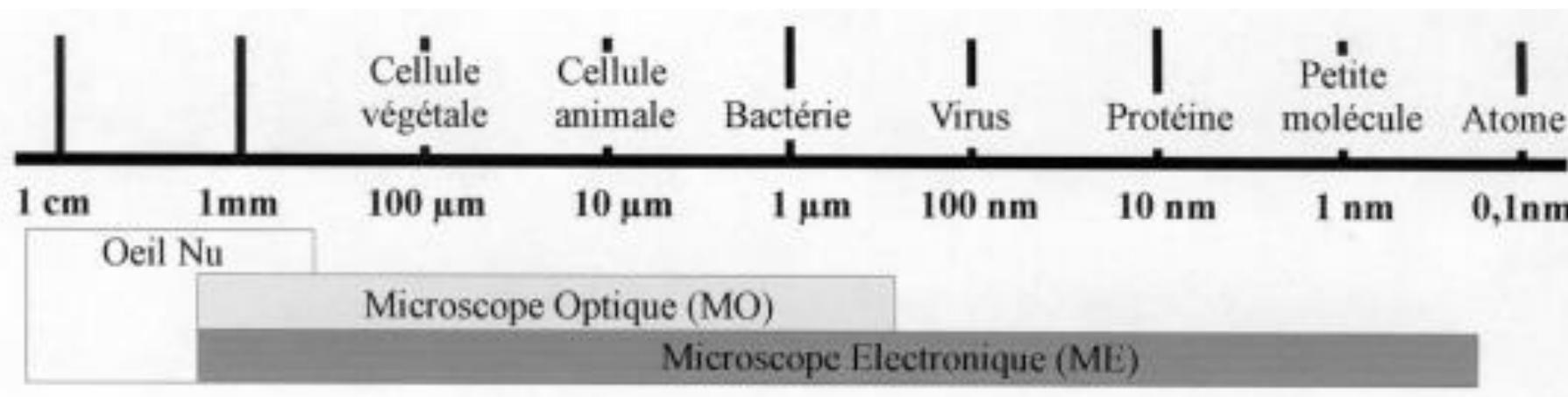


Malgré leur diversité, les microscopes électroniques sont constitués d'un certain nombre de composantes communes : un ensemble de pompage destiné à assurer un vide convenable dans l'enceinte du microscope, une colonne d'optique électronique comprenant une source d'électrons, des lentilles électroniques, un ou plusieurs systèmes de détection, un étage porte-échantillon permettant l'introduction et les déplacements élémentaires du spécimen en cours d'observation et bien entendu tout l'environnement électrique, électronique et digital pour assurer le fonctionnement des éléments constitutifs du microscope, l'enregistrement et le traitement des résultats



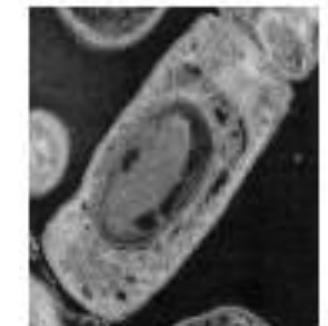
L'utilisation du microscope électronique à visée diagnostique est actuellement très réduite (pathologies rares neuromusculaires, rénales ou de surcharge) et elle a été supplantée par l'immunohistochimie, qui permet d'obtenir des résultats plus précis, beaucoup plus rapidement et à moindre coût.

- « Chaque instrument d'optique nous apporte de nouvelles images qu'il faut apprendre à lire, nous dévoile des phénomènes inconnus qu'il faut comprendre et provoque une autre connaissance du monde.



- **Les microscopes électroniques (ME)**

- **Caractéristiques** : Les électrons remplacent les rayons lumineux. Ils se déplacent dans le microscope électronique dans lequel règne un vide. **Inconvénients** : Observations en noir et blanc de structures mortes.
- **à transmission (MET)** Les électrons traversent l'échantillon. Les zones « blanches » sont interprétées sans structure.
- **Grossissement** : 150 000 fois
- **Avantage** : les coupes ultrafines permettent l'observation des détails
- **à balayage (MEB)** les électrons balayent la surface de l'échantillon. L'image obtenue apparaît en relief.
- **Grossissement** : 30 000 fois
- **Avantage** : idéal pour observer la surface de l'objet à étudier

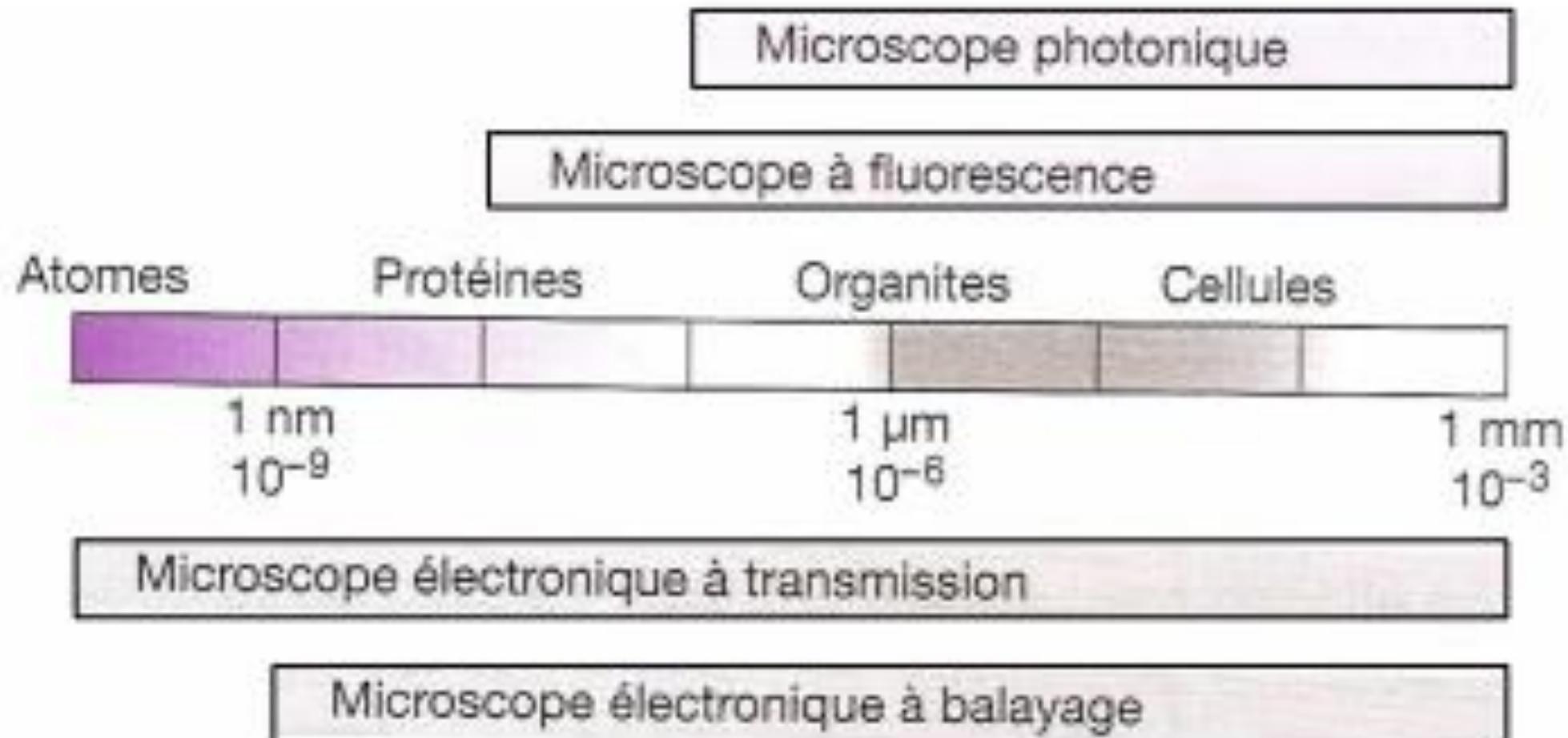


- **Le microscope optique ou photonique (MO)**
- **Caractéristique** : La préparation est traversée par les rayons lumineux
- **Inconvénient** : Grossissement limité (25 à 2 000 fois) ne permettant pas l'observation des détails
- **Avantage** : Observation d'une cellule entière
- **QUELQUES CONSEILS** je vérifie : l'éclairage, la lampe est-elle allumée, le microscope est-il branché ? l'emplacement de la lame sur la platine ,je recommence les réglages à zéro Si ce que je vois, ne me satisfait pas ou que je « perds » la zone à observer : je recommence les réglages à zéro ,j'explore ma préparation en faisant glisser la lame tout en regardant l'oculaire, de droite à gauche, d'avant en arrière Si je ne vois que mes cils : ,j'approche mon œil plus près de l'oculaire et je regarde bien dans l'axe du tube optique



- **La microscopie électronique** permet d'observer des structures plus petites que la microscopie optique. Elle repose sur la traversée de l'échantillon par un faisceau d'électrons (microscope électronique à transmission ou MET) ou la réflexion d'un faisceau d'électrons par l'échantillon (microscope électronique à balayage ou MEB), le tout terminant sur un dispositif photographique ou un écran
- Les clichés (électronographies) au MET sont en deux dimensions (même si des techniques d'ombrage peuvent parfois donner une impression de 3D) et les clichés au MEB sont en trois dimensions. Dans tous les cas, les électronographies sont en noir et blanc, sauf coloriage artificiellement ajouté.
- **Un microscope confocal** est un microscope qui fonctionne avec une arrivée de fins rais de lumière, prenant des images à différents niveaux de l'échantillon, ce qui permet (en combinant ces images) de produire des images en 3D. • Aujourd'hui, la plupart des microscopes à fluorescence sont confocaux.

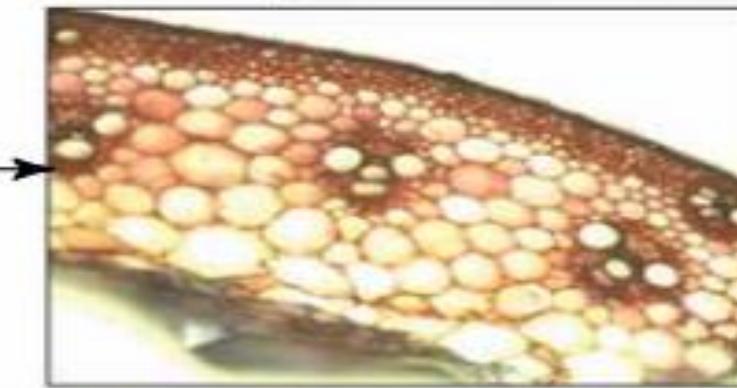
# Comparaison des résolutions



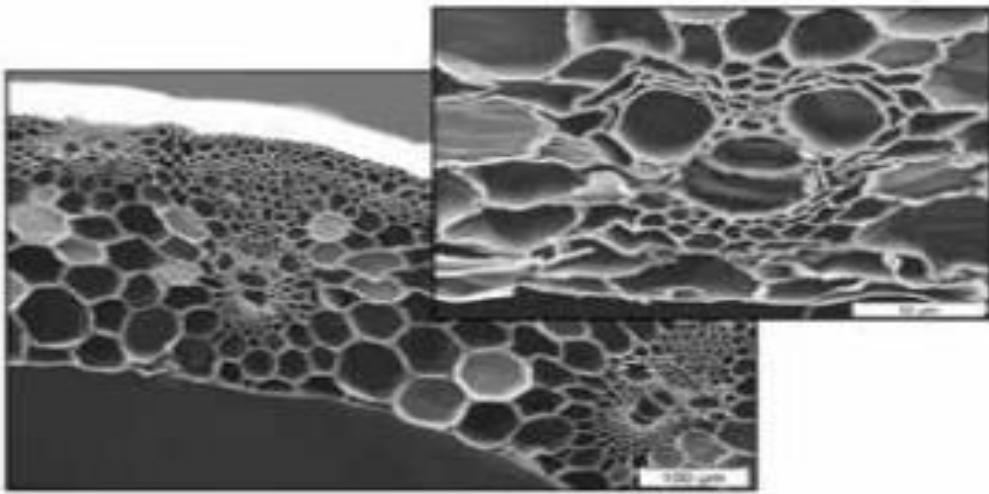
	Microscopie optique	Microscopie Confocale	Microscopie électronique à balayage	Microscopie électronique à transmission
Résolution	Faible 0.2 µm	Moyenne	Elevée 20 à 0.4 nm	Très élevée Quelques Å
Vitesse de mise en œuvre	Rapide	Rapide	Rapide	Longue
Préparation de l'échantillon	+/- coupe fine +/- coloration	+/- marquage	Métafällisation +/- marquage	Inclusion Coupe ultra-fine +/- marquage
Préservation de l'échantillon	oui	non	oui (mais altération par faisceau d'électron)	oui (mais altération par faisceau d'électron)
Les +	Facilité d'utilisation	Possibilité d'observer l'échantillon en profondeur	Facilité d'utilisation	Très haute résolution
Les -	Faible résolution	Difficulté de mise en œuvre	Observation de surface uniquement	Difficulté de mise en œuvre



Observation en  
microscopie  
optique



Observation en  
microscope  
électronique à  
balayage



Observation en  
microscope  
électronique à  
transmission

