

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE Batna 2
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT D'Ecologie et environnement

POLYCOPIE DE COURS 5

Chapitre 5 : Méthodes Cytochimiques (cytologiques et cytogénétiques)

MODULE

MÉTHODES MODERNE D'ANALYSES ET DE
DOSAGES EN BIOLOGIE
MASTER I (BIOTECHNOLOGIE VÉGÉTALE)

Présenté par

Mr. Ghedadba Nabil

Intitulé du Master : Biotechnologie végétale

Semestre : 02

Intitulé de l'UE : UEM1

Intitulé de la matière : Méthodes modernes d'analyses et de dosages en biologie.

Crédits : 4

Coefficients : 2

Objectifs de l'enseignement : Actualiser les connaissances de l'étudiant en matière de nouvelles techniques d'analyse en biologie.

Connaissances préalables recommandées : Biologie.

Contenu de la matière

1. Méthodes spectroscopiques (Spectrophotométrie)
2. Méthodes chromatographiques (chromatographie d'absorption, échange ionique, affinité etc.)
3. Méthodes enzymatiques (dosage d'enzymes, de substrat etc.)
4. Méthodes électro-phorétiques et électrochimiques (réaction antigène anticorps, généralités sur les méthodes immunochimiques courantes, immuno-précipitation etc.)
5. Méthodes cytologiques et ultra structurales.
6. Méthodes cytogénétiques moléculaires (hybridation in situ, FISH, GICH.)

Mode d'évaluation : 50% Contrôle continu + 50% examen final

Références : (Livres et photocopiés, sites internet, etc.)

1. Introduction

Avec le développement du microscope électronique au début des années 1940 et les techniques associées de conservation et de coloration des cellules, la complexité interne de la cellule commença à apparaître dans toute son ampleur.

Ainsi, l'avancement de nos connaissances sur la cellule au cours du 20^e siècle est dû à 2 causes principales:

- **l'augmentation** du pouvoir de résolution des appareils d'analyse, essentiellement ceux de la microscopie électronique et de la diffraction des rayons X;
- **la convergence** de la cytologie avec d'autres domaines de la recherche biologique, et plus particulièrement la génétique, la physiologie et la biochimie.

La cytochimie, la cytoenzymologie, l'immunocytochimie, l'immunofluorescence (directe ou indirecte), la microscopie confocale, la cytofluorimétrie complètent les données de la morphologie.

L'utilisation de traceurs radioactifs que l'on suit dans l'espace et dans le temps (autoradiographie) permet de compenser le caractère statique des documents ultra-structuraux.

Technique cytologique/ histologiques

Pour une observation au microscope photonique, l'échantillon doit être de faible épaisseur (2 à 10 μ m) afin de permettre le passage de la lumière.

Ainsi, lorsque le matériel biologique est massif (tissus animaux ou végétaux : foie, cerveau, muscle, etc. ou tige, feuille, etc.), il faut préalablement le débiter en tranches fines et régulières, que l'on appelle *coupes histologiques*



De plus, les cellules vivantes non pigmentées ne sont pas clairement visibles au microscope à fond clair à cause de la faible différence de contraste entre les cellules et l'eau.

D'où la nécessité d'utiliser des colorants spécifiques pour une observation correcte

2- Techniques de préparation des échantillons

L'échantillon : fixation, inclusion, coupe, étalement, coloration, congélation, Histochimie, immuno-histochimie, histo-enzymologie, autohistoradiographie.

Définitions:

Colorant: produit susceptible de teindre une ou plusieurs structures de façon durable.

Colorations structurales: elles mettent en évidence les composants de certaines structures tissulaires indépendamment du tissu lui-même:

fibres élastiques,

phloème lignifié,

structures kératinisées, chitinisées, etc...

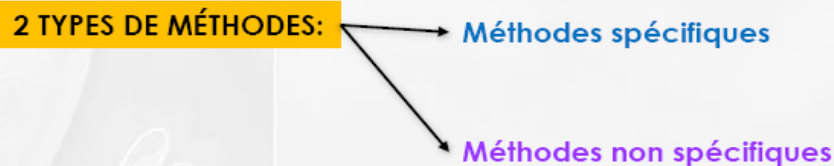
Colorations histologiques: ce sont celles qui différencient finement tous les éléments d'un tissu.

Cette 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.

3- Méthodes cytochimiques

Utilisation de réactions chimiques permettant de mettre en évidence des molécules particulières dans la cellule

Méthodes non spécifiques

Méthodes permettant de détecter **un ensemble de molécules** ayant certaines propriétés chimiques communes.

Ex: ADN, sucres, protéines, lipides,...

Méthode Acide Periodique-Schiff (APS)

PRINCIPE :

L'acide périodique est un oxydant qui scinde les liaisons 1-2 glycol et amino alcool des glucides et des glycoprotéines et forme des poly-aldéhydes.

Ces aldéhydes sont ensuite combinées au réactif de **Schiff (fuchsine acide)** qui donne une couleur rouge pourpre aux structures contenant les aldéhydes.

L'hématoxyline peut être ensuite utilisée pour colorer en bleu les noyaux des cellules.

Tests cytochimiques des polysaccharides

ACIDE PERIODIQUE

REACTIF DE SCHIFF :
> COLORATION ROSE-POURPRE (Mucus, Glycogène)

Détection et localisation des polysaccharides

Test de Feulgen PRINCIPE :

le réactif de Schiff (fuchsine décolorée par oxydation) se recoloré en rouge en présence de composés réducteurs.

Coupe longitudinale de racine de pois

Montage de queue de triton en régénération

Détection et localisation de l'ADN

Dans tous les cas, seuls la chromatine des noyaux interphasiques et le chromosome des cellules en division sont colorés spécifiquement en rouge.

Incorporation de précurseurs radioactifs

Incorporation de précurseurs radioactifs au moment de la synthèse des macromolécules

Leucine radioactive: détection et localisation de **protéines en synthèse**

Thymidine radioactive: détection et localisation d'**ADN répliqué**

Uridine radioactive: détection et localisation d'**ARN en synthèse**

Mannose ou fructose radioactifs: détection et localisation de **molécules glycosylées**

4- Méthodes de localisation des macromolécules dans la cellule et le tissu

Méthodes spécifiques

Méthodes permettant de détecter **une molécule particulière**

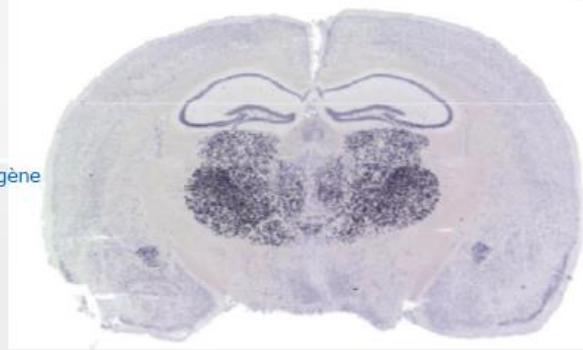
Hybridation in situ (HIS)

Mise en évidence sur des coupes tissulaires (en congélation ou après inclusion dans la paraffine) ou sur des étalements cellulaires, de séquences d'ARN ou d'ADN

grâce à des sondes d'acides nucléiques complémentaires et couplées à un traceur radioactif (**sondes chaudes**) ou à une enzyme (**sondes froides**) ou un fluorochrome (**sondes fluorescentes**).

Section de cerveau de souris : ►

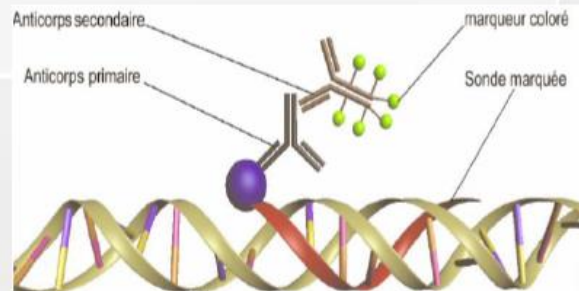
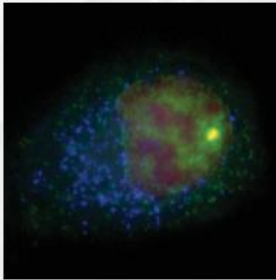
Les points noirs indiquent l'expression d'un gène dans des régions spécifiques



L'hybridation in situ classique a relativement peu d'indications car un grand nombre de copies de l'acide nucléique doit être présent dans la cellule pour qu'une réaction positive soit obtenue.

Elle peut être utilisée pour mettre en évidence des acides nucléiques viraux (HPV, EBV) ou des ARN de chaînes légères d'immunoglobulines.

Le terme *in situ* indique que la détection s'effectue au sein du chromosome en configuration native, à la différence des techniques d'étude d'acides nucléiques **extraits sur gels**.



Appliquées sur des coupes de tissus puis visualisées par:

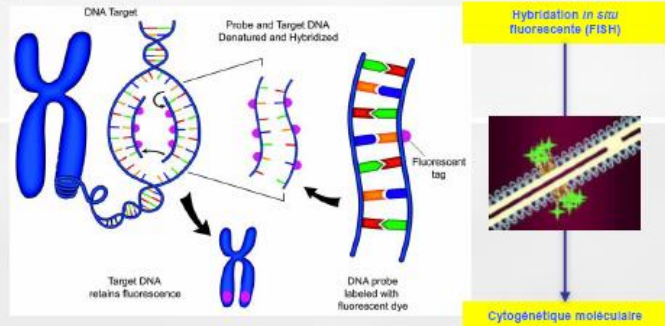
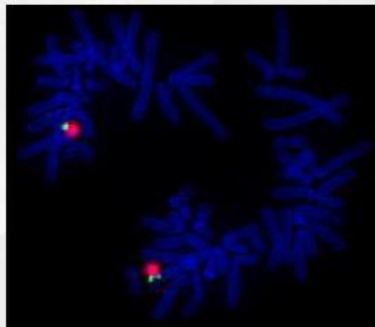
- **radioautographie** grâce aux nucléotides radioactifs incorporés dans la sonde
- **immunohistochimie** grâce à la présence de nucléotides couplés à la **digoxigénine** incorporés à la sonde, alors détectée par un anticorps spécifique couplé à un marqueur (**enzyme** ou **fluorochrome**)

L'**hybridation in situ fluorescente (FISH)** peut se faire sur des suspensions cellulaires, des empreintes ou des coupes congelées ou déparaffinées, et permet d'identifier dans chaque cellule la présence et le nombre de copies d'un segment chromosomique donné et en utilisant des **fluorochromes** différents d'apprécier une éventuelle co-localisation.

Elle est de plus en plus utilisée pour rechercher des anomalies variées chromosomiques (polysomies, monosomies) ou géniques (délétions ou amplifications de certains gènes ; translocations), anomalies qui peuvent avoir dans certaines tumeurs une valeur diagnostique ou pronostique.

Cette technique est un outil diagnostique de maniement encore difficile et onéreux.

Elle est actuellement plus sensible que celle utilisant des techniques chromogéniques (CISH)

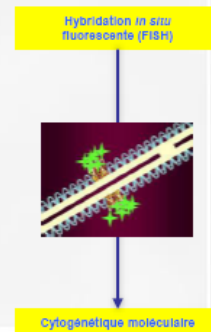


Intérêt de la technique FISH

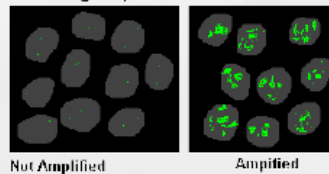
On a recours à la FISH pour identifier des anomalies chromosomiques et d'autres changements génétiques qui se produisent dans les cellules par le biais de sondes d'ADN spéciales marquées de colorants fluorescents.

Cette méthode permet au pathologiste :

- d'obtenir des résultats similaires à ceux du caryotypage mais avec plus de précision
- d'observer des copies additionnelles d'oncogènes qui peuvent se développer dans certains types de cancer (l'oncogène HER2 par exemple)



Fluorescent In-Situ Hybridization Detecting Amplified *neu*



Breast Cancer Cell Nuclei in Paraffin

HER2 et cancer du sein : le principe

Une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la cancérogenèse du cancer du sein a permis de déterminer des cibles thérapeutiques potentielles.

L'une de ces cibles est l'oncoprotéine HER2.

Il s'agit d'un récepteur membranaire appartenant à la famille des facteurs de croissance épidermique de type tyrosine kinase.

Le gène qui pour cette protéine est amplifié dans 20 à 30 % des cancers du sein.

HER2 et cancer du sein : le test

FISH (Fluorescent In Situ Hybridation):

Le principe du test FISH (Abbott, Vysis) est celui d'une hybridation de l'ADN du patient avec une sonde ADN fluorescente reconnaissant le gène HER2 et une deuxième sonde ADN

- reconnaissant le centromère du chromosome 17 (le gène HER2 est situé sur le chromosome 17q21 q22).
- L'énumération des signaux émis par les 2 sondes (HER2 et centromère 17) s'effectue en examinant les noyaux de la tumeur au microscope et permet d'obtenir un ratio du nombre de copies du gène HER2 par rapport à celui du chromosome 17.
- **Un ratio supérieur à 2 est considéré comme positif**

