

HISTOLOGIE MOLÉCULAIRE



J.-G. FOURNIER

TEC
DOC

EM
inter

BL93

COLLECTION



sous la direction de Gérard LUCOTTE

HISTOLOGIE MOLÉCULAIRE

Application des techniques de la biologie moléculaire à l'histologie



Jean-Guy FOURNIER

Chargé de Recherche INSERM

Préface de
René COUTEAUX

4572 1/2

tec & doc
**TEC
&
DOC**
LAVOISIER
11, rue Lavoisier
F 75384 Paris Cedex 08

EM
inter
Editions Médicales
Internationales
Allée de la Croix Bossée
F 94234 Cachan Cedex

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE 1

BASES MOLÉCULAIRES

1 STRUCTURE DES ACIDES NUCLÉIQUES	11
2 TRANSCRIPTION DU GÉNOME DANS LA CELLULE EUCARYOTE	16
2.1 Différentes étapes de la maturation d'un ARNm	17
2.1.1 Formation en 5' de la coiffe (cap) • 2.1.2 Polyadénylation en 3' • 2.1.3 Phénomène d'excision-épissage	
3 CARACTÉRISTIQUES DES SONDÉS NUCLÉIQUES	20
3.1 Types de sondes	20
3.1.1 ADN cloné • 3.1.2 Oligodésoxyribonucléotides • 3.1.3 ARN transcrit in vitro • 3.1.4 Autres types de sondes	
4 MARQUAGES DES ACIDES NUCLÉIQUES À USAGE DE SONDÉS	25
4.1 Marquage pour un ADN double brin	25
4.1.1 Par déplacement de coupures (nick-translation) • 4.1.2 Par amorçage multiple (random priming)	
4.2 Marquage des acides nucléiques synthétiques	28
4.2.1 Oligodésoxyribonucléotides • 4.2.2 ARN de synthèse (ribosonde)	

5 MARQUEURS	32
5.1 Nucléotides radioactifs	32
5.1.1 Phosphore 32 • 5.1.2 Soufre 35 • 5.1.3 Iode 125 • 5.1.4 H 3 (tritium)	
5.2 Nucléotides non radioactifs	38
5.2.1 Nucléotides modifiés (Biotine – Digoxygénine – Autres Nucléotides modifiés)	
5.3 Procédés chimiques de marquage	43
5.3.1 Acétylaminofluorène (AAF) • 5.3.2 Sulfonation (sulfonation/transamination) • 5.3.3 Photobiotine et photodigoxygénine • 5.3.4 Biotine hydrazide • 5.3.5 Mercurisation • 5.3.6 Fluorochrome • 5.3.7 Enzyme • 5.3.8 Autres systèmes de marquage	

CHAPITRE 2

HISTOHYBRIDATION (hybridation *in situ* à l'échelle de la microscopie photonique)

1 MATÉRIEL BIOLOGIQUE	55
1.1 Origine du matériel biologique	55
1.1.1 Chromosomes • 1.1.2 Cellules (Cultures – Cellules isolées – Culots cellulaires) • 1.1.3 Structures multicellulaires complexes	
1.2 Supports du matériel à hybrider	63
1.2.1 Lames ou lamelles pour cultures • 1.2.2 Lames pour cellules et coupes (Gélatine alun de chrome – Polylysine – Denhardt – Bleu alcian – Colle – Aminopropyl-silane)	
2 FIXATION	65
2.1 Généralités	65
2.2 Fixateurs précipitants	66
2.2.1 Mélange éthanol/acide acétique (liquide de Clarke) • 2.2.2 Mélange de Carnoy • 2.2.3 Mélange de Clarke-chrome • 2.2.4 Zenker • 2.2.5 Autres fixateurs précipitants	
2.3 Fixateurs aldéhydiques non précipitants	69
2.3.1 Formaldéhyde (Réaction avec les protéines – Réaction avec les lipides – Réaction	

avec les sucres – Réaction avec les acides nucléiques – Caractéristiques de la fixation par le formaldéhyde – Différentes préparations de solutions de formaldéhyde) •
 2.3.2 *Glutaraldéhyde*

2.4 Mélanges	74
<i>2.4.1 Paraformaldéhyde-lysine-périodate (PLP) • 2.4.2 Ethanol-formaldéhyde-acide acétique (EFA) • 2.4.3 Liquide de Bouin • 2.4.4 Formaldéhyde-acide picrique • 2.4.5 Carnoy-formaldéhyde</i>	
2.5 Fixation physique	77
2.6 Modes de fixation	77
<i>2.6.1 Cellules • 2.6.2 Tissus (Perfusion – Immersion)</i>	
2.7 Inclusion	79
<i>2.7.1 Paraffine • 2.7.2 Gélatine • 2.7.3 Polyéthylène glycol (PEG) • 2.7.4 Résines plastiques (Résines-méthacrylates – Résines époxy)</i>	
2.8 Conservation des préparations sur lames	82

3 TRAITEMENTS AVANT HYBRIDATION _____ 83

3.1 Généralités	83
3.2 Traitements de perméabilisation	83
<i>3.2.1 Déprotéinisation enzymatique (Protéinase K – Pronase – Pepsine) • 3.2.2 Déprotéinisation chimique • 3.2.3 Déprotéinisation physique • 3.2.4 Délipidation • 3.2.5 Congélation-décongélation • 3.2.6 Traitements de stabilisation (Postfixation – Chaleur humide) • 3.2.7 Autres traitements</i>	
3.3 Traitements pour diminuer le bruit de fond	86
<i>3.3.1 Blocage des fonctions aldéhydes libres • 3.3.2 Acétylation • 3.3.3 Préhybridation</i>	
3.4 Traitements pour contrôler les cibles	87
3.5 Dénaturation de l'ADN intracellulaire	87
<i>3.5.1 HCl et NaOH • 3.5.2 Eau bouillante • 3.5.3 Formamide/chaleur</i>	

4 HYBRIDATION _____ 90

4.1 Généralités	90
4.2 Cinétique de la formation des hybrides	90
4.3 Stabilité des hybrides	91
<i>4.3.1 Concentration en sels de sodium • 4.3.2 Pourcentage en G-C • 4.3.3 Longueur de la sonde • 4.3.4 Formamide</i>	

4.4 Facteurs qui affectent la cinétique d'hybridation et composition du milieu d'hybridation 93

4.4.1 Paramètres jouant sur la spécificité des hybrides (pH – concentration en sels – température et formamide – temps d'incubation – taille de la sonde – sulfate de dextran – concentration de la sonde) • 4.4.2 Facteurs diminuant l'accrochage aspécifique (acides nucléiques hétérologues – polyA et phosphate de sodium – Solution de Denhardt – dithiothréitol – détergents)

4.5 Conditions d'hybridation (réalisation pratique) 99

4.6 Traitements posthybridation 101

4.6.1 Lavages dans les tampons • 4.6.2 Post-traitements enzymatiques (action de la nucléase S1 – action de la ribonucléase A – action de la ribonucléase H) • 4.6.3 Préparation des lames pour la mise en évidence des hybrides

5 VISUALISATION DES HYBRIDES 103

5.1 Autoradiographie 103

5.1.1 Macroautoradiographie • 5.1.2 microautoradiographie (protocole de base – colorations et montage des lames)

5.2 Réactions immunocytologiques de complexes d'affinité 106

5.2.1 Visualisation directe (sans intervention – après une intervention) • 5.2.2 Visualisation indirecte • 5.2.3 Colorations et montage des lames

5.3 Observation au microscope photonique 108

5.3.1 Fond clair • 5.3.2 Fond noir • 5.3.3 Contraste de phase • 5.3.4 Contraste interférentiel • 5.3.5 Épi-illumination • 5.3.6 Microscope à fluorescence • 5.3.7 Microscope confocal • 5.3.8 Caméra vidéo

6 SPÉCIFICITÉ DE LA MÉTHODE 111

6.1 Contrôles et témoins 111

6.1.1 Sondes (ADN cloné – Oligonucléotides – Ribosondes) • 6.1.2 Tissus témoins • 6.1.3 Au cours de la réaction d'hybridation • 6.1.4 Au cours des lavages • 6.1.5 Nucléases • 6.1.6 Contrôles des systèmes de visualisation • 6.1.7 Autres

7 SENSIBILITÉ 120

7.1 Sondes 121

7.2 Marqueurs 123

7.3 Choix du matériel 124

7.4 Choix des traitements avant hybridation 125

7.5 Choix des conditions d'hybridation et des cibles 125

7.6	Choix du système de détection et de visualisation	126
7.7	Artéfacts	127
	<i>7.7.1 Hybridation erronée • 7.7.2 Artéfacts avec les sondes radioactives • 7.7.3 Artéfacts avec les sondes non radioactives (biotine – digoxygénine)</i>	
8	QUANTIFICATION	131
8.1	Quantification absolue	131
8.2	Quantification relative	132
	<i>8.2.1 Macroautoradiographie • 8.2.2 Microautoradiographie</i>	
9	DÉTECTIONS MULTIPLES	137
9.1	Détection d'un ARN et d'un antigène	137
	<i>9.1.1 Couplage immunohistochimie/histohybridation • 9.1.2 Couplage histohybridation/immunohistochimie</i>	
9.2	Détection d'un ADN et d'une protéine	143
9.3	Détection de deux acides nucléiques	143
	<i>9.3.1 ARN/ARN • 9.3.2 ADN/ADN</i>	
9.4	Détection triple et plus	146
10	QUELQUES EXEMPLES D'APPLICATIONS DE L'HISTOHYBRIDATION	147
10.1	Identification cellulaire	147
	<i>10.1.1 Virologie • 10.1.2 Système nerveux • 10.1.3 Développement</i>	
10.2	Localisation intracellulaire des séquences nucléiques	161
	<i>10.2.1 Localisation nucléaire • 10.2.2 Noyau • 10.2.3 Cytoplasme</i>	

CHAPITRE 3

AUTRES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE APPLICABLES À L'HISTOLOGIE

1	HYBRIDATION APRÈS AMPLIFICATION GÉNIQUE : PCR <i>IN SITU</i>	169
1.1	Principe de la PCR en solution	169
1.1.1	<i>Préparation du matériel</i> (Fixation - Dénaturation de l'ADN intracellulaire) •	
1.1.2	<i>Solution d'amplification</i> • 1.1.3 <i>Choix des amorces</i> • 1.1.4 <i>Cycle d'amplification</i> (« Départ chaud » [Hot start]) • 1.1.5 <i>Protocole d'amplification</i> • 1.1.6 <i>Détection des</i> <i>produits amplifiés</i> • 1.1.7 <i>Visualisation des hybrides</i>	
1.2	<i>In situ</i> PCR	177
1.3	PCR <i>in situ</i> après transcription inverse	177
2	TRANSCRIPTION <i>IN SITU</i>	179
3	AMORÇAGE <i>IN SITU</i> : « PRINS » (Primed <i>In Situ</i> labelling)	181
4	NICK-TRANSLATION <i>IN SITU</i>	183
4.1	Application de la méthode au phénomène d'apoptose (exemple de protocole pour tissu - protocole pour des cellules en suspension)	184

CHAPITRE 4

HYBRIDATION *IN SITU* ULTRASTRUCTURALE

1	GÉNÉRALITÉS	189
----------	--------------------	-----

2	FIXATION	193
3	HYBRIDATION <i>IN SITU</i> ULTRASTRUCTURALE AVANT INCLUSION EN RÉSINE	195
4	HYBRIDATION <i>IN SITU</i> ULTRASTRUCTURALE APRÈS INCLUSION EN RÉSINE	197
4.1	Caractéristiques des résines Lowicryl	197
	<i>4.1.1 Lowicryl K4M • 4.1.2 Lowicryl HM20</i>	
4.2	Préparation de la résine	199
4.3	Déshydratation des échantillons	200
	<i>4.3.1 Protocole</i>	
4.4	Inclusion en résine	200
4.5	Polymérisation	200
4.6	Coupes	201
4.7	Grilles	201
4.8	Traitements avant hybridation	201
	<i>4.8.1 Détection de séquences ARN • 4.8.2 Détection de séquences ADN (soude – chaleur) • 4.8.3 Autres traitements</i>	
4.9	Sondes moléculaires	202
	<i>4.9.1 Incubation des coupes avec la sonde (temps d'incubation – température d'incubation) • 4.9.2 Lavages</i>	
4.10	Révélation des hybrides	207
	<i>4.10.1 Autoradiographie • 4.10.2 Immunocytochimie</i>	
4.11	Coloration	209
5	HYBRIDATION <i>IN SITU</i> ULTRASTRUCTURALE SUR MATÉRIEL NON INCLUS EN RÉSINE	210
5.1	Cryo-ultramicrotomie	210
5.2	Matériel déposé sur grilles	210
6	CONTRÔLES	212
6.1	Pour les ARN et ADN	212
	<i>6.1.1 Pour les ARN • 6.1.2 Pour les ADN</i>	

6.2 Éléments d'appréciation de la spécificité à l'échelle ultrastructurale	213
6.2.1 Localisation du signal • 6.2.2 Aspect du signal • 6.2.3 Quantification	
7 DÉTECTIONS MULTIPLES	215
8 APPLICATIONS	220
8.1 Interactions virus-cellule	220
8.2 Analyse structure-fonction du nucléole	223
8.3 Organites cytoplasmiques	223
8.3.1 Mitochondries • 8.3.2 Chloroplastes	
8.4 Expression de gènes cellulaires	229
9 DÉPLACEMENT DE COUPURES (NICK-TRANSLATION) IN SITU À L'ÉCHELLE ULTRASTRUCTURALE	232

ANNEXES

I. Marquage des acides nucléiques par des précurseurs, radioactifs ou non, pour être utilisés comme sondes	241
II. Guide général de protocoles d'hybridation	249
III. Protocole de préparation de tampons et solutions	261
IV. Informations complémentaires	266

BIBLIOGRAPHIE	271
---------------------	-----

INDEX DES MOTS CLÉS	291
---------------------------	-----