

BIOLOGIE CELLULAIRE

S1

BENJELLOUN. J

CHERKAOUI. S

LAYACHI. R

**TD3: Marquage des molécules
et immunocytochimie**

1- Marquage

Le marquage est la fixation sur une molécule, d'un signe de reconnaissance facilement identifiable qui permet le suivi d'un composé dans un organisme, un organe, un tissu ou dans une cellule.

2 types de marqueurs:

- isotopes radioactifs (autoradiographie)
- composés fluorescents.

1-1- Marquage par des isotopes radioactifs : **l'autoradiographie**

a- Définition

- Technique d'imagerie permettant de marquer une molécule avec un isotope radioactif.
- Isotopes: atomes d'un même élément qui ont le même numéro atomique mais une masse atomique différente.

Ex: ${}^6_{12}\text{C}$ carbone stable
 ${}^6_{14}\text{C}$ isotope radioactif

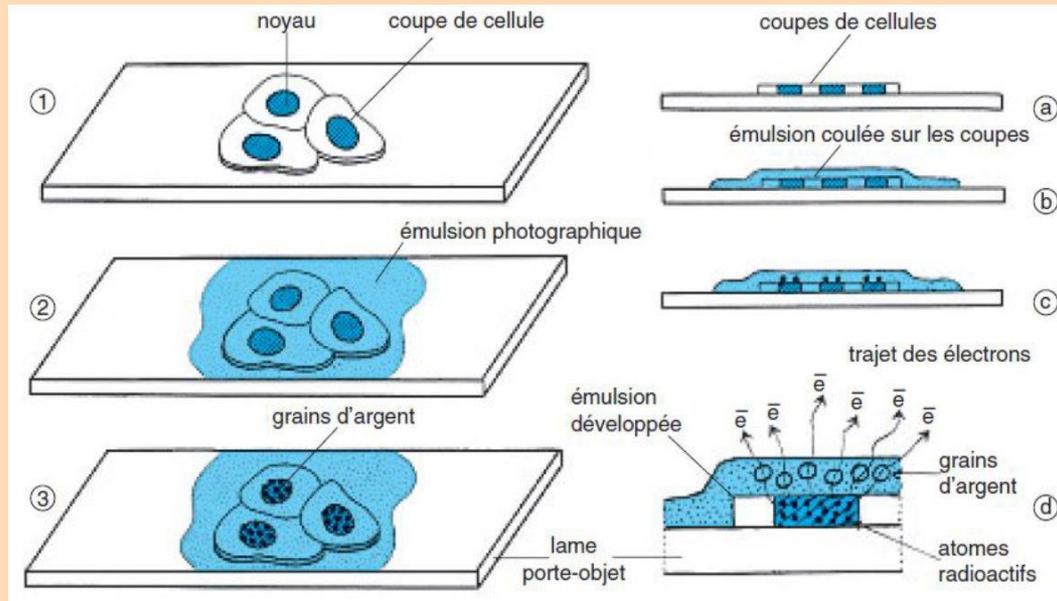
-Les isotopes radioactifs vont faciliter le repérage de l'emplacement de la molécule et le suivi de son déplacement au cours du temps en émettant des particules ou des rayonnements électromagnétiques.

b- Principe de l'autoradiographie

- Injection du composé radioactif (^{14}C , ^3H) dans un organisme.
- Sacrifice de l'organisme et réalisation de coupes très fines dans les tissus à étudier.
- Fixation du matériel et élimination par lavage des composants radioactifs non incorporés.
- Application sur le matériel d'une émulsion photographique (mélange de gélatine et de cristaux d'AgBr = bromure d'Ag).

- Conservation de la préparation à l'obscurité pendant plusieurs jours.
- Pendant ce temps, transformation de l'AgBr en Ag métallique due au rayonnement émis par les éléments radioactifs.
- Développement du film pour faire apparaître les zones contenant les grains d'argent.
- Observation du matériel permettant de localiser les molécules ayant incorporé l'élément radioactif.

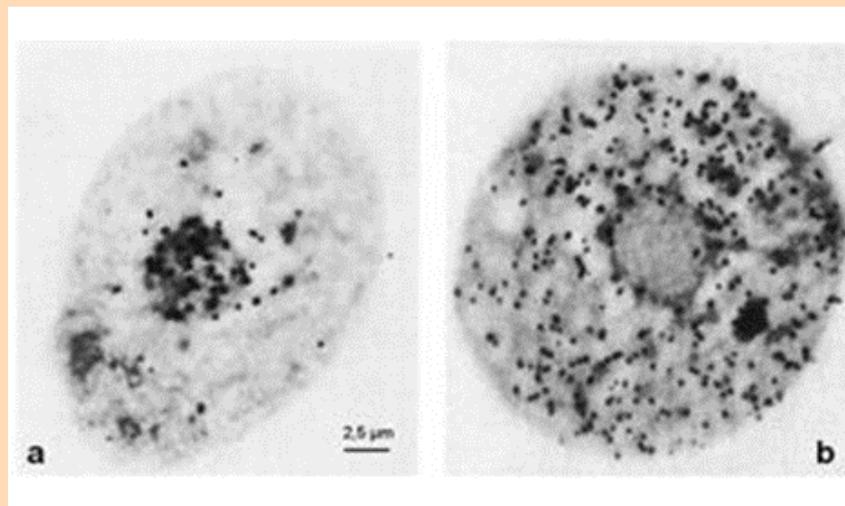
➤ Différentes étapes de la technique d'autoradiographie

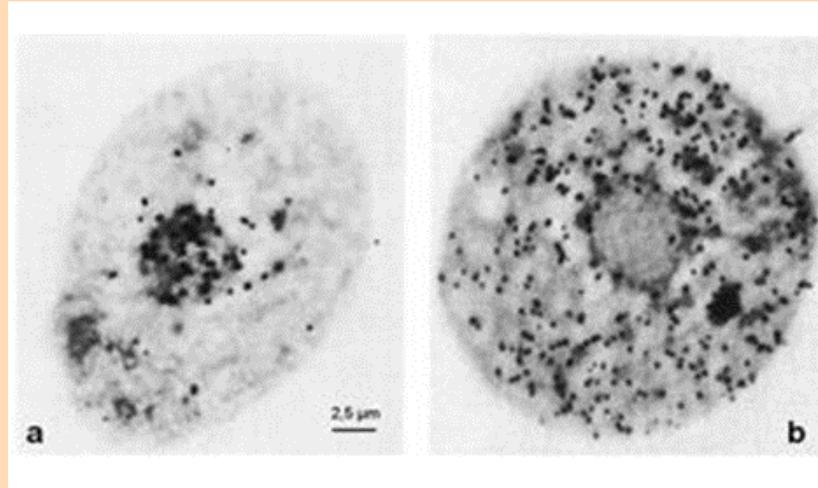


- Technique appliquée à des coupes traitées pour la microscopie photonique.
- Les cellules analysées ont incorporé, avant le traitement, un précurseur radioactif spécifique de l'ADN (thymidine tritiée), de sorte que seuls les noyaux apparaîtront marqués après développement de l'émulsion.
- (1) Coupes de cellules marquées collées sur une lame de verre.
- (2) Coulage d'une émulsion photographique à l'obscurité.
- (3) Aspect des coupes de cellules après développement de l'émulsion.
- (a), (b) et (c) : aspect en coupe des préparations 1, 2 et 3 ; (d) : secteur agrandi de (c).

c- Exemple d'autoradiographie: localisation d'ARNm dans une cellule animale

- Les deux photographies ci-dessous présentent des autoradiographies de cellules cultivées en présence d'un précurseur radioactif spécifique de l'ARN (l'**uracile radioactif**).
- Chaque tache noire repère un endroit où se trouve de l'ARN ayant incorporé le précurseur radioactif.





a. Autoradiographie après culture sur milieu radioactif pendant 15 minutes.

b. Autoradiographie après culture sur milieu radioactif pendant 15 minutes puis transfert sur un milieu de culture non radioactif pendant une heure et demie.

Conclusion:

L'ARN est formé dans le noyau (a) mais, contrairement à l'ADN, on le retrouve peu après dans le cytoplasme (b).

Donc: l'ARN radioactif s'est déplacé.

1-2- Marquage par des substances fluorescentes

a- Définition

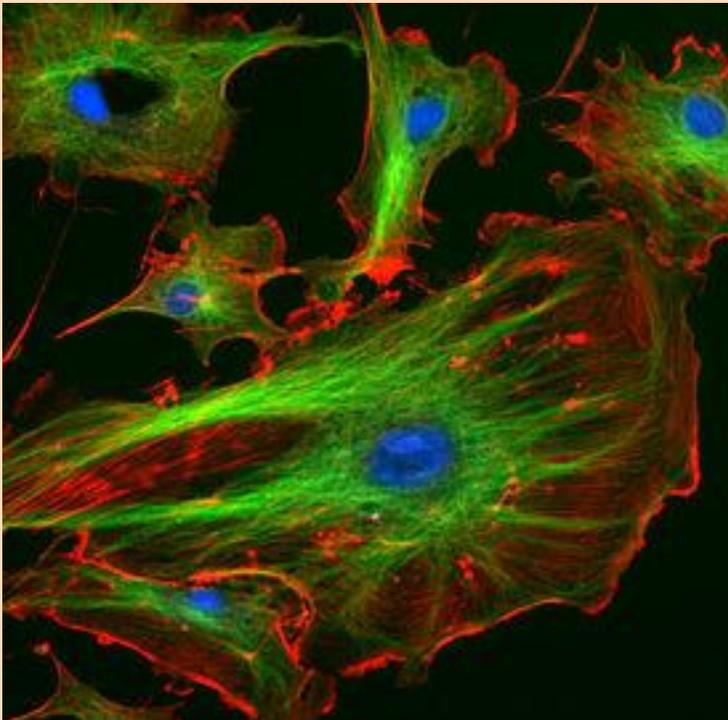
- Technique de marquage qui se fait entre un fluorochrome (ou fluorophore) et la molécule à marquer.
- Fluorochrome: substance chimique capable d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation.
- Observation des substances ou des échantillons d'organismes morts ou vivants à l'aide d'un microscope optique à fluorescence.

Microscope à fluorescence inversé (Nikon TE2000) ; la plaque orangée permet à l'utilisateur de regarder l'échantillon, tout en protégeant les yeux de la lumière UV qui excite la cible pour la rendre fluorescente.

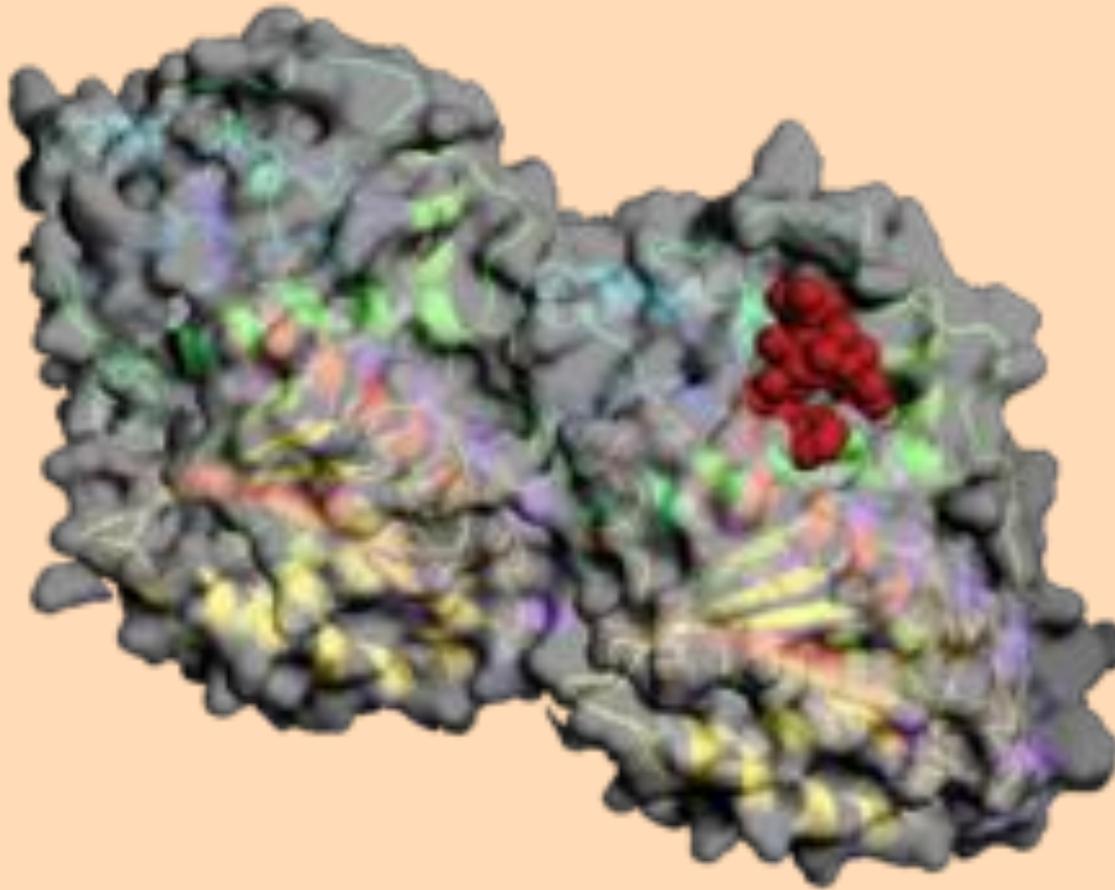


b- Exemple: Marquage de microtubules

- Production au laboratoire d'un analogue fluorescent de la globuline (tubulines α et β): molécule à étudier couplée avec un colorant fluorescent.
- Cet analogue est introduit dans la cellule par micro-injection à l'aide d'une micropipette de verre d'1micron de diamètre.



- Observation des analogues qui se polymérisent en dimères, en protofilaments puis en microtubules qu'il est donc possible de voir individuellement.
- Microtubules reconnus par des anticorps anti-tubuline fluorescents (verts);éléments du cytosquelette d'une cellule eucaryote (fibroblaste).



Un dimère de tubuline lié à une molécule de Taxol, en rouge (activateur de polymérisation)

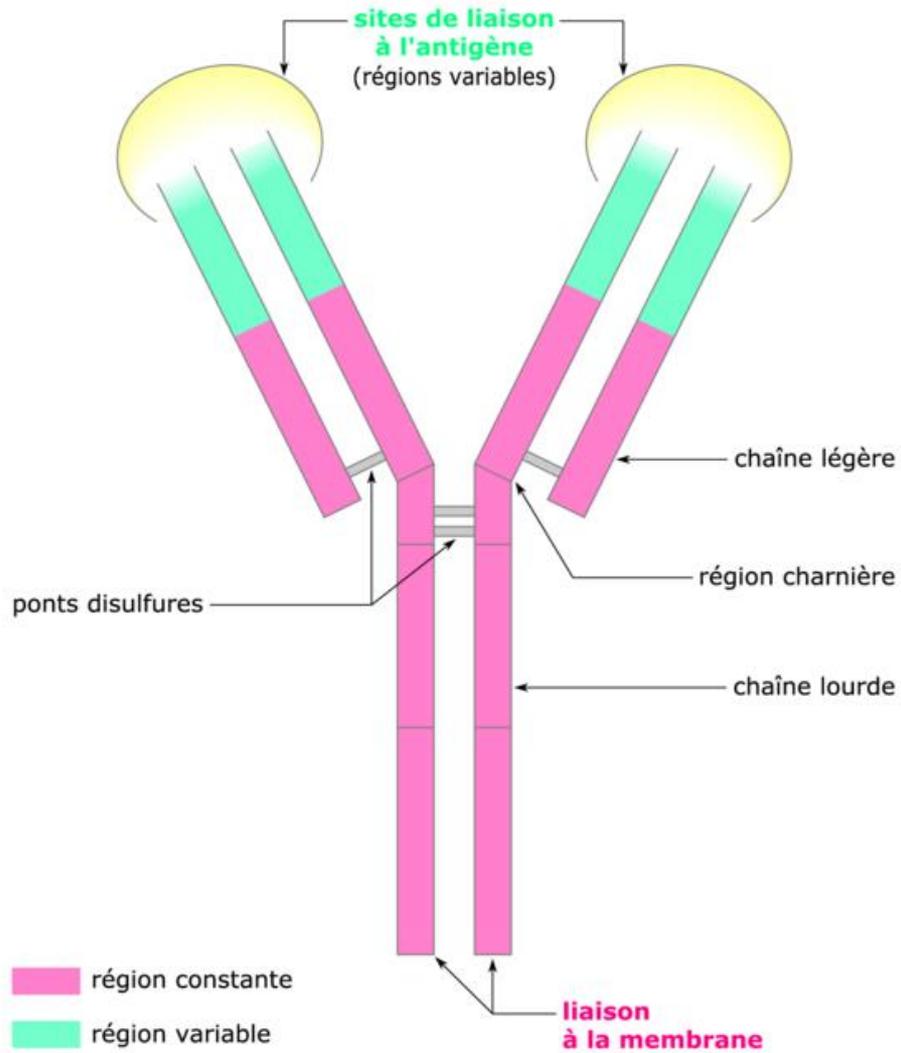
2- Techniques immunocytochimiques

- L'immunocytochimie repose sur l'antigénicité des protéines.
- Elle permet de révéler spécifiquement des molécules qui ne pourraient l'être avec les plus puissants microscopes électroniques.
- On peut produire des anticorps contre n'importe quel constituant cellulaire.

2-1- Préparation des anticorps

- Injection d'un antigène purifié (protéine) à un animal d'une autre espèce que celle dont on a extrait l'antigène injecté.
- L'animal traité développe une réaction immunologique: des macrophages phagocytent la protéine, la fragmentent en peptides et les exposent à leur surface grâce au CMH II (complexe majeur d'histocompatibilité de type II).
- Chacun de ces peptides déclenche la multiplication de lymphocytes T différents. Les lymphocytes T activent les lymphocytes B qui se transforment en cellules productrices d'anticorps, les plasmocytes.
- L'anticorps obtenu se fixe sur la protéine qui est à l'origine de sa fabrication.

Représentation schématique d'une immunoglobuline



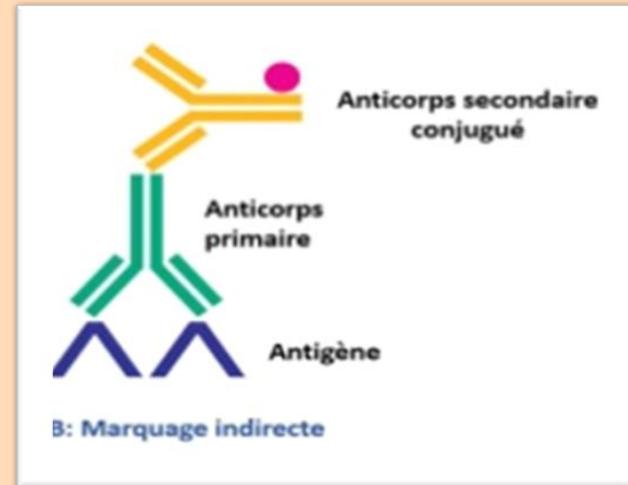
Anticorps = Glycoprotéine de la famille des immunoglobulines

2-2- Marquage de l'anticorps

Pour visualiser le complexe antigène-anticorps, on associe à l'anticorps un système marqueur (ou révélateur) composé d'une molécule détectable en microscopie tels que:

- substance fluorescente (ex: isothiocyanate de fluorescéine) : technique d'immunofluorescence utilisable uniquement au MO
- enzyme (peroxydase du raifort, phosphatase alcaline). La visualisation du marqueur se fait par la production de précipité coloré par l'enzyme: technique immunoenzymologique utilisable au MO et ME
- marqueurs métalliques (ferritine, or colloïdal) utilisés en ME car opaques aux électrons.

2-3- Technique de détection



Immunocytochimie directe A:

- Les anticorps repérables par leur marqueur se fixent sur leur antigène.

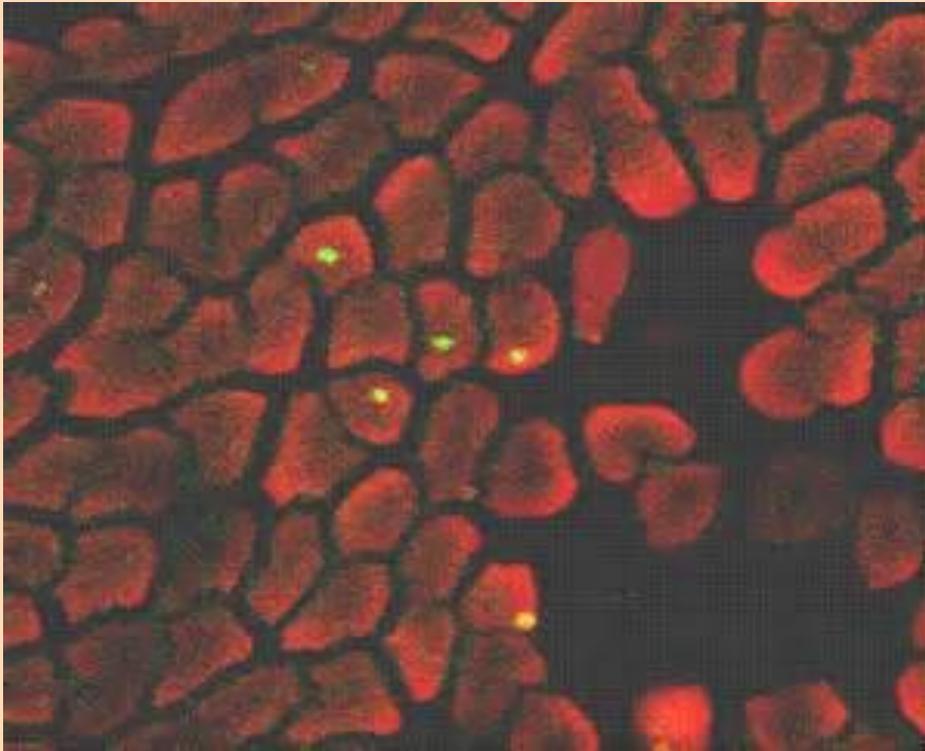
- Le complexe antigène anticorps marqueur est alors détectable en microscopie.

Immunocytochimie indirecte B:

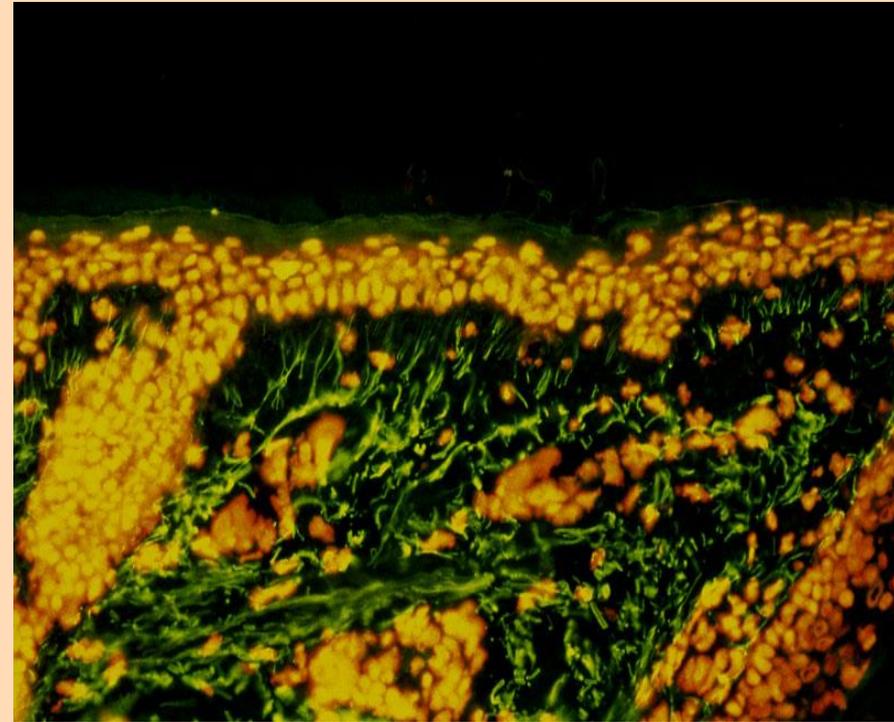
Augmente la sensibilité de la réaction, en combinant deux types d'anticorps:

- les anticorps anti-protéine (anticorps primaires)

- les anticorps « anti-anticorps primaires » (= anticorps secondaires) porteurs de marqueurs.



Présence d'une bactérie *Bartonella henselae* dans les globules rouges de chat révélés après **immunofluorescence directe** à l'aide d'un anticorps monoclonal



Marquage par **immunofluorescence indirecte** de l'élastine (en vert) dans une coupe de peau humaine

2-4 - Exemple d'application : la mobilité des protéines

a- Principe

Les glycoprotéines de la face externe de la membrane plasmique sont spécifiques d'un type cellulaire donné.

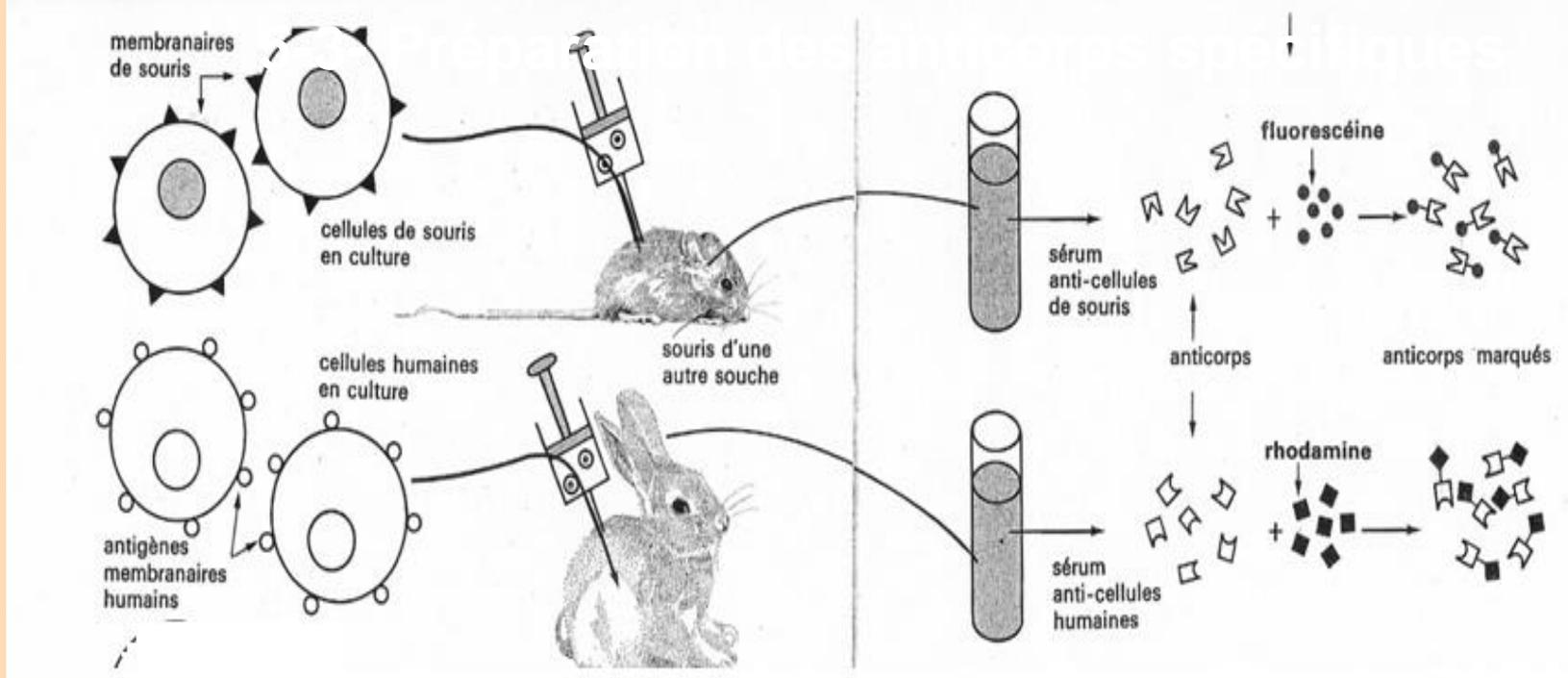
Lorsqu'une cellule est introduite dans un organisme étranger, elle déclenche la production d'anticorps qui se fixent sur les antigènes leur correspondant et les neutralisent.

Les anticorps spécifiques peuvent être préparés au labo, puis ils sont marqués avec un composé fluorescent. Ces anticorps rendus fluorescents sont utilisés comme marqueurs spécifiques des glycoprotéines.

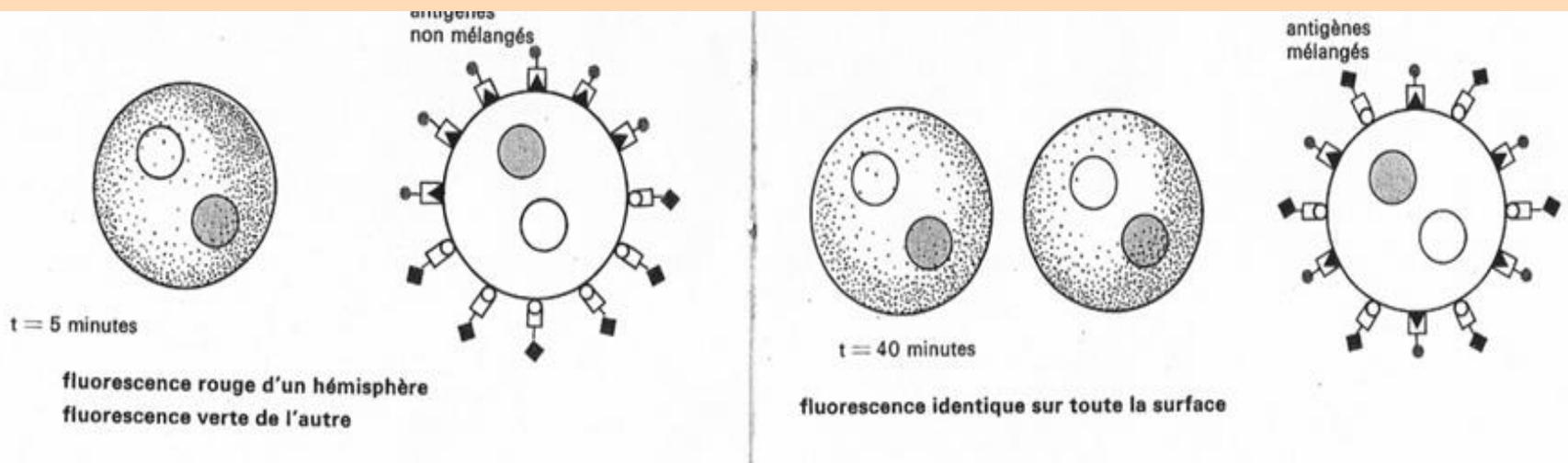
b - Mise en évidence de la diffusion des protéines dans le plan membranaire

Cette diffusion des glycoprotéines a été mise en évidence lors de la fusion de cellules d'espèces différentes.

Ex: cellules de souris et cellules humaines



- On injecte à une souris des cellules de souris d'une autre souche maintenues en culture in vitro. La souris réagit en produisant des anticorps « anti-cellule de souris ». Ces anticorps sont marqués à la **fluorescéine** (fluorescence verte au microscope à UV).
- On injecte à un lapin des cellules d'homme en culture. Le lapin réagit en produisant des anticorps « anti-cellule d'homme », ces anticorps seront marqués à la **rhodamine** (fluorescence rouge au microscope à UV).



c- Fusion des deux types de cellules

- On provoque la fusion entre les cellules de souris et les cellules humaines. Il se forme des hétérocaryons contenant chacun un noyau de souris et un noyau humain.
- A t=0mn: on ajoute à l'hétérocaryon un mélange d'anticorps marqués par la rhodamine et la fluorescéine pour identifier la position des glycoprotéines (antigènes) de l'homme et de la souris dans la membrane de l'hétérocaryon.

d- Résultats:

- À $t=5\text{mn}$, on observe au microscope à UV, une fluorescence rouge d'une hémisphère de l'hétérocaryon et une fluorescence verte de l'autre hémisphère. Donc les anticorps marqués se sont fixés sur les antigènes correspondants: les glycoprotéines membranaires.
- À $t=40\text{mn}$, on observe une fluorescence homogène (verte et rouge) sur toute la surface de l'hétérocaryon. Donc le complexe antigène-anticorps de type souris et de type humain se sont mélangés dans la membrane de l'hétérocaryon.

Conclusion:

- Les protéines membranaires se déplacent ou diffusent dans la membrane plasmique.
- La bicouche lipidique est une bicouche fluide.