

# PASS

LICENCE SANTÉ



**PASS  
LAS**

# Histologie, biologie de la reproduction et embryologie

2<sup>e</sup> édition

- ▶ Tout le programme en fiches synthétiques
- ▶ 570 QCM corrigés
- ▶ Commentaires et conseils

Denis **Sarrouilhe** (coord.)  
Guylène **Page**  
Laure **Favot-Laforge**



## Chapitre 1

---

# Généralités sur les tissus

*Pr Denis SARROUILHE*

## Fiche 1 - Généralités sur les tissus

L'organisation d'un être Humain peut être définie à différentes échelles : l'atome, la molécule, l'organite, la cellule qui est l'unité fondamentale de la structure de l'organisme Humain, le tissu, l'organe qui est formé de plusieurs tissus, l'appareil ou système qui est un groupe d'organes avec des fonctions complémentaires ou similaires. L'**histologie**, ou anatomie microscopique, est l'étude des tissus, à la fois sur un plan descriptif et fonctionnel. L'histologie se situe au carrefour de plusieurs autres disciplines, comme la biologie moléculaire, la biochimie, la biologie cellulaire, la physiologie et l'anatomie.

Le terme de **tissu** désigne un ensemble de cellules présentant une structure semblable et remplissant une (ou des) fonction commune. Un tissu peut être un **tissu simple** ou un **tissu composé**. Dans le corps Humain, 4 tissus simples ou **primaires** peuvent être distingués : 1) le tissu épithélial, qui est un tissu de revêtement (par exemple l'épiderme) ou un tissu glandulaire (par exemple le pancréas exocrine) ; 2) le tissu conjonctif, assurant différentes fonctions comme le soutien, la protection et la liaison entre d'autres tissus ; 3) le tissu musculaire (strié squelettique, cardiaque, lisse) dont les contractions permettent le mouvement et 4) le tissu nerveux (central et périphérique) permettant la communication et la régulation au sein de notre organisme. Un tissu composé, est une combinaison de tissus simples, qui y sont associés morphologiquement et fonctionnellement. Ainsi, la plupart de nos organes contiennent des tissus des 4 groupes primaires, la disposition de ces derniers au sein de l'organe, avec la participation d'éléments vasculaires et d'éléments nerveux, déterminant sa structure et ses capacités fonctionnelles.

Les tissus se développent à partir des 3 feuilletts embryonnaires (voir fiche n° 19) : le tissu nerveux, à partir de l'ectoderme ; le tissu musculaire et le tissu conjonctif, à partir du mésoderme ; le tissu épithélial et les glandes, à partir de l'endoderme.

### Les 4 tissus simples :

- \* le tissu épithélial
- \* le tissu conjonctif
- \* le tissu musculaire
- \* le tissu nerveux

## QCM 1 à 10

### 1. Le bon enchaînement dans les échelles d'organisation d'un être humain est :

- A. l'atome/la molécule/l'organite/le tissu/ la cellule/l'organe/l'appareil ou système/l'organisme
- B. l'atome/la molécule/l'organite/la cellule/le tissu/ l'appareil ou système /l'organe/l'organisme
- C. l'atome/la molécule/l'organite/la cellule/le tissu/l'organe/l'appareil ou système/l'organisme
- D. l'atome/ l'organite/la molécule/ la cellule/le tissu/l'organe/l'appareil ou système/l'organisme
- E. l'atome/la molécule/l'organite/la cellule/le tissu/l'organe/l'organisme/ l'appareil ou système

### 2. L'histologie est la discipline qui :

- A. permet de comprendre le fonctionnement normal et pathologique des tissus
- B. étudie l'anatomie macroscopique de l'Homme
- C. étudie l'anatomie microscopique de l'Homme
- D. étudie la structure des tissus
- E. est pratiquée par un anatomopathologiste

### 3. Un tissu est :

- A. un ensemble de cellules présentant une même structure
- B. un ensemble de cellules ayant la même origine embryonnaire
- C. un ensemble de cellules remplissant une fonction commune
- D. simple, s'il est une combinaison de plusieurs tissus composés
- E. le niveau d'organisation intermédiaire entre la cellule et l'organe

### 4. Concernant le tissu, quelles sont les propositions exactes ?

- A. un tissu peut remplir plusieurs fonctions
- B. un tissu peut être observé en microscopie optique
- C. le tissu est l'unité fondamentale de l'organisme humain
- D. un tissu peut être simple ou composé
- E. un tissu primaire peut se subdiviser en plusieurs variétés de tissus

**5. Les quatre tissus primaires sont :**

- A. le tissu épithélial
- B. le tissu nerveux
- C. le tissu digestif
- D. le tissu musculaire
- E. le tissu conjonctif

**6. Concernant le tissu composé :**

- A. il s'agit d'une combinaison morphologique de tissus primaires
- B. il s'agit d'une combinaison fonctionnelle de tissus primaires
- C. la plupart de nos organes renferment des tissus composés
- D. des éléments vasculaires peuvent être retrouvés au sein d'un tissu composé
- E. des éléments nerveux peuvent être retrouvés au sein d'un tissu composé

**7. Parmi les propositions suivantes, laquelle(lesquelles) correspond(ent) à un tissu composé ?**

- A. la plèvre
- B. l'intima vasculaire
- C. le tissu nerveux
- D. la muqueuse intestinale
- E. le tissu adipeux

**8. Parmi les propositions suivantes, laquelle(lesquelles) correspond(ent) à un tissu ayant pour origine l'ectoderme ?**

- A. le tissu nerveux
- B. le tissu musculaire
- C. le tissu conjonctif
- D. le tissu épithélial
- E. le tissu adipeux

**9. Parmi les propositions suivantes, laquelle(lesquelles) correspond(ent) à un tissu ayant pour origine le mésoderme ?**

- A. le tissu nerveux central
- B. le tissu musculaire
- C. le tissu conjonctif
- D. le tissu épithélial
- E. le tissu nerveux périphérique

**10. Parmi les propositions suivantes, laquelle(lesquelles) correspond(ent) à un tissu ayant pour origine l'endoderme ?**

- A. le tissu nerveux
- B. le tissu musculaire strié squelettique
- C. le tissu conjonctif
- D. le tissu épithélial
- E. le tissu musculaire lisse

## Réponses 1 à 10

### 1. Réponse C.

**2. Réponses A, C, D et E.** L'anatomie macroscopique (visible à l'œil nu) s'intéresse au corps humain ainsi qu'à ses organes et appareils.

**3. Réponses A, B, C et E.** Ce sont les tissus composés qui sont des combinaisons de plusieurs tissus simples.

**4. Réponses A, B, D et E.** La cellule est l'unité fondamentale de la structure de l'organisme humain. Le tissu épithélial, qui est un tissu primaire, peut être subdivisé en tissus de revêtement et tissus glandulaires.

**5. Réponses A, B, D et E.** Il n'existe que quatre tissus primaires, les tissus épithélial, conjonctif, musculaire et nerveux.

**6. Réponse A, B, C, D et E.** Un tissu composé est une combinaison de tissus simples, qui y sont associés morphologiquement et fonctionnellement. La plupart de nos organes contiennent des tissus des 4 groupes primaires, la disposition de ces derniers au sein de l'organe, avec la participation d'éléments vasculaires et d'éléments nerveux, déterminant sa structure et ses capacités fonctionnelles.

**7. Réponses A, B et D.** Le tissu nerveux et le tissu adipeux sont des tissus simples. La plèvre est la séreuse des poumons. Elle est organisée en deux feuillets composés d'un mésothélium et d'un tissu conjonctif sous-jacent. L'intima est la couche interne de la paroi vasculaire. Elle est composée d'un endothélium reposant sur une couche de tissu conjonctif. La muqueuse intestinale est constituée d'un épithélium reposant sur du tissu conjonctif (*lamina propria* ou chorion).

**8. Réponse A.** Le tissu musculaire, le tissu conjonctif et le tissu adipeux (tissu conjonctif spécialisé) se forment à partir du mésoderme. Le tissu épithélial se forme à partir de l'endoderme.

**9. Réponses B et C.** Le tissu nerveux, que cela soit celui du système nerveux central ou celui du système nerveux périphérique, se forme à partir de l'ectoderme. Le tissu épithélial se forme à partir de l'endoderme.

**10. Réponse D.** Le tissu nerveux se forme à partir de l'ectoderme. Le tissu musculaire (strié squelettique, cardiaque et lisse) et le tissu conjonctif se forment à partir du mésoderme.

## Chapitre 2

---

# **Les méthodes d'étude de la cellule et des tissus**

*Pr Laure FAVOT-LAFORGE*



## Fiche 2 - Les méthodes d'étude de la cellule et des tissus

### La microscopie

La **limite de résolution** de l'œil humain, c'est-à-dire la faculté de reconnaître comme distincts 2 particules proches, est de 0,1 mm. La taille d'une cellule procaryote est de l'ordre du micron et celle d'une cellule eucaryote est de 20  $\mu\text{m}$  en moyenne. L'étude de l'architecture cellulaire et tissulaire nécessite donc l'utilisation d'un microscope.

Les microscopes utilisent la déviation d'un flux ondulatoire de particules constitué, soit **de photons** (microscopie optique ou photonique), soit **d'électrons** (microscopie électronique) au travers d'un système de lentilles de manière à former une image agrandie d'un objet.

### Le microscope optique

Le microscope optique a une limite de résolution de l'ordre de **0,2  $\mu\text{m}$**  et permet un grossissement jusqu'à 1000 fois. Il est constitué d'une platine porte objet, d'une lampe à photons et de plusieurs lentilles de verre dont un condenseur qui concentre la lumière sur l'objet, un objectif qui donne de l'objet observé une image agrandie non déformée et des oculaires jouant le rôle de loupe et permettant d'observer l'image.

Il existe plusieurs types de microscopes optiques utilisés en histologie comme :

1- le microscope **à fond clair** qui permet de recueillir la lumière qui a été transmise par l'échantillon. Ce type de microscope est surtout utilisé pour observer des échantillons colorés.

2- le microscope **à fond noir** qui permet d'observer les cellules vivantes en augmentant les contrastes naturels

3- le microscope **à contraste de phase** qui permet d'observer les cellules vivantes en amplifiant les contrastes naturels basés sur les différences d'indice de réfraction des structures intracellulaires.

4- le microscope **à fluorescence** dont on distinguera 2 types : le microscope à fluorescence conventionnelle et le microscope confocal

### Le microscope à fluorescence conventionnel

Le microscope optique forme une image à partir de la lumière qui traverse l'échantillon mais il est aussi possible de visualiser une image par détection de la lumière qui est émise par l'échantillon. Le microscope à fluorescence est équipé d'une lampe à mercure polychromique ou d'ampoules à LED, d'un miroir dichroïque ainsi que de filtres d'excitation et d'émission. De nombreuses molécules dites fluorescentes sont capables d'absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation) et de la restituer sous forme de lumière fluorescente (lumière d'émission). Chaque molécule fluorescente ou fluorochrome possède son propre spectre d'excitation et d'émission. La fluorescence des échantillons

peut être naturelle (présence de pigments comme la chlorophylle ou auto-fluorescence des tissus) ou due à l'emploi de marqueur fluorescent comme le DAPI (Di Aminido Phenyl Indol) qui est un intercalant de l'ADN. Il est également possible d'identifier les constituants cellulaires en construisant des protéines de fusion avec des protéines naturellement fluorescentes comme la protéine verte de méduse (« green fluorescent protein – GFP ») ou en utilisant des anticorps couplés à un fluorochrome.

### **Le microscope à fluorescence confocal**

Quand on observe un objet avec un microscope à fluorescence, on va recueillir de la lumière émise par plusieurs plans de la préparation ce qui génère une perte de résolution de l'image. Le microscope confocal permet de sélectionner la lumière ne provenant que d'un seul plan focal. L'objet est éclairé par un mince faisceau laser qui balaye l'échantillon à une profondeur donnée. La lumière émise par l'échantillon passe ensuite dans un diaphragme en forme de tête d'épingle ou « **pinhole** » qui sélectionne les rayons émis par un seul plan de la préparation. Plusieurs plans successifs de la préparation sont analysés dans l'épaisseur de l'échantillon et le traitement informatique des données permet de reconstruire une image en 3 dimensions.

### **Le microscope électronique**

Il existe 2 types de microscopes électroniques. On distingue le microscope électronique à transmission ou MET qui produit des images à partir d'électrons qui traversent l'objet et le microscope électronique à balayage ou MEB qui produit des images à partir d'électrons qui sont réfléchis par la surface de l'objet.

**Le microscope à transmission** : les échantillons sont placés sur une grille métallique. La source d'électrons est une cathode en tungstène placée au sommet d'une colonne creuse appelée canon à électrons. Le faisceau d'électrons est accéléré par une tension électrique puis dirigé sur l'échantillon par un condenseur constitué d'électro-aimants. Le faisceau d'électrons traverse l'échantillon. Suivant l'épaisseur, la densité ou la nature chimique de la préparation, les électrons sont plus ou moins absorbés. Les électrons qui traversent l'échantillon sont dirigés par les lentilles sur un écran fluorescent à impact électronique ce qui se traduit par la formation d'une zone claire. Au contraire, les électrons diffractés par les structures cellulaires n'atteignent pas l'écran et il en résulte la formation d'une zone sombre. La limite de résolution du MET est de 0,2 nm avec un grossissement maximum de 1 000 000 fois. La MET est utilisée pour visualiser l'ultrastructure des cellules et des tissus.

**Le microscope électronique à balayage** : le faisceau d'électrons bombarde l'échantillon massif. Les interactions entre les atomes de la surface et de l'intérieur de l'échantillon et les électrons du faisceau du microscope provoquent l'émission d'électrons et de rayonnements secondaires. Ces derniers

sont captés par des détecteurs spécialisés et sont utilisés pour construire une image sur un tube cathodique. Le nombre d'électrons secondaires qui atteint le tube cathodique dépend de la nature de la surface de l'échantillon.

On augmente artificiellement le rendement de production des électrons en recouvrant sous vide la surface de l'échantillon par une fine couche de métaux lourds. La MEB permet d'étudier la surface des cellules et de ses constituants avec une limite de résolution de l'ordre de 10 nm et un grossissement maximum de 20 000 fois.

Lorsque l'on veut observer un tissu avec un microscope, l'échantillon doit être transparent à la lumière et donc de faible épaisseur. Ceci ne pose pas de problème pour l'étude des cellules mais les tissus doivent être coupés en sections de 2 à 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Avant d'être coupés, les tissus sont fixés de manière à immobiliser les structures dans un état le plus proche possible de ce qui est observé dans les conditions physiologiques. Les tissus sont ensuite inclus dans une substance dure comme de la paraffine ou alors congelés de manière à pouvoir les couper en tranches minces. Les techniques de fixation et d'inclusion seront différentes selon le type de microscope que l'on utilisera pour observer l'objet.

L'analyse des constituants cellulaires nécessite souvent une amplification des contrastes naturels qui existent entre les différentes régions de la cellule. On peut augmenter artificiellement ces contrastes en employant des colorations.

### **Préparation des échantillons en vue d'une étude en microscopie optique**

La fixation va permettre de préserver les structures cellulaires, d'inactiver les enzymes (ce qui va bloquer les processus de décomposition enzymatique post-mortem) et de favoriser les colorations en rendant les cellules plus perméables. Les fixateurs les plus couramment utilisés sont le paraformaldéhyde, le formol, les mélanges acide acétique/méthanol et le liquide de BOUIN. Le paraformaldéhyde et le formol insolubilisent les protéines en créant des ponts méthyl entre les groupements amines libres des protéines. Ce sont des fixateurs couramment utilisés mais ils ont tendance à masquer certains sites antigéniques. Le liquide de BOUIN est composé de formol, d'acide acétique et d'acide picrique. Il permet une bonne conservation des structures biologiques mais génère une autofluorescence des tissus qui le rend incompatible avec la microscopie à fluorescence. Le mélange acide acétique/méthanol entraîne la coagulation des protéines. Il permet de conserver les sites antigéniques des constituants cellulaires et l'intégrité des éléments du cytosquelette.

Les tissus fixés sont ensuite inclus dans des blocs de paraffine afin de faciliter la réalisation de coupes ultrafines au microtome. La paraffine est hydrophobe et n'est donc pas miscible avec l'eau contenue dans les organes. Par contre, la paraffine est soluble dans des solvants organiques tels que le toluène. Avant l'inclusion, les tissus sont déshydratés à l'aide de bains successifs

d'éthanol de concentration croissante (70, 95 puis 100°) puis de toluène. Le tissu est ensuite plongé dans un bain de paraffine à 56°C puis refroidi de manière à obtenir un bloc de paraffine solide dans lequel l'échantillon est inclus. Les blocs sont coupés à l'aide d'un microtome, un appareil muni d'un couteau en acier permettant de réaliser des coupes de 2 à 5 µm d'épaisseur. Les coupes de tissus sont ensuite collées sur des lames de verre.

Il est également possible de fixer les tissus par congélation rapide. Les échantillons sont préalablement placés dans un agent cryoprotecteur comme le sucrose ou le glycérol pour éviter la formation de cristaux de glace. Ils sont plongés dans une solution d'isopentane refroidie par de l'azote liquide. La congélation permet de préserver l'intégrité des protéines et donc les activités enzymatiques. Les tissus congelés sont coupés avec un microtome à congélation ou cryostat qui est maintenu à une température comprise entre -20 et -30° C. Les coupes à congélation (de 5 à 10 µm d'épaisseur) sont déposées sur des lames de verre. Cette technique permet une bonne préservation des sites antigéniques et des lipides ainsi que l'analyse des activités enzymatiques cellulaires.

Une fois coupés, les échantillons peuvent être colorés pour mettre en évidence certains composants cellulaires. Les coupes issues des échantillons paraffinés doivent être déparaffinées à l'aide de toluène puis réhydratées dans des bains d'alcool à degrés décroissants (100, 95 et 70°) puis d'eau. Parmi les colorations couramment utilisées en histologie on peut citer :

- **Le mélange éosine-hématoxyline-safran (HES)**, utilisé pour visualiser l'architecture du tissu. L'hématoxyline colore les noyaux en bleu, l'éosine colore les composants basiques cytoplasmiques et extracellulaires en rose et le safran colore les fibres de collagène en jaune orangé.

- **Le trichrome de MASSON** composé d'hématoxyline, de fuchsine acide et de vert lumière permet de colorer respectivement les noyaux en brun, le cytoplasme en rouge et les fibres de collagène en vert.

- **La coloration de MAY-GRUNWALD-GIEMSA (MGG)** est utilisée principalement pour différencier les cellules sanguines

- **L'orcéine** est utilisé pour mettre en évidence les fibres élastiques.

Suite à la coloration, les coupes sont placées entre lame et lamelle dans un milieu spécifique avant l'observation au microscope. Le milieu de montage doit avoir un indice de réfraction proche de celui du verre. Les milieux de montage utilisés en histologie sont des résines hydrophobes et il est nécessaire de déshydrater à nouveau l'échantillon avant le montage.

### **Préparation des échantillons en vue d'une étude en MET**

De la même manière que pour la microscopie optique, les échantillons doivent être fixés, inclus, coupés et colorés. Les échantillons sont fixés à l'aide de glutaraldéhyde ou d'un mélange de formaldéhyde et de glutaraldéhyde

tamponné à pH et osmolarité physiologiques puis traités avec une solution de tétr oxyde d'osmium. Le tétr oxyde d'osmium réagit avec les fonctions insaturées des lipides en donnant des oxydes noirs intenses opaques aux électrons permettant de renforcer les contrastes cellulaires. Les échantillons sont ensuite déshydratés dans des bains d'éthanol de degré croissant puis d'oxyde de propylène. L'inclusion est effectuée dans une résine synthétique à chaud (résine époxy) de manière à pouvoir réaliser des coupes ultrafines à l'aide d'un ultramicrotome muni d'un couteau en diamant. Les coupes sont récupérées dans un réservoir d'eau puis disposées sur des grilles métalliques.

Le contraste des structures est renforcé par imprégnation des coupes avec des sels de métaux lourds (citrate de plomb, acétate d'uranyle) qui ne se déposent pas de manière homogène sur les constituants cellulaires. C'est ce que l'on appelle la **coloration positive**.

D'autres techniques comme la coloration négative, l'ombrage, la cryofracture sont utilisées en MET. La **coloration négative** est utilisée pour observer des petites particules comme les virus, les ribosomes, des complexes protéiques. Le principe est de contraster non pas une structure donnée mais l'espace qui l'entoure donnant une image en négatif (l'objet observé apparaît clair sur fond sombre). Une goutte de sel de métaux lourds est déposée sur une grille sur laquelle se trouve l'échantillon à analyser. En séchant, l'agent de contraste entoure très étroitement les structures et épouse les irrégularités de surface. Les **techniques d'ombrage** permettent d'accentuer les reliefs d'un objet en vaporisant de biais des sels de métaux lourds sur un échantillon fixé et déshydraté. Pour la **cryofracture**, les tissus sont congelés rapidement puis frappés avec une lame, ce qui entraîne une séparation du tissu en 2 parties. Quand le plan de fracture traverse une cellule, les structures cellulaires ont tendance à dévier le couteau et le trait de fracture présente alors des reliefs dus à l'hétérogénéité des constituants cellulaires. Les tissus subissent ensuite un **cryodécapage** (déshydratation par sublimation) puis un ombrage métallique. Pour finir, on dépose une couche uniforme de carbone de manière à obtenir un moulage de la surface cellulaire et le tissu est dissous. On obtient alors une réplique de métal et de carbone qui est observée en MET.

### **Préparation des échantillons en vue d'une étude en MEB**

L'échantillon est fixé, déshydraté et recouvert sous vide d'une fine couche d'or et de palladium afin de permettre aux électrons d'être réfléchis par la surface de l'objet.

### **Méthodes d'études de la composition des cellules – Techniques de détection *in situ***

Ce sont des techniques qui permettent de connaître la nature et la localisation des constituants cellulaires. **L'histo chimie** permet de localiser les constituants cellulaires grâce à des réactions chimiques qui mettent en évidence

les fonctions et les groupements réactifs présents dans les macromolécules. Parmi les colorations utilisées en histochimie on peut citer la **réaction de PAS** (« periodic acid Schiff ») qui réagit avec les polysaccharides et la **coloration de FEULGEN** qui permet de mettre en évidence l'ADN.

**La cytoenzymologie** permet de localiser une activité enzymatique *in situ* dans des cellules vivantes ou sur une coupe après congélation du tissu. La préparation est mise en présence du substrat de l'enzyme étudiée et l'activité enzymatique va conduire à la formation d'un produit coloré insoluble que l'on va pouvoir visualiser. On peut par exemple détecter l'activité peroxydase dans les polynucléaires éosinophiles ou l'activité de la succinate déshydrogénase mitochondriale.

**L'immunohistochimie** permet de localiser une protéine d'intérêt (qui a des propriétés antigéniques) dans une coupe de tissus ou dans une cellule à l'aide d'un anticorps. La plupart des protéines présentent plusieurs motifs antigéniques que l'on appelle des épitopes. Il existe des **anticorps monoclonaux** qui ne reconnaissent qu'un seul épitope et des **anticorps polyclonaux**.

Pour fabriquer un anticorps, des animaux (chèvre, lapin, souris) reçoivent une injection de la protéine d'intérêt. Le système immunitaire de l'animal réagit et les lymphocytes B activés vont synthétiser des anticorps (immunoglobulines) qui reconnaissent les différents sites antigéniques de la protéine injectée. Le sérum de l'animal va donc contenir un mélange d'anticorps produits par plusieurs clones de lymphocyte B et on qualifie ce mélange d'anticorps de polyclonal. Il est possible de prélever la rate de l'animal immunisé et d'isoler les lymphocytes B correspondants. Ces lymphocytes B sont fusionnés avec des plasmocytes tumoraux afin de les rendre immortels. Les hybridomes capables de synthétiser des anticorps fonctionnels sont sélectionnés et clonés et vont constituer une source d'anticorps monoclonaux.

Les anticorps utilisés en immunohistologie doivent être marqués avec un traceur afin de pouvoir localiser les complexes antigènes/anticorps sur les préparations. Les fluorochromes comme **la fluorescéine** et **la rhodamine** sont utilisés comme traceurs lorsque l'on travaille en microscopie à fluorescence. De nombreux fluorochromes sont actuellement disponibles et permettent d'effectuer des marquages multiples sur un même échantillon. Les anticorps peuvent également être couplés à une enzyme comme la **péroxydase de raifort** ou la **phosphatase alcaline**. En présence d'un composé chromogène, ces enzymes entraînent la formation d'un produit coloré qui est visualisé en microscopie optique. Pour travailler en microscopie électronique, les anticorps sont couplés à des particules d'or colloïdal opaque aux électrons dont on peut faire varier le diamètre.

Les méthodes de détection des complexes anticorps/antigènes peuvent être directes ou indirectes. Lorsque les signaux à observer sont de forte intensité, on

réalise des **marquages immunohistologiques directs** c'est-à-dire que l'anticorps reconnaissant la protéine d'intérêt (qu'on appelle anticorps primaire) est directement couplé avec le traceur. Lorsque la protéine recherchée est faiblement exprimée, on va augmenter l'intensité des marquages en employant des méthodes de détection dites indirectes. Ces méthodes indirectes nécessitent l'utilisation d'anticorps dit secondaires qui sont dirigés contre les immunoglobulines de l'espèce chez laquelle ont été produits les anticorps primaires. L'antigène présent dans la préparation interagit avec un anticorps primaire non marqué qui est ensuite mis en évidence par un anticorps secondaire couplé à un traceur. Il est également possible de marquer l'anticorps primaire avec des molécules de biotine, une vitamine qui se fixe sur les résidus leucine des protéines. Les complexes antigènes-anticorps biotinylés sont ensuite mis en évidence avec un anticorps secondaire dirigé contre la biotine.

On va également pouvoir étudier la composition cellulaire par **cytométrie en flux** à partir de cellules en suspension. La cytométrie en flux est une technique qui permet de trier les cellules d'un type donné au sein d'un mélange en déterminant leur forme, leur taille, leur granulosité et leur intensité de fluorescence. Par cytométrie en flux on va pouvoir étudier l'expression de marqueurs caractéristiques des populations cellulaires mais également leur contenu en ADN. En combinant plusieurs fluorochromes, on va pouvoir analyser simultanément une 40<sup>aine</sup> de paramètres.

**L'hybridation *in situ*** permet de mettre en évidence, dans des cellules ou des tissus, des séquences particulières d'ADN ou d'ARN. Cette technique est basée sur le fait que des monobrins d'acide nucléique vont s'associer spontanément s'ils présentent une complémentarité de bases. On utilise des sondes c'est-à-dire de courtes séquences nucléotidiques complémentaires des séquences que l'on veut étudier. Ces sondes sont marquées avec un fluorochrome, la biotine, une enzyme comme la phosphatase alcaline ou encore un traceur radioactif. Les échantillons sont fixés, l'ADN est dénaturé avant l'incubation avec la sonde. L'hybridation est ensuite mise en évidence à l'aide d'un microscope ou par autoradiographie. L'hybridation *in situ* sur chromosome est utilisée en clinique pour mettre en évidence des anomalies du nombre de chromosomes ou des réarrangements chromosomique plus ou moins complexes.

## QCM 11 à 50

### 11. A propos des limites de résolution :

- A. celle de l'œil humain est de l'ordre de 0,1 mm
- B. celle d'un microscope optique à contraste de phase est de l'ordre de 0,2  $\mu\text{m}$
- C. celle d'un microscope optique à fluorescence est de l'ordre de 1 nm
- D. celle d'un microscope électronique à balayage est de l'ordre de 0,5 nm
- E. celle d'un microscope électronique à transmission est de l'ordre de 10 nm

### 12. A propos de la microscopie :

- A. le microscope électronique à balayage permet de révéler l'ultrastructure des cellules
- B. le microscope électronique à transmission permet d'étudier l'ultrastructure membranaire
- C. le microscope électronique à transmission produit des images à partir d'électrons qui traversent les échantillons
- D. un microscope à fluorescence permet de visualiser le noyau des cellules
- E. pour détecter l'expression d'une protéine par microscopie électronique, on peut utiliser un anticorps couplé à l'or colloïdal

### 13. A propos du microscope optique :

- A. la qualité de l'image est conditionnée par les caractéristiques des oculaires
- B. le condensateur concentre la lumière sur l'objet observé
- C. les objectifs sont constitués de lentilles convergentes
- D. les oculaires sont constitués de lentilles de très courte distance focale
- E. les objectifs à immersion ont un pouvoir séparateur inférieur aux objectifs à sec

### 14. A propos du microscope optique à fond clair :

- A. c'est un microscope complexe
- B. il est idéal pour observer des coupes histologiques colorées
- C. l'image est formée par la lumière qui est directement transmise par l'échantillon
- D. il est utilisé pour augmenter les contrastes lors de l'observation des cellules vivantes
- E. il a un pouvoir séparateur environ 100 fois supérieur à celui de l'œil humain



**15. Vous souhaitez observer un fibroblaste en culture. Parmi les microscopes listés ci-dessous, lequel, lesquels pouvez-vous utiliser ?**

- A. un microscope électronique à transmission
- B. un microscope électronique à balayage
- C. un microscope photonique à fond clair
- D. un microscope photonique à contraste de phase
- E. un microscope photonique droit

**16. A propos du microscope à fluorescence:**

- A. c'est un microscope optique
- B. le filtre d'excitation est placé entre la source lumineuse et l'échantillon
- C. le filtre d'excitation permet de sélectionner la lumière fluorescente émise par l'échantillon
- D. le miroir dichroïque réfléchit la lumière quelle que soit sa longueur d'onde
- E. il permet l'observation des cellules vivantes

**17. Parmi les propositions suivantes, laquelle, lesquelles peuvent s'appliquer à la microscopie photonique ?**

- A. le condenseur du microscope est constitué d'électro-aimants
- B. la limite de résolution est de 0,2 nm
- C. l'objet observé est déshydraté et placé sous vide
- D. des ampoules à LED peuvent éclairer l'objet
- E. l'image se forme sur un écran fluorescent

**18. Parmi les préparations suivantes, laquelle, lesquelles sont visibles en microscopie optique ?**

- A. un virus
- B. une bactérie
- C. un noyau cellulaire
- D. des ribosomes
- E. les granulations des lysosomes

**19. A propos des molécules fluorescentes :**

- A. leur longueur d'onde d'émission est supérieure à leur longueur d'onde d'excitation
- B. la fluorescéine est excitée par une lumière rouge et émet une lumière verte
- C. la rhodamine est excitée par une lumière verte et émet une lumière rouge
- D. le DAPI est excité par une lumière bleue et émet une lumière violette
- E. la protéine GFP est excitée par une lumière rouge et émet une lumière verte

**20. La fixation des tissus permet :**

- A. de préserver la localisation spatiale des composants cellulaires
- B. le maintien des activités enzymatiques post mortem
- C. la pénétration des colorants dans les tissus
- D. la solubilisation des protéines cellulaires
- E. la préservation des acides nucléiques

**21. Parmi les fixateurs listés ci-dessous, lequel ou lesquels sont des fixateurs coagulants ?**

- A. l'acide acétique
- B. le formol
- C. le glutaraldéhyde
- D. le méthanol
- E. l'acide picrique

**22. Parmi les fixateurs listés ci-dessous, lequel ou lesquels sont des fixateurs non coagulants ?**

- A. le paraformaldéhyde
- B. le tétr oxyde d'osmium
- C. l'éthanol
- D. l'acétone
- E. le liquide de BOUIN

**23. Les fixateurs coagulants :**

- A. entraînent la formation de ponts méthyl entre les protéines
- B. permettent la préservation des acides nucléiques
- C. permettent la préservation des organites intracellulaires
- D. modifient la structure tertiaire des protéines
- E. permettent une bonne pénétration des tissus par la paraffine

**24. A propos des fixateurs :**

- A. le tétroxyde d'osmium fixe les lipides
- B. l'alcool modifie la structure tertiaire des protéines
- C. l'acétone solubilise les protéines
- D. le formol permet la mise en évidence des réserves de glycogène
- E. le formol entraîne un durcissement des membranes cellulaires

**25. A propos de l'hématoxyline :**

- A. c'est un colorant cytoplasmique
- B. c'est un colorant nucléaire
- C. c'est un colorant acide
- D. c'est un colorant anionique
- E. c'est un colorant éosinophile

**26. A propos de l'éosine :**

- A. c'est un colorant anionique
- B. c'est un colorant basique
- C. c'est un colorant qui a une affinité pour les éléments basiques
- D. c'est un colorant qui a une affinité pour les éléments cationiques
- E. c'est un colorant cytoplasmique

**27. A propos des colorations :**

- A. la coloration de trichrome de MASSON permet de mettre en évidence les noyaux
- B. le safran colore les fibres de collagène en jaune orangé
- C. l'acide picrique colore le cytoplasme en rouge
- D. l'orcéine colore les fibres élastiques en brun
- E. l'éosine colore les érythrocytes en bleu

**28. A propos des colorations :**

- A. la coloration de trichrome de MASSON permet de visualiser les fibres élastiques
- B. la coloration de PERLS permet d'étudier le métabolisme du fer
- C. l'orcéine permet de mettre en évidence les fibres de collagène
- D. la coloration de MAY-GRUNWALD-GIEMSA est utilisée pour mettre en évidence les polynucléaires neutrophiles
- E. le rouge Congo permet la mise en évidence des dépôts d'amylose.

**29. Dans la coloration de MAY-GRUNWALD-GIEMSA on trouve notamment :**

- A. de l'éosine
- B. du bleu de méthylène
- C. de la fuschine
- D. de l'azur de méthylène
- E. du safran

**30. Suite à la coloration de MAY-GRUNWALD-GIEMSA :**

- A. les hématies apparaissent en rose clair
- B. les noyaux apparaissent pourpres
- C. les granulations des polynucléaires basophiles apparaissent en bleu/violet foncé
- D. les granulations des polynucléaires neutrophiles apparaissent en brun foncé
- E. le cytoplasme des lymphocytes apparaît rose

**31. Dans la coloration de trichrome de MASSON on trouve notamment :**

- A. de l'hématoxyline
- B. de l'éosine
- C. de la fuchsine basique
- D. du bleu alcian
- E. du vert lumière

**32. A propos de la coloration de PAS (periodic acid shift) :**

- A. elle permet de mettre en évidence les lipides membranaires
- B. elle permet de mettre en évidence les mucines
- C. elle permet de mettre en évidence la membrane basale
- D. elle est utilisée pour mettre en évidence le glycogène
- E. elle permet de déterminer l'origine mésenchymateuse d'une tumeur

**33. A propos de l'inclusion des tissus dans de la paraffine :**

- A. la paraffine est hydrophile
- B. la paraffine est soluble dans le toluène
- C. les tissus paraffinés sont coupés avec un microtome à congélation
- D. l'inclusion des tissus dans de la paraffine permet d'étudier les activités enzymatiques cellulaires
- E. les coupes issues des tissus paraffinés sont observables en MET

**34. Parmi les propositions suivantes, laquelle, lesquelles sont correctes ?**

- A. le milieu d'inclusion le plus utilisé est la gélatine
- B. la paraffine est soluble dans l'eau
- C. avant l'inclusion, les tissus sont déshydratés
- D. les échantillons paraffinés peuvent être directement colorés avec de l'éosine
- E. la déshydratation des tissus s'effectue à l'aide de bains de méthanol de degré croissant

**35. A propos des coupes à congélation :**

- A. avant d'être congelé le tissu doit être fixé
- B. des coupes de 1 à 2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont réalisées
- C. ces coupes permettent les expériences d'immunohistochimie
- D. ces coupes permettent l'étude des lipides
- E. ces coupes ne permettent pas l'étude des acides nucléiques

**36. Vous voulez observer les fibres de collagène présentes dans un tissu. Dans quel ordre allez-vous effectuer les opérations suivantes ?**

- A. hydratation/ fixation/déshydratation/inclusion/coupe/coloration
- B. fixation/déshydratation/inclusion/coupe/coloration/hydratation
- C. déshydratation/ fixation /inclusion/coupe/coloration/hydratation
- D. fixation/déshydratation/inclusion/coupe/ hydratation/ coloration
- E. inclusion/ fixation/déshydratation/coupe/coloration/hydratation

**37. L'observation en microscopie électronique nécessite :**

- A. la fixation des tissus dans un mélange méthanol/acide acétique
- B. l'inclusion des tissus dans de la paraffine
- C. l'utilisation d'un ultramicrotome muni d'un couteau en platine
- D. une coloration des tissus pour augmenter les contrastes
- E. le montage des coupes entre lame et lamelle

**38. A propos de l'observation des membranes par cryofracture :**

- A. le trait de fracture passe entre les 2 feuilletts membranaires
- B. les échantillons sont ensuite recouverts de résine époxy
- C. la réplique est observée en MEB
- D. l'échantillon biologique est dissous dans un solvant acide avant l'observation
- E. les particules intramembranaires sont plus nombreuses sur la face exoplasmique que sur la face protoplasmique.

**39. A propos de la préparation des échantillons pour l'analyse en MET :**

- A. les échantillons sont fixés avec du glutaraldéhyde à pH 8,5
- B. le tétroxyde d'osmium interagit avec les fonctions insaturées des lipides
- C. le citrate de plomb permet d'augmenter le contraste des membranes cellulaires
- D. l'acétate de potassium permet d'augmenter le contraste des noyaux
- E. des coupes de 800 nm d'épaisseur sont réalisées.

**40. A propos du tétroxyde d'osmium :**

- A. il est utilisé pour la préparation des tissus avant l'observation en microscopie optique
- B. il est utilisé à la place du formaldéhyde pour fixer les tissus
- C. c'est un fixateur coagulant
- D. il entraîne la précipitation des acides nucléiques
- E. il permet de renforcer les contrastes cellulaires.

**41. A propos des échantillons observés en MEB :**

- A. le MEB a un pouvoir séparateur supérieur à celui du MET
- B. il permet d'observer les filaments du cytosquelette
- C. des coupes ultrafines de l'échantillon doivent être réalisées avant l'observation
- D. l'échantillon est recouvert d'une fine couche de carbone pour l'observation
- E. l'échantillon est placé sous vide pour l'observation

**42. Parmi les coloration suivantes, laquelle, lesquelles relèvent de l'histochimie ?**

- A. la coloration de PERLS
- B. la coloration à l'éosine
- C. la coloration de FEULGEN
- D. la coloration de PAS
- E. la coloration au bleu de trypan

**43. A propos des techniques utilisées en histologie :**

- A. l'histochimie permet de visualiser les noyaux cellulaires
- B. la cytoenzymologie permet d'étudier l'activité mitochondriale
- C. l'hybridation *in situ* permet d'identifier une protéine cytoplasmique
- D. la cytoenzymologie peut être effectuée sur une coupe à congélation
- E. le réactif de FEULGEN permet d'étudier le cycle cellulaire

**44. A propos des techniques histologiques :**

- A. avant d'être inclus dans la paraffine, les tissus sont déshydratés
- B. la déshydratation se termine par un bain d'éthanol absolu
- C. en microscopie électronique, la post-fixation avec le citrate d'uranyle permet de visualiser les noyaux
- D. les milieux de montage utilisés en microscopie électronique sont hydrophobes
- E. le liquide de BOUIN est un fixateur utilisé en microscopie à fluorescence

**45. Parmi les techniques suivantes laquelle, lesquelles permettent l'étude des cellules vivantes ?**

- A. la cytométrie en flux
- B. la cytoenzymologie
- C. l'hybridation *in situ*
- D. la microscopie électronique à balayage
- E. l'immunohistochimie

**46. Parmi les techniques suivantes laquelle, lesquelles permettent l'étude des protéines cellulaires ?**

- A. l'immunocytochimie
- B. l'immunofluorescence
- C. l'hybridation *in situ*
- D. la cytométrie en flux
- E. la cytoenzymologie

**47. A propos de la production des anticorps :**

- A. les anticorps polyclonaux sont obtenus en injectant plusieurs antigènes à un animal
- B. les anticorps monoclonaux sont obtenus à partir de clones de lymphocytes T
- C. les hybridomes sont des cellules immortelles
- D. les anticorps polyclonaux sont obtenus plus rapidement que les anticorps monoclonaux
- E. les anticorps monoclonaux donnent des marquages plus intenses que les anticorps polyclonaux

**48. A propos des méthodes d'immunodétection indirectes :**

- A. l'anticorps primaire est couplé au traceur
- B. l'anticorps secondaire est couplé au traceur
- C. les anticorps primaire et secondaire sont produits chez le même animal
- D. l'immunodétection indirecte est plus sensible que l'immunodétection directe
- E. l'immunodétection directe génère un bruit de fond plus important que l'immunodétection indirecte

**49. A propos de la cytométrie en flux :**

- A. elle permet d'étudier les cellules adhérentes
- B. elle permet d'étudier plusieurs marqueurs simultanément
- C. elle permet d'étudier uniquement les protéines qui sont localisées dans la membrane plasmique
- D. elle permet de différencier un lymphocyte B d'un lymphocyte T
- E. elle permet d'identifier les cellules mortes

**50. A propos de l'hybridation *in situ* sur chromosome :**

- A. elle permet d'étudier les protéines nucléaires
- B. elle permet de réaliser un diagnostic anténatal
- C. elle permet de dénombrer les chromosomes présents dans une cellule
- D. elle ne peut être réalisée que sur des cellules en métaphase
- E. elle nécessite la congélation de l'échantillon pour dénaturer l'ADN



## Réponses 11 à 50

**11. Réponses A et B.** La limite de résolution du microscope à fluorescence est la même que celle d'un microscope optique soit environ  $0,2\ \mu\text{m}$ . La limite de résolution en MEB est de l'ordre de  $10\ \text{nm}$  et celle d'un MET de l'ordre de  $0,2\ \text{nm}$ .

**12. Réponses B, C, D et E.** Le MEB permet d'étudier la surface des cellules et de leurs constituants mais pas leur ultrastructure.

**13. Réponses B et C.** La qualité de l'image est caractérisée par les caractéristiques des objectifs. Les oculaires sont constitués de lentilles de distance focale moyenne qui agissent comme une loupe sur l'image fournie par l'objectif. L'huile placée au contact de la lentille de l'objectif à immersion permet d'augmenter l'indice de réfraction du milieu et donc le pouvoir séparateur du microscope.

**14. Réponses B et C.** La microscopie à fond clair est la technique de microscopie la plus simple. L'image qui parvient à l'œil est constituée des couleurs de la lumière blanche de laquelle est soustraite la lumière absorbée par la cellule. A l'état naturel, les constituants cellulaires absorbent la lumière de manière similaire ce qui va donner des images peu contrastées. Le pouvoir séparateur d'un tel microscope est environ 500 fois supérieur à celui de l'œil humain.

**15. Réponses C et D.** La microscopie électronique ne permet pas d'étudier les cellules vivantes. En effet, pour pouvoir être observées, les cellules doivent être au préalable déshydratées et fixées. Les objectifs d'un microscope droit sont placés au-dessus de l'échantillon. Les cellules sont cultivées dans des flacons dont l'épaisseur ne permet pas la mise au point de l'image. Il faut utiliser un microscope inversé où les objectifs sont placés sous l'échantillon.

**16. Réponses A, B et E** C'est le filtre d'émission qui permet de sélectionner la lumière fluorescente émise par l'échantillon. Le miroir dichroïque réfléchit certaines longueurs d'onde et est traversé par d'autres. Il permet de transmettre la lumière fluorescente et de réfléchir la lumière parasite. Avec un microscope à fluorescence, il est possible d'observer les cellules vivantes en contraste de phase ou en fluorescence après marquage des cellules avec des colorants capables de passer la barrière membranaire.

**17. Réponse D.** Les propositions A, B, C et E s'appliquent à la microscopie électronique. Le condenseur d'un microscope optique est constitué de lentilles de verre. La limite de résolution d'un microscope optique est de  $0,2\ \mu\text{m}$ . L'objet n'est pas placé sous vide pour l'observation et l'image obtenue peut être

visualisée directement par l'intermédiaire des oculaires ou sur l'écran d'un ordinateur.

**18. Réponses B et C.** Les virus, les ribosomes et les granulations des lysosomes sont trop petits pour être observés en microscopie optique. Il est nécessaire d'utiliser un microscope électronique.

**19. Réponses A et C** La fluorescéine et la protéine GFP sont excitées par une lumière bleue et émettent une lumière verte. Le DAPI est excité par une lumière violette et émet une lumière bleue.

**20. Réponses A, C et E.** La fixation entraîne une coagulation ou une modification de la structure des protéines qui les rend insolubles et qui s'accompagne d'une perte des fonctions enzymatiques.

**21. Réponses A, D et E.** Le formol et le glutaraldéhyde entraînent la formation de ponts méthyl entre les protéines cellulaires.

**22. Réponses A et B.** L'éthanol, l'acétone et les acides contenus dans le liquide de BOUIN sont des fixateurs qui entraînent la coagulation des protéines.

**23. Réponses B, D et E.** Les fixateurs coagulants agissent en altérant les liaisons hydrogènes qui permettent le maintien de la conformation tridimensionnelle des protéines. Les agents coagulants entraînent une mauvaise préservation des organites intracellulaires.

**24. Réponses A, B et E.** L'acétone solubilise les lipides mais pas les protéines qu'il dénature. Le formol est dissous dans une solution aqueuse et entraîne la solubilisation du glycogène qui disparaît et qui n'est donc plus observable.

**25. Réponse B.** L'hématoxyline est un colorant cationique dit également basique qui a une affinité pour les éléments cellulaires chargés négativement (c'est-à-dire les éléments anioniques ou acides également appelés basophiles). L'hématoxyline colore les noyaux en bleu violet en se fixant sur les acides nucléiques.

**26. Réponses A, C, D et E.** L'éosine est un colorant anionique dit également acide qui a une affinité pour les éléments cellulaires chargés positivement (cationiques ou basiques). L'éosine colore le cytoplasme en rose et les autres éléments cellulaires basiques en rose/rouge plus ou moins vif selon leur acidophilie.

**27. Réponses A, B et D.** L'acide picrique n'est pas un colorant mais un fixateur et l'éosine colore les érythrocytes en rose.

**28. Réponses B, D et E.** La coloration de trichrome de MASSON permet de visualiser les fibres de collagène et l'orcéine permet de mettre en évidence les fibres élastiques.

**29. Réponses A, B et D.** La coloration de MAY-GRUNWALD-GIEMSA est composée d'éosine, de bleu de méthylène et d'azur de méthylène.

**30. Réponses A, B et C.** La coloration de MAY-GRUNWALD-GIEMSA permet de colorer les granulations des polynucléaires neutrophiles en pourpre clair et le cytoplasme des lymphocytes en bleu.

**31. Réponses A et E.** La coloration de trichrome de MASSON ne contient pas d'éosine ni de bleu alcian (utilisé pour mettre en évidence les mucines acides). On y trouve de la fuchsine acide et pas basique.

**32. Réponses B, C et D.** La coloration de PAS entraîne l'oxydation de certains polysaccharides par l'acide périodique qui est révélée par une coloration rouge. Elle est utilisée pour mettre en évidence des polysaccharides comme ceux présents dans le mucus, le glycogène et les glycoprotéines. Elle permet également de déterminer l'origine glandulaire des tissus (adénocarcinome).

**33. Réponse B.** La paraffine est hydrophobe. Avant d'être inclus en paraffine, les tissus sont fixés ce qui empêche l'étude ultérieure des activités enzymatiques cellulaires. Les tissus paraffinés sont coupés avec un microtome à température ambiante. Lorsque les tissus sont étudiés en MET, ils sont inclus dans des résines plutôt que la paraffine.

**34. Réponse C.** La gélatine n'est pas utilisée pour l'inclusion. La paraffine est hydrophobe et donc non miscible avec l'eau. Les coupes paraffinées doivent être réhydratées avant d'être colorées à l'éosine qui est en solution aqueuse. La déshydratation est réalisée avec des bains d'éthanol.

**35. Réponse C et D.** Il n'est pas nécessaire de fixer les échantillons avant la congélation. Des coupes de 5 à 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur sont réalisées et ces coupes permettent d'étudier les acides nucléiques.

**36. Réponse D.** L'échantillon est fixé puis déshydraté pour permettre l'inclusion en paraffine. Des coupes sont réalisées puis les tissus sont hydratés pour permettre la coloration.

**37. Réponse D.** Pour l'observation en microscopie électronique, les tissus sont fixés avec du glutaraldéhyde ou avec un mélange de formaldéhyde et de glutaraldéhyde. Les tissus sont inclus dans des résines synthétiques puis coupés avec un ultramicrotome muni d'un couteau en diamant. Les coupes sont finalement déposées sur des grilles métalliques.

**38. Réponses A et D.** Après cryofracture, les tissus sont recouverts d'une fine couche de carbone et de platine et sont observés en MET. La surface des répliques présente de petites bosses de taille régulière appelées particules intramembranaires. La présence de ces particules est due au fait que le trait de fracture ne casse pas les protéines transmembranaires mais passe au-dessus ou en dessous d'elles. Ces particules sont plus nombreuses sur la face protoplasmique que sur la face exoplasmique.

**39. Réponses B et C.** Les fixateurs utilisés pour préparer les échantillons en vue d'une observation en microscopie électronique sont de pH physiologique (pH 7,4 environ). C'est l'acétate d'uranyle qui est utilisé pour augmenter le contraste des noyaux. Les coupes générées pour l'étude en microscopie électronique sont de 50 à 80 nm d'épaisseur.

**40. Réponse E.** Le tétroxyde d'osmium est utilisé pour la préparation des tissus avant l'observation en microscope électronique. Il est utilisé en complément du formaldéhyde pour fixer les tissus. Le tétroxyde d'osmium ne modifie pas la structure des acides nucléiques et n'entraîne pas la coagulation des protéines. Il interagit avec les lipides cellulaires.

**41. Réponses B et E.** Le MET a un pouvoir séparateur supérieur à celui du MEB. L'échantillon n'est pas coupé et il est recouvert d'une fine couche de métaux lourds avant l'observation.

**42. Réponses A, C et D.** Les colorations qui relèvent de l'histochemie correspondent à des réactions spécifiques produisant une coloration en présence de la molécule recherchée. L'éosine colore tous les composants basiques en rose et le bleu de trypan est un colorant qui sert à distinguer les cellules vivantes des cellules mortes.

**43. Réponses A, B, D et E.** L'hybridation *in situ* est une technique d'étude des acides nucléiques.

**44. Réponses A et B.** Le citrate d'uranyle n'est pas utilisé en histologie. On utilise le citrate de plomb ou l'acétate d'uranyle. En microscopie électronique, les échantillons sont déposés sur une grille métallique et pas dans un milieu de montage.

Le liquide de BOUIN n'est pas utilisé en microscopie à fluorescence car il génère de l'autofluorescence.

**45. Réponses A et B.** L'hybridation *in situ* nécessite une perméabilisation des tissus pour que les sondes puissent pénétrer à l'intérieur des cellules ainsi qu'une dénaturation de l'ADN. Ces 2 processus sont incompatibles avec la vie cellulaire. L'immunohistochimie nécessite également une fixation et une perméabilisation des tissus. Pour être observés en MEB, les tissus doivent être fixés et déshydratés.

**46. Réponses A, B, D et E.** L'hybridation *in situ* permet l'étude des acides nucléiques.

**47. Réponses C et D.** Les anticorps polyclonaux proviennent du sérum d'un animal immunisé avec un seul antigène. Les anticorps sont produits par les lymphocytes B différenciés en plasmocytes. Les anticorps polyclonaux donnent des marquages plus intenses que les anticorps monoclonaux car ils se fixent sur plusieurs épitopes. Par contre, le risque de marquage non spécifique ou bruit de fond est plus important.

**48. Réponses B et D.** Les anticorps primaires et secondaires sont produits chez deux animaux d'espèces différentes et c'est l'anticorps secondaire qui est couplé au traceur. L'immunodétection indirecte génère plus de bruit de fond car le risque de fixation non spécifique de l'anticorps secondaire est plus important.

**49. Réponses B, D et E.** La cytométrie permet l'étude des cellules en suspension. Par cette technique on peut aussi bien étudier des marqueurs membranaires ou intracellulaires, à condition que la cellule ait été fixée et perméabilisée au préalable.

**50. Réponses B et C.** L'hybridation *in situ* est une méthode d'étude des acides nucléiques. L'hybridation *in situ* sur chromosome peut être réalisée sur des cellules dans n'importe quelle phase du cycle cellulaire. L'ADN cellulaire est dénaturé par la chaleur et pas par le froid.

## Chapitre 3

---

# La matrice extracellulaire

*Pr Laure FAVOT-LAFORGE*

### Fiche 3 – La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un enchevêtrement complexe de macromolécules qui assure la cohésion des cellules entre elles. La composition et l'organisation des protéines matricielles varient pour répondre aux contraintes mécaniques qui s'exercent sur les tissus. La MEC influence également les capacités des cellules à proliférer, à se déplacer et à se différencier. Les composants de la MEC sont synthétisés par des cellules d'origine mésenchymateuse qui sont dispersées dans la matrice comme **les fibroblastes** et **les myofibroblastes** des tissus conjonctifs (voir fiche n°5), **les chondroblastes** du cartilage et **les ostéoblastes** du tissu osseux (voir fiche n°6).

La MEC est constituée d'une **substance fondamentale** composée de glycosaminoglycanes et de protéoglycanes, de protéines fibreuses (collagènes et fibres élastiques) et de glycoprotéines structurales importantes pour l'adhérence cellulaire.

**Les glycosaminoglycanes (GAG)** sont des macromolécules non ramifiées constituées de n répétitions de disaccharides associant un hexosamine souvent sulfaté (le N-acétyl-glucosamine ou le N-acétyl-galactosamine) et un acide uronique. On distingue 4 types principaux de GAG selon la nature et la longueur des chaînes polysaccharidiques ainsi que le nombre et la position des groupements sulfates. Il s'agit de l'acide hyaluronique, de la chondroïtine sulfate, de l'héparane sulfate et du kératane sulfate. A l'exception de l'acide hyaluronique, tous les GAG sont liés de façon covalente à une protéine pour former **un protéoglycane**. Selon le protéoglycane, un nombre variable de chaînes de GAG peuvent se fixer sur la protéine porteuse. A titre d'exemple, **l'acide hyaluronique**, retrouvé dans tous les tissus et notamment au niveau des articulations, est composé de 250 à 25000 unités de disaccharides non sulfatés ; **l'aggrégane** qui est un composant majeur du cartilage est formé d'une protéine sur laquelle se greffe 100 chaînes de chondroïtine sulfate et 30 chaînes de kératine sulfate ; **le perlecan** qui est présent au niveau de la lame basale comprend plusieurs chaînes d'héparane sulfate ; **la décorine** qui est présente dans le tissu conjonctif où elle interagit avec les fibrilles de collagènes ne comporte qu'une seule chaîne de chondroïtine/dermatane sulfate.

Les GAG présentent de longues chaînes carbonées hydrophiles, chargées négativement qui vont attirer les cations et les molécules d'eau. Ces chaînes carbonées occupent un volume important car elles sont trop rigides pour se replier et former une structure globulaire. En solution, les GAG forment donc des gels qui sont capables d'absorber de grandes quantités d'eau et dans lesquels peuvent diffuser ions et macromolécules. L'absorption d'eau crée une pression de gonflement ou turgescence de la MEC qui permet aux tissus de résister aux forces de compression. Les GAG jouent également un rôle : dans la migration cellulaire où ils forment une trame qui va servir de support notamment pendant le

développement embryonnaire et lors des processus de cicatrisation ; dans la régulation de l'activité de facteurs de croissance comme le TGF $\beta$  et le FGF qu'ils peuvent séquestrer et/ou de protéger de la dégradation et présenter à leur récepteur.

**Le collagène** est une famille de protéines fibreuses qui représente environ 30 % de la masse protéique des vertébrés.

Les molécules de collagène sont constituées de l'assemblage de 3 chaînes polypeptidiques (appelées chaîne  $\alpha$ ) en une triple hélice en forme de corde. Chaque chaîne  $\alpha$  est codée par un gène différent et une trentaine de gènes ont été identifiés. Les chaînes  $\alpha$ , synthétisées sous forme de précurseur (procollagène) présentent une partie centrale formée par la répétition d'un tripeptide gly-X-Y où X est souvent une proline et Y une hydroxyproline et de 2 extrémités N et C terminales globulaires. La présence de glycine permet aux trois chaînes polypeptidiques de s'associer pour former une triple hélice. Lorsque les molécules de procollagène sont sécrétées, une peptidase coupe les extrémités N et C terminales ce qui entraîne une agrégation des molécules de collagène entre elles et la formation de fibrilles. Pour être plus précis, les molécules s'alignent dans le même sens avec un décalage de 67 nm (ce qui donne au collagène un aspect strié en microscopie) et des liaisons covalentes se forment entre les résidus lysine. Selon le type de collagène, les fibrilles peuvent s'associer pour former des fibres qui peuvent se regrouper pour former des faisceaux.

Les collagènes fibrillaires sont les collagènes qui sont les plus abondants dans les tissus. On distingue par exemple le collagène I retrouvé principalement dans le derme, les os, les tendons, le collagène II qui est un composant des cartilages, le collagène de type III présent dans les parois vasculaire....

Les collagènes peuvent prendre d'autres formes d'organisation moléculaire. Par exemple, le collagène IV s'assemble en une trame fibreuse comme un filet et est un constituant majeur **des lames basales**, le collagène XII forme des fibrilles d'ancrage qui relient la lame basale des épithéliums aux tissus conjonctifs sous-jacent, les collagènes IX et XII sont associés à la surface des fibrilles et permettent l'interaction avec les autres composants de la MEC et le collagène XVII possède un domaine transmembranaire et est un constituant des hémidesmosomes.

L'organisation spatiale et l'épaisseur des fibrilles ou fibres de collagène varient selon les tissus de manière à leur permettre de résister aux forces de tension. Dans la peau, les fibres sont orientées dans toutes les directions comme dans un panier en osier ; dans les tendons, le collagène forme des faisceaux alignés parallèlement ; dans l'os, le collagène est organisé en couches successives pour former les lamelles osseuses.

**Les fibres élastiques** sont particulièrement abondantes dans les tissus soumis à des déformations comme le poumon, la peau, les vaisseaux sanguins, les ligaments ou le cartilage élastique. Elles sont majoritairement composées



d'élastine, une protéine très hydrophobe qui s'assemble en filaments et en feuillets par réticulation via des liaisons covalentes transversales entre les résidus lysine. Dans les fibres élastiques, l'élastine est associée à d'autres protéines comme **la fibrilline et la fibuline** qui jouent un rôle dans l'organisation des fibres. Les fibres élastiques sont souvent associées aux fibres de collagènes et aux polysaccharides de la matrice.

La MEC contient également des protéines non fibrillaires qui jouent des rôles important dans l'organisation des protéines matricielles mais également dans les processus d'adhésion cellulaire. Ici, à titre d'exemple nous parlerons de **la fibronectine, de la laminine, de l'entactine et de la tenascine**.

La fibronectine est un dimère constitué de deux sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  réunies par une paire de ponts disulfures et forme un réseau fibrillaire. Elle possède différents domaines qui sont capables d'interagir avec d'autres constituants moléculaires de la matrice extracellulaire (formation d'une trame) comme le collagène et les protéoglycanes et contribue à son organisation. La fibronectine présente un motif moléculaire constitué des acides aminés arginine / lysine / acide aspartique (domaine RGD) permettant une interaction spécifique avec les intégrines cellulaires. Par l'intermédiaire des intégrines qui sont des mécanorecepteurs cellulaires, la fibronectine favorise l'adhérence cellulaire et régule la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire.

La fibronectine joue également un rôle dans la migration cellulaire au cours du développement et des processus de cicatrisation et participe à la coagulation sanguine.

La laminine est une glycoprotéine extracellulaire formée de 3 chaînes polypeptidiques disposées en forme de croix et qui sont reliées par des ponts disulfures. Différents domaines structuraux lui permettent d'interagir avec d'autres composants de la MEC comme l'héparane sulfate, le collagène de type IV et l'entactine. Comme la fibronectine, la laminine interagit avec les intégrines cellulaires et régule les processus de migration, survie et différenciation cellulaire.

La laminine est un composant important des lames basales. Elle forme des réseaux protéiques qui sont connectés, par l'intermédiaire de l'entactine, à la trame fibreuse formée par le collagène de type IV.

L'entactine possède des domaines de liaison au collagène de type IV et à la laminine. Elle joue un rôle important dans la structuration de la lame basale. La tenascine comporte des domaines de liaison pour la fibronectine, pour les protéoglycanes et pour les intégrines cellulaires. Elle joue un rôle dans l'adhérence et la migration cellulaire.